



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

MAICO ROBERTO LUCKMANN RODRIGUES DA SILVA

**NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AO PIRIPROXIFENO  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE  
*Gallus domesticus***

FLORIANÓPOLIS

2020

MAICO ROBERTO LUCKMANN RODRIGUES DA SILVA

**NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AO PIRIPROXIFENO  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE  
*Gallus domesticus***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PPGBCD, do Centro de Ciências Biológicas - CCB da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Evelise Maria Nazari  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Machado da Silva

FLORIANÓPOLIS

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Maico Roberto Luckmann Rodrigues da  
Neurotoxicidade induzida pela exposição ao piriproxifeno  
durante o desenvolvimento embrionário de Gallus domesticus  
/ Maico Roberto Luckmann Rodrigues da Silva ;  
orientadora, Evelise Maria Nazari, coorientadora, Norma  
Machado da Silva, 2020.  
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,  
Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.  
Vertebrado. 3. Larvicida. 4. Sistema Nervoso Central. 5.  
Morfometria. I. Nazari, Evelise Maria . II. Silva, Norma  
Machado da. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. IV. Título.

MAICO ROBERTO LUCKMANN RODRIGUES DA SILVA  
**NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AO PIRIPROXIFENO  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE**  
*Gallus domesticus*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Geisson Marcos Nardi, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup>. Talita da Silva Jeremias, Dr<sup>ª</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup>. Cintia Monteiro de Barros, Dr<sup>ª</sup>.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

---

Prof<sup>ª</sup>. Yara Costa Netto Muniz, Dr<sup>ª</sup>.

Subcoordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

---

Prof<sup>ª</sup>. Evelise Maria Nazari, Dr<sup>ª</sup>.

Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Norma Machado da Silva, Dr<sup>ª</sup>.

Coorientadora

FLORIANÓPOLIS, 2020.

**Dedico este trabalho a mulher da minha vida, a minha mãe!**

## AGRADECIMENTOS

Tão bom chegar até aqui e poder agradecer quem de alguma forma me proporcionou atingir esse objetivo! Para isso, gostaria de agradecer inicialmente a Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pela infraestrutura e ensino proporcionado no período desses dois anos de mestrado.

Gostaria de agradecer imensamente a minha querida orientadora professora Dra. Evelise Maria Nazari inicialmente pelo aceite do estágio obrigatório da graduação em 2016 no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - LRDA e, em 2018 pelo tão aguardado aceite de orientação do mestrado! Agradeço por entender minhas limitações e em contrapartida auxiliar em meu crescimento profissional. Admiro seu profissionalismo, competência e dedicação a esta pós-graduação!

À minha querida coorientadora professora Dra. Norma Machado da Silva pelas produtivas discussões sobre esse estudo. Obrigado pelo aceite de coorientação! Suas sugestões ajudaram a lapidar esse estudo.

Mas não teria realizado meu estágio no LRDA em 2016 (nem mesmo conhecido o laboratório), se em 2013 não tivesse sido motivado a sonhar com uma pós-graduação. Essa motivação veio pela minha orientadora de iniciação científica e TCC, doutorada por esse programa, a professora Dra. Neide Armiliato. Obrigado pela dedicação e por me ajudar a dar os primeiros passos na minha carreira acadêmica!

À professora Dra. Yara Maria Rauh Muller pela sua dedicação ao ensino e por seus conhecimentos repassados à todos no LRDA.

Ao professor Dr. Fabiano Dahlke do Laboratório de Avicultura (CCA/UFSC) pelo fornecimento dos ovos fertilizados de *Gallus domesticus*.

Aos técnicos dos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia - LAMEB pela disponibilidade, cordialidade e auxílio com os equipamentos, bem como o próprio LAMEB na qual grande parte desta pesquisa pôde ser desenvolvida.

Ao apoio financeiro da coordenação de aperfeiçoamento pessoal - CAPES.

Às minhas amigas e colegas de mestrado Giuliam, Laíse, Nathália e Vanessa, pelos momentos de colaboração, estresses e alegrias compartilhadas. Obrigado por proporcionarem que este mestrado fosse ainda mais divertido dentro e fora do laboratório.

À toda equipe do LRDA, pelas trocas de experiências, colaborações e momentos de descontração, em especial para a “galera dos ovos” Manuela e Mirian.

Ao Vinícius, por me ajudar a aliviar minhas preocupações diárias ao final de cada dia e tornar a caminhada mais leve, obrigado.

Por fim obrigado a minha família, em especial minha mãe Gessi, minha avó Vali, minhas irmãs Ana e Alana e meu padrasto Ariberto por sempre me incentivarem quanto aos meus estudos. Obrigado pelas palavras de otimismo e por não me deixarem desanimar. A distância de vocês neste período de mestrado só intensificou a admiração e o que sinto por vocês. Amo vocês mais do que tudo na vida!

**“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”**  
**John Ruskin**

## RESUMO

O piriproxifeno (PPF) ( $C_{20}H_{19}NO_3$ ) é um larvicida a base de piridina que atua como um regulador de crescimento de insetos. No Brasil desde o ano de 2014, o larvicida PPF vem sendo aplicado em reservatórios de água potável para o controle da proliferação do mosquito do gênero *Aedes*, vetor das doenças Dengue, Chikungunya e do Zíka vírus. Desde então, observou-se o aumento dos casos de microcefalia em recém-nascidos no país, sendo que instituições de saúde publicaram notas técnicas alertando sobre a possível associação entre esses casos e o larvicida aplicado em reservatórios de água potável. Com o objetivo de investigar os efeitos neurotóxicos do PPF, este trabalho caracterizou a morfologia e os eventos celulares envolvidos na histogênese das camadas celulares das vesículas encefálicas no encéfalo após a exposição ao PPF, utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo experimental. Para tal, concentrações sub-letais do PPF (0,01 mg/L e 10 mg/L diluídas em DMSO e salina a 0,9%) foram definidas por uma curva de sobrevivência e testadas para avaliação toxicidade. A exposição ao PPF foi realizada *in ovo* após 24 h de incubação, que corresponde à idade embrionária (E1), sendo os embriões analisados em E10. Embriões não expostos ao PPF foram utilizados como controle. Inicialmente, as análises morfométricas indicaram redução significativa na massa corporal do embrião e do encéfalo nos grupos expostos ao PPF. Foram realizadas medidas externas da região cefálica e, os embriões expostos à concentração de 10 mg/L de PPF apresentaram redução significativa nas medidas da distância ântero-posterior e da distância transversal da cabeça. Nas medidas do encéfalo, os embriões expostos à concentração de 10 mg/L de PPF apresentaram redução significativa na largura do encéfalo. Quando realizadas morfometrias internas das vesículas encefálicas, os grupos expostos ao PPF apresentaram redução da largura e altura do telencéfalo. Também, foram observadas reduções significativas na largura total do mesencéfalo acompanhado de reduções na espessura da região rostral, região caudal e no teto mesencefálico. Nas morfometrias das camadas celulares do telencéfalo, os grupos expostos às duas concentrações de PPF apresentaram redução significativa na espessura e na densidade numérica de células por área (NA) das camadas epêndimária e cortical. As camadas celulares do mesencéfalo nos grupos expostos às duas concentrações de PPF apresentaram redução significativa na camada epêndimária e nas camadas I, IV e V, VI, VII e X. Adicionalmente, a NA no mesencéfalo também reduziu significativamente na camada epêndimária e nas camadas I, VI, VII, VIII, IX e X. Não se observou redução significativa na viabilidade celular no encéfalo, tampouco aumento dos centros de ossificação na cabeça. No grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF observou-se redução na proliferação celular (marcador Fosfo-histona H3) e aumento no dano ao DNA (marcador  $\gamma$ -H2A.X). Não se observou redução na diferenciação neuronal (marcador  $\beta$ 3 Tubulina) e diferenciação glial (marcador GFAP). Não se observou alteração no número de células positivas para a proteína Caspase 3, efetora de apoptose. Por outro lado, o número de células apoptóticas pela análise da fragmentação do DNA aumentou significativamente no grupo exposto à concentração de 10 mg/L. Os resultados demonstraram que a exposição *in ovo*, com destaque para a concentração de 10 mg/L, induziu alterações morfométricas, densidade celular e conteúdo de proteínas, comprometendo o desenvolvimento do encéfalo.

**Palavras-chave:** Vertebrado; Larvicida; Sistema Nervoso Central; Morfometria; Proliferação celular; Dano ao DNA.

## ABSTRACT

Pyriproxifen (PPF) ( $C_{20}H_{19}NO_3$ ) is a pyridine-based larvicide that acts as an insect growth regulator. In Brazil, since 2014, the PPF larvicide has been applied in drinking water reservoirs to control mosquito proliferation of the genus *Aedes*, a vector of the diseases Dengue, Chikungunya and Zika virus. Since then, there has been an increase in cases of microcephaly in newborns in the country, and health institutions have published technical notes warning about the possible association between these cases and larvicide applied in drinking water reservoirs. In order to investigate the neurotoxic effects of PPF, this work characterized the morphology and cellular events involved in the histogenesis of the cell layers of the brain vesicles in the brain after exposure to PPF, using *Gallus domesticus* embryos as an experimental model. For this, the sub lethal PPF concentrations (0.01 mg/L and 10 mg/L diluted in DMSO and 0.9% saline) were defined by a survival curve and tested for evaluation of toxicity. PPF exposure was performed *in ovo* after 24 hours of incubation, which corresponds to the embryonic age (E1), and the embryos were analyzed in E10. Embryos not exposed to PPF were used as controls. Initially, morphometric analysis indicated a significant reduction in embryo and brain mass in groups exposed to PPF. External measurements of the cephalic region were performed, and embryos exposed to a concentration of 10 mg/L of PPF showed a significant reduction in the measurements of the anteroposterior distance and the transversal distance of the head. In brain measurements, embryos exposed to a concentration of 10 mg/L of PPF showed a significant reduction in brain width. When internal morphometries of the brain vesicles were performed, the groups exposed to PPF showed a reduction in the width and height of the telencephalon. Significant reductions in the mesencephalon total width were also observed, accompanied by reductions in the thickness of the rostral region, caudal region and in the mesencephalic tectum. In the morphometries of the cell layers of the telencephalon, the groups exposed to the two concentrations of PPF showed a significant reduction in the thickness and in the numerical density of cells by area (NA) of the ependymal and cortical layers. The mesencephalon cell layers in the groups exposed to the two PPF concentrations showed a significant reduction in the ependymal layer and in I, IV and V, VI, VII and X layers. In addition, NA in the mesencephalon also decreased significantly in the ependymal layer and in I, VI, VII, VIII, IX and X layers. There was no significant reduction in cell viability in the brain, neither an increase in ossification centers in the head. In the group exposed to the concentration of 10 mg/L of PPF, a reduction in cell proliferation (Phospho-histone H3 marker) and an increase in DNA damage ( $\gamma$ -H2A.X marker) were observed. There was no reduction in neuronal differentiation ( $\beta$ 3 Tubulin marker) and glial differentiation (GFAP marker). There was no change in the cells positive number for Caspase 3 protein, effective for apoptosis. On the other hand, the number of apoptotic cells through DNA fragmentation analysis increased significantly in the group exposed to the concentration of 10 mg/L. The results showed that *in ovo* exposure, with emphasis on the concentration of 10 mg/L, induced morphometric changes, cell density and protein content, compromising brain development.

**Keywords:** Vertebrate; Larvicide; Central Nervous System; Morphometry; Cell proliferation; DNA damage.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema do desenvolvimento das vesículas encefálicas em embriões de vertebrados, com destaque para organização em embriões de *Gallus domesticus*. ..... 19
- Figura 2** – Cronologia da diferenciação neuronal e glial no encéfalo de *Gallus domesticus*. 21
- Figura 3** - Desenvolvimento das camadas celulares do telencéfalo e do mesencéfalo em embriões de *Gallus domesticus*. ..... 23
- Figura 4** - Representação gráfica do desenho experimental utilizado nas etapas I e II. .... 30
- Figura 5** - Organograma da metodologia empregada no estudo da etapa II. .... 31
- Figura 6** - Secções histológicas do encéfalo de *Gallus domesticus*, destacando o telencéfalo e suas camadas celulares, nas quais foram realizadas as morfometrias. .... 37
- Figura 7** - Secções histológicas do encéfalo de *Gallus domesticus*, destacando o teto óptico do mesencéfalo e suas camadas celulares, nas quais foram realizadas as morfometrias. .... 37
- Figura 8** – Imagem da graticula de Weibel acoplada à ocular do microscópio de luz utilizada para o cálculo da densidade numérica de células por área (NA). .... 38
- Figura 9** - Curva de sobrevivência de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 45
- Figura 10** - Morfometrias externas realizadas na região cefálica de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 47
- Figura 11** - Medidas de largura e comprimento do encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 48
- Figura 12** - Morfometria das camadas celulares do telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 50
- Figura 13** - Densidade numérica de células por área (NA) nas camadas celulares do telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 51
- Figura 14** - Morfometria das camadas celulares do teto óptico do mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 53

<b>Figura 15</b> - Densidade numérica de células por área (NA) nas camadas celulares do teto óptico do mesencéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	54
<b>Figura 16</b> - Viabilidade celular no encéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	56
<b>Figura 17</b> - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína Fosfo-histona H3 no encéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	57
<b>Figura 18</b> - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína $\gamma$ -H2A.X no encéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	58
<b>Figura 19</b> - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína Caspase 3 no encéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	60
<b>Figura 20</b> - Quantificação de células apoptóticas no telencéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	61
<b>Figura 21</b> - Quantificação de células apoptóticas no mesencéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	62
<b>Figura 22</b> - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína $\beta$ 3 Tubulina no encéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	63
<b>Figura 23</b> - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína GFAP no encéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	64
<b>Figura 24</b> - Análises das reações histoquímicas na região cefálica de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. ....	66
<b>Figura 25</b> - Resumo esquemático dos efeitos do PPF sobre o desenvolvimento do encéfalo de embriões de <i>Gallus domesticus</i> . ....	68
<b>Figura 26</b> - Controle da técnica de MTT por meio da curva de diluição da amostra, do reagente MTT e tempo de incubação. ....	92

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Relação de artigos publicados de 2016-2019 sobre pesquisas em que vertebrados foram utilizados na avaliação da toxicidade do larvicida PPF. .... 26
- Quadro 2** - Descrição das morfometrias externas da região cefálica realizadas em embriões de *Gallus domesticus*. .... 35
- Quadro 3** - Anticorpos primários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo para o estudo da proliferação celular, diferenciação neuronal, diferenciação glial, apoptose e dano ao DNA. .... 40
- Quadro 4** - Anticorpos secundários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo para o estudo da proliferação celular, diferenciação neuronal, diferenciação glial, apoptose e dano ao DNA. .... 40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Morfometrias realizadas nos embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 46
- Tabela 2** - Morfometrias realizadas no telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 48
- Tabela 3** - Morfometrias realizadas no mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 49
- Tabela 4** - Relação da densidade numérica de células por área (NA) referente as camadas celulares do telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 52
- Tabela 5** - Relação da densidade numérica de células por área (NA) referente a cada camada celular do teto óptico do mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno. .... 55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABRASCO</b>	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CF</b>	Citometria de fluxo
<b>CMP</b>	Concentração Máxima Permitida
<b>DAB</b>	3,3' - Diaminobenzidina, do inglês <i>3,3' - Diaminobenzidine</i>
<b>DAPI</b>	Diamidinofenylindol, do inglês <i>4',6 - Diamidino-2-Phenylindole</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
<b>E</b>	Dia Embrionário
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>FBS</b>	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FSA-A</b>	Dispersão Frontal, do inglês <i>Forward scatter</i>
<b>GFAP</b>	Proteína Ácida Fibrilar Glial, do inglês <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina G1
<b>IH</b>	Imuno-histoquímica
<b>MTT</b>	Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio, do inglês <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
<b>NA</b>	Densidade Numérica de Células por Área
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PPF</b>	Piriproxifeno, do inglês <i>Pyriproxyfen</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SSC-A</b>	Dispersão Lateral, do inglês <i>Side scatter</i>
<b>TUNEL</b>	do inglês <i>TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling</i>
<b>WHO</b>	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1	O LARVICIDA PIRIPROXIFENO E SEU USO NA SAÚDE PÚBLICA.....	17
1.2	O DESENVOLVIMENTO DO SNC EM VERTEBRADOS.....	19
1.3	O EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE VERTEBRADOS.....	24
1.4	O USO DE EMBRIÕES DE <i>Gallus domesticus</i> EM ESTUDOS DE EMBRIOTOXICIDADE.....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
3.2	OBTENÇÃO DOS OVOS FERTILIZADOS DE <i>Gallus domesticus</i> .....	32
3.3	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	32
3.4	DEFINIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
3.5	MORFOMETRIA TOTAL DOS EMBRIÕES.....	34
3.6	MORFOMETRIA EXTERNA DA REGIÃO CEFÁLICA.....	34
3.7	PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	35
3.7.1	Morfometria do Encéfalo, das Vesículas Encefálicas e das Camadas Celulares.....	36
3.7.2	Cálculo da Densidade Numérica de Células por Área (NA).....	38
3.7.3	Marcações Celulares por Imuno-histoquímica.....	39
3.7.4	Marcações Celulares pelo Método de TUNEL.....	40
3.7.5	Análises por Reação Histoquímica.....	41
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
3.9	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	42
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES.....	44
4.2	MORFOLOGIAS E MORFOMETRIAS DOS EMBRIÕES.....	45

4.3	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ENCÉFALO E VESÍCULAS ENCEFÁLICAS ...	47
4.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS CAMADAS CELULARES .....	50
4.5	EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	55
4.6	EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	56
4.7	EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A INDUÇÃO DE DANO AO DNA E MORTE CELULAR POR APOPTOSE.....	57
4.8	EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL .....	62
4.9	EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GLIAL .....	64
4.10	ANÁLISES DO PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO DA CABEÇA.....	65
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
	APÊNDICE A – Padronização da técnica de MTT para controle da homogeneidade das amostras.....	92

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O LARVICIDA PIRIPROXIFENO E SEU USO NA SAÚDE PÚBLICA

O PPF ( $C_{20}H_{19}NO_3$ ), nome químico 4-phenoxyphenyl (RS) -2- (2-pyridyloxy) propyl ether, com massa molecular relativa de 321,37 g/mol, é um larvicida a base de piridina, que pertence ao grupo químico éter piridiloxipropílico. O PPF é uma substância reguladora de crescimento de insetos, que age no processo de metamorfose, sendo usado como larvicida no controle de diversos insetos na agricultura, horticultura, bem como insetos transmissores de doenças (HATAKOSHI et al., 1987; KAWADA et al., 1987; WHO, 2008; WHO, 2017).

Por sua composição química, o PPF é um análogo do hormônio juvenil de insetos, cujo mecanismo de ação inibe o desenvolvimento das características adultas do inseto, como asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa, mantendo-os nos estágios imaturos de ninfa ou larva (DIVE, 2014).

Em 2001, o PPF foi classificado como improvável de causar danos à saúde e portanto, foi aprovado como um inseticida para o controle de larvas de mosquitos em recipientes de água potável na dose alvo de 0,01 mg/L, sendo esta a concentração máxima permitida (CMP) (WHO, 2001; WHO, 2017). No Brasil, o PPF com nome comercial Sumilarv<sup>®</sup> 0,5 G, é fabricado pela empresa Sumitomo Chemical e registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA do Ministério da Saúde (DIVE, 2014).

A formulação comercial do PPF utilizado em água potável, se apresenta em uma formulação granulada de areia de origem vulcânica associada a um surfactante e tem uma lenta diluição em água. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a formulação comercial de PPF utilizada em reservatórios de água potável tem residualidade de até 8 semanas (WHO, 2008; BRASIL, 2014). A meia-vida para o PPF no solo em condições aeróbicas é de 12,4 dias, na água em condições aeróbicas é de 23,1 dias e em condições anaeróbicas o PPF apresenta meia-vida de 346,5 dias (FATHULLA e OHNO, 1993).

No Brasil, a partir de 2014, adotou-se o uso do PPF para controlar o desenvolvimento de mosquitos do gênero *Aedes*, vetor das doenças como Dengue, Chikungunya e Zika vírus, sendo inclusive aplicado em reservatórios de água potável, seguindo as Diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a Qualidade da Água Potável (BRASIL, 2014; WHO, 2017; WHOPES, 2017).

A partir de 2015, o aumento dos casos de microcefalia em bebês nascidos no Brasil levantou crescentes controvérsias sobre a etiologia desta anomalia congênita, na qual o neonato apresenta a circunferência da cabeça abaixo da média para a mesma idade e sexo (OPTIZ e HOLT, 1990). Uma das principais causas da microcefalia é a ossificação e crescimento prematuro dos ossos do crânio, que comprometem as fontanelas e limitam o crescimento do encéfalo (OPTIZ e HOLT, 1990). Na cabeça, os ossos que formam o crânio passam por um processo de ossificação intramembranosa, onde o tecido mesodérmico ossifica sem que haja a diferenciação prévia em cartilagem. Poucos ossos da cabeça apresentam ossificação endocondral, cujo tecido mesodérmico se diferencia primeiramente em cartilagem e posteriormente ocorre a diferenciação óssea (MACARI et al., 1994).

Em relação aos casos de microcefalia no Brasil, apenas no ano de 2015, foram totalizados 1.608 casos (FRIAS et al., 2014). Entre as semanas epidemiológicas 45/2015 e 40/2019, o Ministério da Saúde do Brasil foi notificado sobre 18.282 casos suspeitos. Deste total, foram confirmados 3474 casos em neonatos (BRASIL, 2019). Os casos de microcefalia aumentaram significativamente, uma vez que em um período de 10 anos, entre 2000-2014, foram registrados apenas 2.464 neonatos com microcefalia no Brasil, representando média anual de 164 casos de microcefalia (FRIAS et al., 2014; MARINHO et al., 2016).

Nesse cenário, levantou-se a hipótese de que o PPF pudesse ter ligação com casos de microcefalia, devido à sua aplicação em reservatórios de água potável (RASMUSSEN et al., 2016; BRASIL, 2019). Ainda que, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças - CDC (2016) tenha relatado que os casos de microcefalia tiveram relação com o surto de Zika vírus, médicos brasileiros, assim como médicos de cidades pulverizadas por agrotóxicos na Argentina, divulgaram notas reportando o larvicida PPF usado nas fontes de água potável como possível causa de alterações no sistema nervoso central (SNC), como a microcefalia (ABRASCO, 2016; VAZQUEZ, 2016).

A utilização de PPF em reservatórios de água potável e a exposição constante da população em escala global a este larvicida nos períodos de transmissão de doenças como Dengue, Chikungunya e Zika vírus, tornam esse larvicida um interessante químico a ser estudado, já que pouco se conhece sobre os reais efeitos desta substância nos organismos, sobretudo no desenvolvimento do SNC de vertebrados. E, considerando que concentrações elevadas de PPF durante o desenvolvimento embrionário podem estar relacionados a danos celulares e à ocorrência de anomalias congênitas do SNC, faz-se necessário compreender o

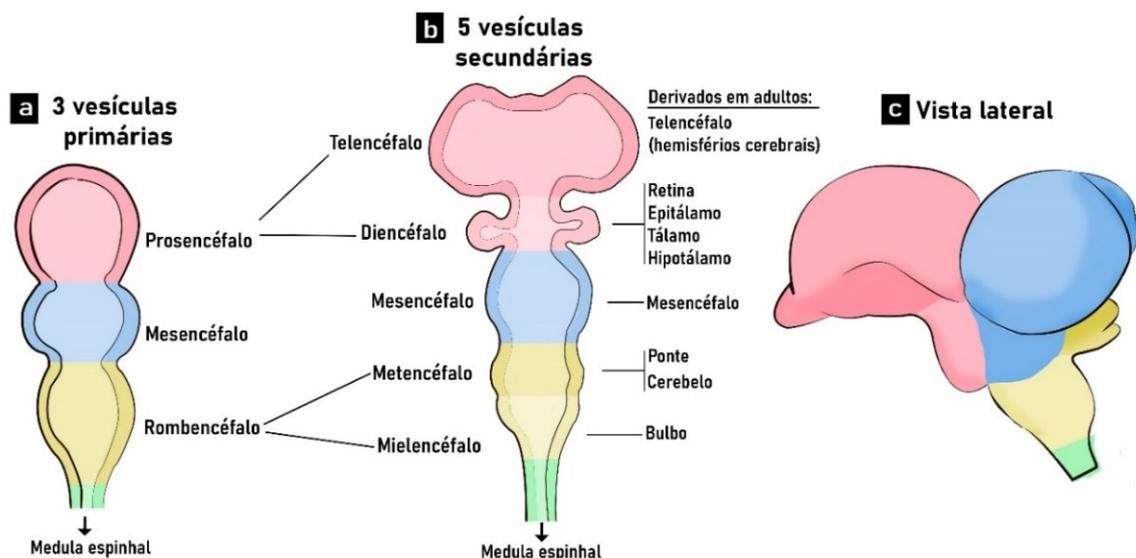
processo de formação deste sistema, para então interpretar adequadamente os efeitos celulares do PPF.

## 1.2 O DESENVOLVIMENTO DO SNC EM VERTEBRADOS

O desenvolvimento do SNC em embriões de vertebrados inicia com o processo de neurulação, pela indução de moléculas sinalizadoras produzidas pela notocorda, que atuam no folheto embrionário ectoderma, formando a placa neural. A placa neural, por meio de movimentos morfogenéticos, forma o tubo neural que se organiza no sentido céfalo-caudal ao longo da região dorsal do embrião, conforme revisão de Smith e Schoenwolf (1997). As regionalizações ântero-posterior, médio-lateral e dorso-ventral do tubo neural definem as características morfofuncionais do SNC, onde a porção mais céfala origina o encéfalo e a porção mais caudal origina a medula espinhal, conforme revisão de Colas e Schoenwolf (2001).

O desenvolvimento e regionalização do tubo neural em sua porção céfala, promove modificações anatômicas para a formação das três vesículas encefálicas primárias, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, organizadas no sentido céfalo-caudal do embrião (Figura 1) (SCHOENWOLF e FRANKS, 1984; SLACK, 2006).

**Figura 1** - Esquema do desenvolvimento das vesículas encefálicas em embriões de vertebrados, com destaque para organização em embriões de *Gallus domesticus*.



**a:** Esquema das três vesículas primárias que originarão o encéfalo; **b:** Esquema das cinco vesículas secundárias que se originam das vesículas primárias; **c:** Vista lateral do encéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em idade embrionária (E10) demonstrando a posição anatômica das vesículas encefálicas. Fonte: adaptado de Scicolone et al. (1971) e Moore et al. (2016).

Durante a formação inicial do SNC, as três vesículas encefálicas primárias originam cinco vesículas encefálicas secundárias. O prosencéfalo se subdivide em telencéfalo e o diencéfalo. Não ocorre subdivisão do mesencéfalo. O rombencéfalo se subdivide em metencéfalo e em mielencéfalo. As cinco vesículas encefálicas secundárias originam estruturas que permanecem nos indivíduos adultos. O telencéfalo se estruturará em dois hemisférios cerebrais, e o diencéfalo formará estruturas como a retina, epitálamo, tálamo e o hipotálamo. O mesencéfalo formará o aqueduto cerebral. O metencéfalo originará a ponte e o cerebelo, enquanto o mielencéfalo formará o bulbo (SCHOENWOLF e FRANKS, 1984; SLACK, 2006).

Nos hemisférios cerebrais localizam-se os ventrículos laterais, que se comunicam através dos forames interventriculares com o terceiro ventrículo, localizado no diencéfalo. O terceiro ventrículo através do aqueduto cerebral originado no mesencéfalo, comunica-se com o quarto ventrículo localizado na altura do tronco encefálico, e este por sua vez comunica-se com o canal medular. Os ventrículos são revestidos por um neuroepitélio composto de células cuboides chamados de epêndima. Os ventrículos desempenham funções essenciais para a proteção e a homeostase do tecido nervoso, como suporte mecânico, eliminação de produtos do metabolismo neural e comunicação química (SCHOENWOLF e FRANKS, 1984; LENT, 2010; BELLAIRS e OSMOND, 2014; MOORE et al., 2016).

O SNC está envolto pelas meninges, que são compostas de tecido conjuntivo e altamente vascularizadas. A camada mais externa das meninges é chamada de dura-máter, a intermediária é chamada de aracnóide e a camada em contato com o encéfalo é chamada de pia-máter. A camada aracnoide e a pia-máter são separadas pelo espaço subaracnóideo, que está preenchida de líquido cefalorraquidiano. Esse líquido tem função de transportar metabólitos e garantir a proteção do SNC (GREENBERG, et al., 1994; MOORE et al., 2016).

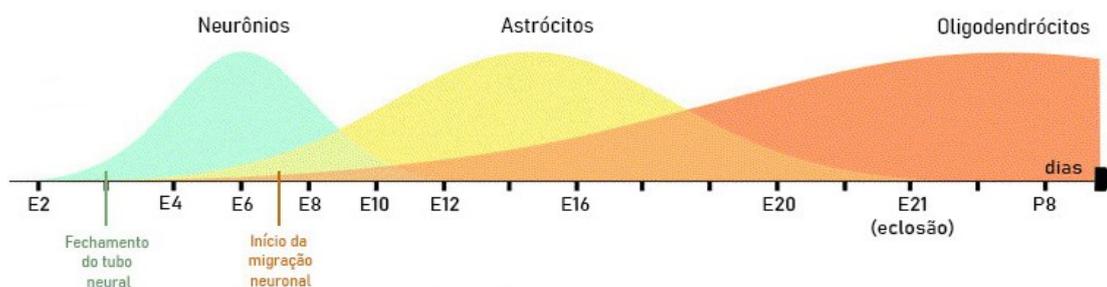
As camadas celulares que compõem todas as regiões do SNC são formadas a partir de processos de proliferação, diferenciação e migração das células neurais, conhecido como neurogênese. No neuroepitélio, as células neurais originam os neuroblastos e os glioblastos, que por sua vez darão origem aos neurônios e as células da glia, respectivamente (TAKAHASHI et al., 1995; GILBERT, 2003; WOLPERT, 2008).

Os neuroblastos, passam por divisões assimétricas que geram tanto novos precursores que recomeçam o ciclo, como precursores neurais pós-mitóticos. Os precursores neurais pós-mitóticos não se dividem, e iniciam o processo de diferenciação em neurônio jovem durante a migração para seu local definitivo, participando da formação de uma camada celular

(TAKAHASHI et al., 1995). As primeiras células gliais formadas são as células da glia radial que se expandem e servem como guia durante a migração dos neurônios na formação das camadas celulares (GÖTZ e HUTTNER, 2005). A diferenciação de células progenitoras em neurônios e células da glia envolve a expressão de diferentes genes, fatores de transcrição e ação de sinalizadores em diferentes momentos do desenvolvimento do SNC (ROESSMANN et al., 1980; DAHLSTRAND et al., 1992; MUOTRI e GAGE, 2006). Inicialmente ocorre a diferenciação dos neurônios, seguido pela diferenciação das células da glia (astrócitos e oligodendrócitos) (Figura 2) (SAUVAGEOT e STILES, 2002).

Quando um progenitor neural se diferencia em neurônios, estes apresentam níveis expressivos de proteínas como a proteína nuclear NeuN e as proteínas citoplasmáticas  $\alpha$ -Tubulina e  $\beta$ -Tubulina (MULLEN et al., 1992; KINTNER e KOYANO-NAKAGAWA, 2009; PERSON et al., 2017). A proteína NeuN é encontrada em neuroblastos pós-mitóticos, permanecendo em neurônios diferenciados (MULLEN et al., 1992). As tubulinas, atuam na diferenciação e alongamento dos prolongamentos neurais, que auxiliam no processo de migração durante a formação das camadas celulares (GOZES, 1982). O subtipo  $\beta$ 3 Tubulina é considerado um marcador específico para neurônios jovens (KIRKPATRICK e BRADY, 1999). Na neurogênese inicial, as células da glia radial apresentam em seu citoplasma, níveis expressivos da proteína vimentina que é uma proteína de filamento intermediário (BARRY e MCDERMOTT, 2005). A vimentina também é encontrada em células gliais maduras como os astrócitos, porém para esse tipo celular, são observados níveis mais expressivos da proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillar acid protein*) (LEDUC e ETIENNE-MANNEVILLE, 2017). GFAP é uma proteína de filamento intermediário presente no citoplasma de astrócitos e está envolvida na motilidade e forma dos astrócitos (ENG et al., 1994).

**Figura 2** – Cronologia da diferenciação neuronal e glial no encéfalo de *Gallus domesticus*.



**E:** Dia embrionário; **P:** Dia pós-natal.

Fonte: Adaptado de Domowicz et al. (2011); Van Herck et al. (2012) e Préau et al. (2015).

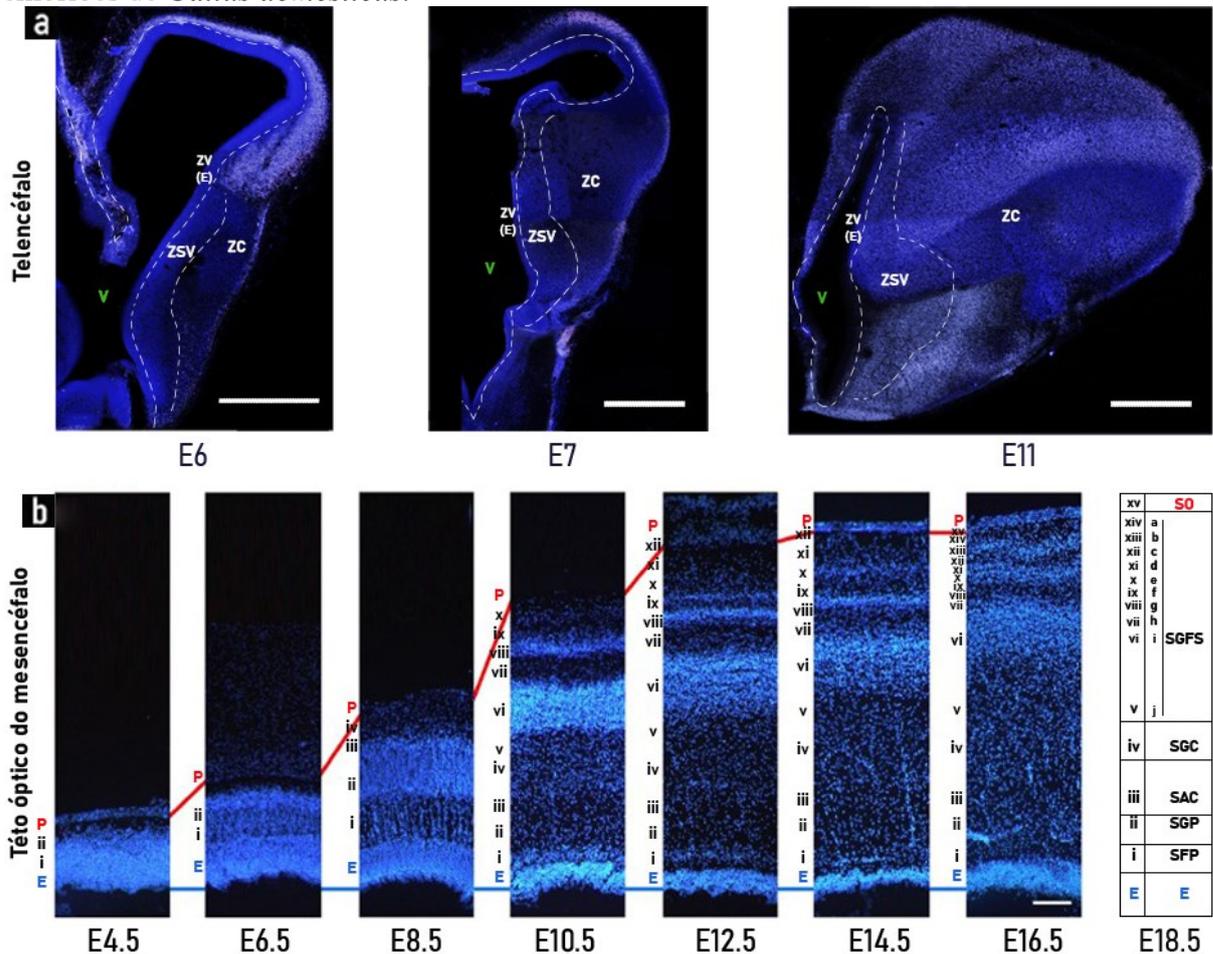
No telencéfalo, as células progenitoras neuroepiteliais na zona ventricular (ZV), também conhecida como camada epêndimária (epêndima), dividem-se simetricamente durante os estágios iniciais do desenvolvimento o que leva à sua expansão para as demais camadas celulares (KRIEGSTEIN et al., 2006). As células progenitoras se dividem e darão origem a progenitores basais que formam uma nova zona proliferativa, chamada de zona subventricular (ZSV). A ZSV é composta por células progenitoras intermediárias e células gliais radiais. Juntas a ZV e ZSV darão origem a neurônios que migram basalmente e se instalam na camada cortical em formação (Figura 3a) (MOLNÁR et al., 2007; SINGH e SOLECKI, 2015; ARAI e TAVERNA, 2017).

No mesencéfalo, localiza-se o teto óptico, um importante centro de integração para informações visuais em vertebrados (GOLDBERG, 1974). O desenvolvimento do teto óptico de *G. domesticus* apresenta três fases distintas e sobrepostas, onde ocorre rápida proliferação de células no neuroepitélio e uma enorme expansão na extensão da superfície do teto. Ocorre migração e crescimento de células do neuroepitélio, bem como processos para formar as camadas celulares do teto. Na sequência, ocorre o rápido crescimento das células em cada camada, a formação de sua estrutura citoarquitetônica definitiva e o estabelecimento de contatos sinápticos funcionais (COWAN et al. 1961; LAVAIL e COWAN, 1971).

A partir das células progenitoras neuroepiteliais, além da camada epêndimária, são formadas 15 camadas celulares no teto óptico do mesencéfalo em *G. domesticus*. As camadas definitivas formadas a partir da camada epêndimária são o stratum fibrosum periventriculare (SFP), o stratum griseum periventriculare (SGP), o stratum album centrale (SAC), o stratum griseum centrale (SGC), o stratum griseum et fibrosum superficiale (SGFS) dividido em 5 subcamadas e, o stratum opticum (SO) (Figura 3b) (LAVAIL e COWAN, 1971; SCICOLONE et al., 1995).

A interação celular é fundamental durante a migração de células neurais, sendo que essa migração pode ocorrer com auxílio da glia radial como guia ou os neurônios podem utilizar a migração tangencial. A glia radial, é responsável por orientar a migração dos neurônios recém-nascidos na camada epêndimária para outras regiões do SNC, através de seus processos radiais (CAMPBELL e GÖTZ, 2002). Na migração tangencial, os neurônios movimentam-se paralelamente ao ventrículo, formando um agregado de neurônios migratórios, onde todos se encontram aderidos uns aos outros (SOBEIH e CORFAS, 2002; ARAI e TAVERNA, 2017). Ao final do processo migratório, o neurônio passa por modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais para assumir suas funções definitivas (MUOTRI e GAGE, 2006).

**Figura 3** - Desenvolvimento das camadas celulares do telencéfalo e do mesencéfalo em embriões de *Gallus domesticus*.



**a:** Secções coronais do telencéfalo evidenciadas com marcador fluorescente DAPI conforme o dia embrionário (E) do desenvolvimento de *Gallus domesticus*; a linha tracejada indica os limites entre as camadas celulares do telencéfalo; V = ventrículo, ZV = zona ventricular/epêndima, ZSV = zona subventricular, ZC = zona cortical; barra de escalas: 500  $\mu$ m. **b:** Secções transversais do teto óptico do mesencéfalo mostrando o desenvolvimento das camadas celulares evidenciadas com marcador fluorescente DAPI; P = pia-máter, E = epêndima, SFP = Stratum fibrosum periventriculare, SGP = stratum griseum periventriculare, SAC = Stratum album centrale, SGC = Stratum griseum centrale, SGFS = Stratum griseum et fibrosum superficiale, SO = Stratum opticum; barra de escalas: 100  $\mu$ m. Fonte: Adaptado de Cowan et al. (1961); LaVail e Cowan (1971); Watanabe e Yaginuma (2015); García-Moreno et al. (2018).

Durante todo o processo de neurogênese, ocorre uma produção excedente de neurônios, portanto a morte celular programada de neurônios é importante e inerente ao desenvolvimento neural e possibilita a eliminação de células em excesso, além de eliminar os neurônios não funcionais. A morte celular programada, é fundamental para a organização da citoarquitetura do encéfalo em desenvolvimento (PETTMANN e HENDERSON, 1998; BUSS et al., 2006). Níveis expressivos da proteína Caspase 3, indicam neurônios em processos de morte celular,

sendo um dos marcadores utilizados para conformação de morte celular (KRUIDERING e EVAN, 2000).

### 1.3 O EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE VERTEBRADOS

Logo após o aumento dos casos de microcefalia no Brasil, o Zika vírus foi rapidamente identificado como o provável agente disruptor responsável pela ocorrência desta anomalia congênita. No entanto, a infecção por Zika vírus não foi detectada em todos os casos de microcefalia (ALBUQUERQUE et al., 2016; EVANS et al., 2017). Em casos de cidades infestadas pelo mosquito do gênero *Aedes*, o larvicida de PPF é amplamente utilizado em reservatórios de água potável e, a exposição direta da população ao larvicida, leva à suspeita de ligação com os casos de microcefalia (DIVE, 2014; VAZQUEZ, 2016).

Segundo relatórios publicados pela OMS nos anos de 2006, 2008 e 2017, os testes iniciais disponíveis do PPF realizados na década de 1980, fornecem evidências de possíveis riscos de neurotoxicidade no desenvolvimento. A neurotoxicidade é a capacidade de substâncias exógenas ou endógenas causarem efeitos químicos, estruturais e funcionais sobre a atividade normal do SNC. Durante o desenvolvimento embrionário o SNC apresenta-se mais susceptível aos efeitos de diferentes substâncias, tais como o PPF (COSTA et al., 2017).

Na década de 1980, testes sobre a toxicidade do PPF em indivíduos adultos utilizando camundongos, ratos, coelhos e cães, demonstraram diferentes respostas conforme o grupo animal estudado. Em camundongos, ratos e cães observou-se aumentos no peso do fígado e alterações nas concentrações plasmáticas de lipídios; em coelhos observou-se irritação ocular, e baixa toxicidade dérmica; em camundongos foi observado aumento das taxas de mortalidade, alterações histopatológicas nos rins e diminuição do peso corporal (SAEGUSA et al., 1988a). Em filhotes de ratos, observou-se redução na massa cerebral e distúrbios do desenvolvimento neurológico com evidências de microcefalia (SAEGUSA et al., 1988a).

Os efeitos celulares e moleculares dos análogos ao hormônio juvenil, como o PPF, no desenvolvimento de vertebrados, sobretudo, no que diz respeito à neurotoxicidade não estão totalmente elucidados. Porém, alguns estudos relatam a interação entre o receptor do hormônio juvenil e receptor de ácido retinóico em mamíferos, devido ao compartilhamento de algumas vias biossintéticas desses metabólitos e a similaridade entre os receptores nos insetos e

mamíferos (PALLI et al., 1991; HARMON et al., 1995; COTGREAVE et al., 2016). O hormônio juvenil e o ácido retinóico atuam em processos do desenvolvimento embrionário e pós-embrionário em insetos e vertebrados, respectivamente (EFSA, 2009). O hormônio juvenil atua no controle da metamorfose e reprodução em insetos (HATAKOSHI et al., 1987) e o ácido retinóico está envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso dos vertebrados (RHINN e DOLLE, 2012).

Essas duas classes de moléculas compartilham algumas semelhanças, e são capazes de ter alguma reatividade cruzada. A ligação de um análogo ao hormônio juvenil, como o PPF, com o receptor do ácido retinóico, pode ativar o receptor em momentos inadequados no desenvolvimento ou atuar como um bloqueador que impede o ácido retinóico de se ligar ao seu receptor, e como o receptor do ácido retinóico normalmente ativa a expressão gênica no desenvolvimento embrionário, alterações podem levar a anormalidades no desenvolvimento (NEMEC, 1993; EVANS et al., 2017).

A reação cruzada entre o análogo ao hormônio juvenil com o receptor do ácido retinóico em vertebrados, foi observada com o uso do metopreno, um outro larvicida análogo do hormônio juvenil. Altas doses de metopreno causaram efeitos teratogênicos em estudos realizados durante a embriogênese em camundongos (UNSWORTH, 1974; HARMON et al., 1995). Em invertebrados foi observada reação cruzada entre o ácido retinóico e receptores de hormônio juvenil atuando na metamorfose de *Manduca sexta* (PALLI et al., 1991). Portanto, o impacto nos retinóides pela reação cruzada com diferentes análogos do hormônio juvenil durante o desenvolvimento de vertebrados pode produzir efeitos diferentes, incluindo a morte do indivíduo, retardo de crescimento, distúrbios funcionais e anomalias congênitas em vertebrados (COLLINS, 1999).

Os dados toxicológicos do PPF têm sido extensivamente estudados em espécies de invertebrados com o objetivo de avaliar sua ação sobre o desenvolvimento de larvas, sobretudo em vetores de doenças a fim de reduzir os casos de Dengue, Chikungunya e Zika vírus (GHASEMI et al., 2010; LEGRAND et al., 2017). Embora alguns efeitos causados em vertebrados já tenham sido descritos, estudos avaliando os efeitos de análogos ao hormônio juvenil, como o PPF, só voltaram a ser realizados nesses organismos devido ao aumento dos casos de microcefalia no Brasil. Entretanto, estudos em vertebrados *in vivo* são mais escassos, sendo alguns destes realizados em embriões de peixes das espécies *Danio rerio*, *Hoplosternum littorale* e *Rhamdia quelen* e em girinos das espécies *Odontophrynus americanus* e *Xenopus laevis* (Quadro 1).

**Quadro 1** - Relação de artigos publicados de 2016-2019 sobre pesquisas em que vertebrados foram utilizados na avaliação da toxicidade do larvicida PPF.

<b>Organismo</b>	<b>Estágio de vida</b>	<b>Análises realizadas</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
Peixe zebra ( <i>D. rerio</i> )	Embrião; larva	Comportamento do embrião e larval; morfologia da cabeça	Aumento dos defeitos craniofaciais e alterações comportamentais	Truong et al. (2016)
Peixe zebra ( <i>D. rerio</i> )	Embrião	Sobrevivência; morfologia corporal, cabeça e encéfalo	Redução da sobrevivência	Dzieciolowska et al. (2017)
Peixe zebra ( <i>D. rerio</i> )	Embrião; larva	Mortalidade; taxa de eclosão; morfologia corporal	Eclosão tardia, edema, aumento da curvatura corporal	Horie et al. (2017)
Rã-de-unhas-africana ( <i>X. laevis</i> )	Girino	Sobrevivência; comportamento; análise de metabólitos	Metabólitos encontrados no fígado e trato gastrointestinal	Ose et al. (2017)
Peixe Tamoatá ( <i>H. littorale</i> )	Juvenil	Atividade enzimática da acetilcolinesterase no encéfalo	Inibição moderada da atividade da acetilcolinesterase	Araújo et al. (2018)
Peixe Jundiá ( <i>R. quelen</i> )	Embrião; larva	Taxa de eclosão; sobrevivência; análise de deformidades morfológicas	Redução de sobrevivência; aumento de deformidades abdominal e cefálica	Azevedo-Linhares et al. (2018)
Rato Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Adulto	Análise da atividade motora do intestino	Redução na contração do duodeno	Chłopecka et al. (2018)
Peixe zebra ( <i>D. rerio</i> )	Embrião	Ensaio antioxidantes e bioquímicos; análises histopatológicas do coração	Deformidades no desenvolvimento do coração; aumento de apoptose e dano ao DNA	Maharajan et al. (2018)
Rã-de-unhas-africana ( <i>X. laevis</i> )	Girino	Mobilidade; morfologia da cabeça; análise de expressão de genes e proteínas no encéfalo	Redução do tamanho da cabeça e mobilidade do girino; atraso no desenvolvimento	Spirhanzlova et al. (2018)
Sapo-boi-mocho ( <i>O. americanus</i> )	Girino	Atividade enzimática e hormonal; função cardíaca; comportamento	Atividades enzimáticas e hormonais reduzidas; aumento da frequência cardíaca	Lajmanovich et al. (2019)
Rato Sprague Dawley ( <i>R. norvegicus</i> )	Adulto	Análise de metabólitos no fígado; análise da proliferação, apoptose e dano ao DNA	Aumento de apoptose e dano ao DNA nos hepatócitos causado pelo PPF e seus metabólitos	Liu et al. (2019)
Camundongo ( <i>Mus musculus</i> )	Adulto	Análise do peso corporal e gônadas; análises histopatológicas dos testículos	Redução no peso corporal; danos à arquitetura testicular	Shahid et al. (2019)

Palavras-chave utilizadas: embryo AND/OR development AND/OR vertebrate AND/OR pyriproxyfen.  
Fonte: PubMed.com e ScienceDirect.com (2019).

É conhecido que diferentes espécies quando expostas a uma mesma substância química, sob os mesmos parâmetros experimentais, apresentam respostas diferenciadas pós exposição. E diferentemente dos dados já publicados avaliando a exposição do larvicida PPF em mamíferos, anfíbios e peixes, não se observa na literatura dados que avaliem o efeito do PPF no desenvolvimento embrionário de aves como modelo de estudo em vertebrados.

#### 1.4 O USO DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus* EM ESTUDOS DE EMBRIOTOXICIDADE

Embriões de galinha, *G. domesticus*, têm sido utilizados em estudos do desenvolvimento embrionário, devido a sua complexidade morfológica que se assemelha com outros vertebrados nos estágios iniciais do desenvolvimento (SCHOENWOLF, 2009). Muitos estudos utilizando embriões *G. domesticus* favoreceram descobertas no campo da biologia do desenvolvimento, as quais têm relevância para outros vertebrados e corroboraram para a compreensão do desenvolvimento de mamíferos (WOLPERT et al., 2008; BELLAIRS e OSMOND, 2014).

Dentre os fatores que contribuíram para o estabelecimento do embrião de *G. domesticus* como organismo modelo, estão a facilidade na manipulação de ovos fertilizados, bem como a fácil observação dos embriões, visto que estes podem ser observados realizando uma pequena abertura na casca do ovo para acompanhamento diário em laboratório (WOLPERT et al., 2008; GILBERT, 2003). A ausência de interferências maternas durante o desenvolvimento do embrião que ocorre em ovo e o tempo de desenvolvimento de 21 dias permitem uma avaliação experimental relativamente rápida e objetiva das etapas do desenvolvimento (MOODY, 1999).

O sequenciamento do genoma de *G. domesticus* finalizado em 2004 (HILLIER et al., 2004) e disponível em bancos de dados como o NCBI (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=gallus+gallus>) e *Geisha* (<http://geisha.arizona.edu/geisha/>) possibilitou ainda mais, a realização de estudos pelas ferramentas de análises moleculares.

O embrião representa um dos estágios mais vulneráveis dentro do ciclo de vida, sendo mais suscetível à ação de agentes tóxicos, os quais podem alterar o desenvolvimento normal e interferir nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos (SCHOENWOLF, 2009; WOLPERT et al., 2008; RIVERO et al., 2006). A exemplo, pode-se citar os estudos que avaliam o desenvolvimento do SNC de embriões de *G. domesticus* frente à exposição de agentes

tóxicos, a fim de extrapolar esses resultados para modelos em mamíferos (GOODFELLOW et al., 2016; ZHENG et al., 2014).

Sendo assim, com intuito de contribuir com os conhecimentos sobre os efeitos do larvicida PPF, durante o desenvolvimento do SNC e que este aspecto tem sido pouco estudado em modelos vertebrados, a utilização de embriões de *G. domesticus* como modelo experimental é válida, sendo esses dados relevantes para a academia, ciência e saúde pública.

Diante do tema exposto, a presente dissertação aborda o efeito das concentrações de PPF e como elas interferem na morfometria do embrião, da região cefálica, do encéfalo, das vesículas encefálicas e suas camadas celulares, bem como na densidade de células e viabilidade celular, no processo de ossificação da região cefálica e também no conteúdo de proteínas ligadas a proliferação, diferenciação, morte celular e dano ao DNA durante o desenvolvimento do encéfalo de embriões de *G. domesticus*.

Propõem-se como hipótese de trabalho, que o PPF induz neurotoxicidade por meio da (i) redução nas morfometrias do embrião, da região cefálica, do encéfalo e das vesículas encefálicas (telencéfalo e mesencéfalo) que por sua vez causa (ii) redução na espessura das camadas celulares do telencéfalo e mesencéfalo, e consequentemente (iii) redução na densidade numérica de células por área das camadas celulares, e (iv) redução da viabilidade celular do encéfalo. A redução das morfometrias do encéfalo é causada pela (v) redução nos eventos de proliferação celular e diferenciação neural; (vi) aumento nos eventos de morte celular e dano ao DNA; e pelo (vii) aumento dos centros de ossificação na cabeça interferindo no desenvolvimento do encéfalo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito neurotóxico do larvicida PPF, através da análise de parâmetros macromorfológicos dos embriões e micromorfológicos das vesículas encefálicas, utilizando *Gallus domesticus* como modelo de estudo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a curva de sobrevivência dos embriões expostos a diferentes concentrações de PPF;
- Analisar a morfologia externa e obter as morfometrias do embrião total e da região cefálica;
- Determinar a espessura e densidade de células nas camadas celulares do telencéfalo e mesencéfalo;
- Avaliar a viabilidade das células que compõem o encéfalo, com base no conteúdo de enzimas mitocondriais;
- Investigar o conteúdo de proteínas envolvidas na proliferação celular, diferenciação neural, morte celular e dano ao DNA no encéfalo.
- Avaliar os processos de ossificação intramembranosa e endocondral durante a formação da cabeça;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

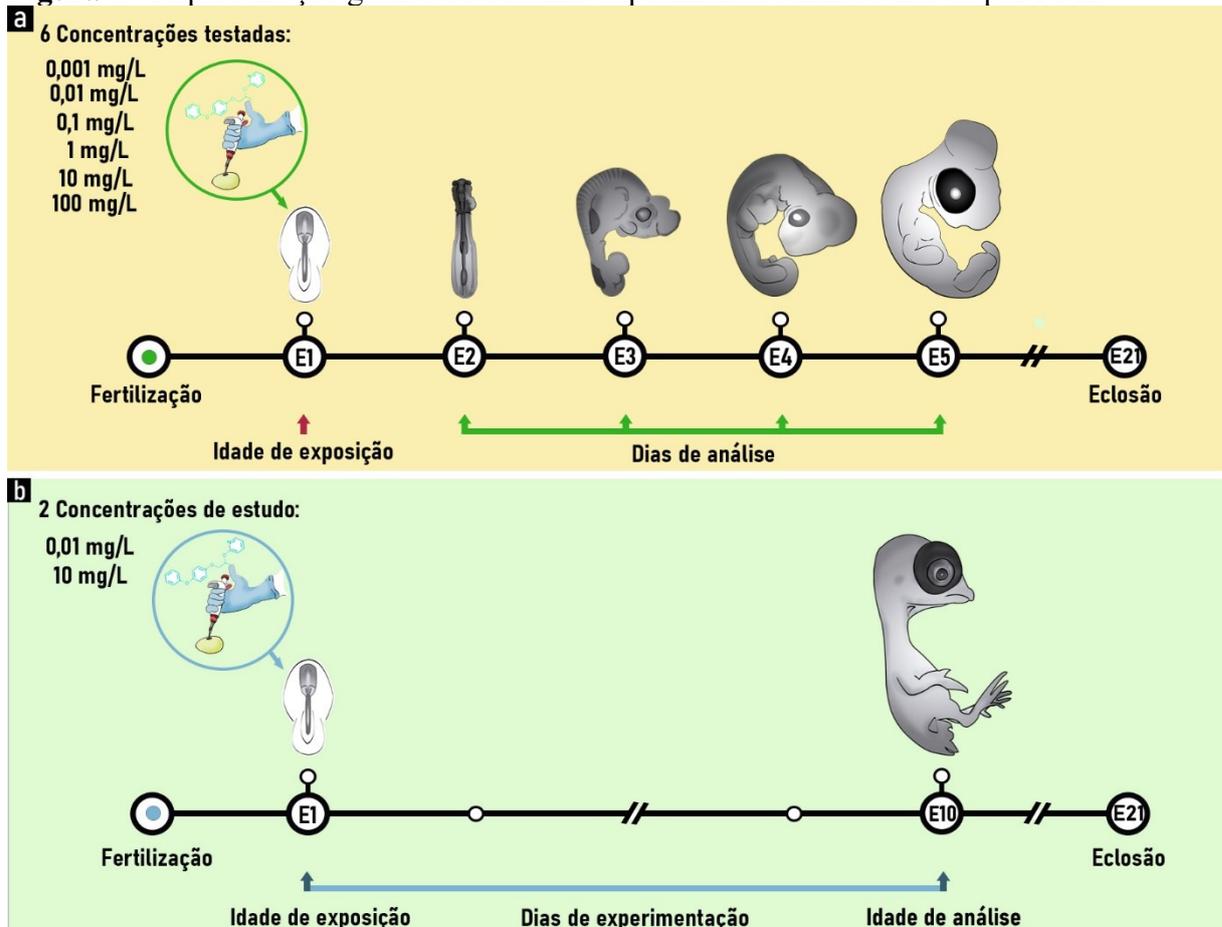
Os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados em duas etapas:

A etapa I foi realizada com a curva de sobrevivência, sendo testadas 6 concentrações de PPF: 0,001 mg/L (concentração 10 x menor do que a CMP); 0,01 mg/L (CMP em reservatórios de água potável); 0,1 mg/L; 1 mg/L; 10 mg/L e 100 mg/L (Figura 4a).

A etapa II, foi conduzida a partir dos resultados obtidos na curva de sobrevivência, sendo testadas duas concentrações de PPF: 0,01 mg/L e 10 mg/L (Figura 4b).

Nas duas etapas, para o controle foi utilizado DMSO em solução salina a 0,9%.

**Figura 4** - Representação gráfica do desenho experimental utilizado nas etapas I e II.

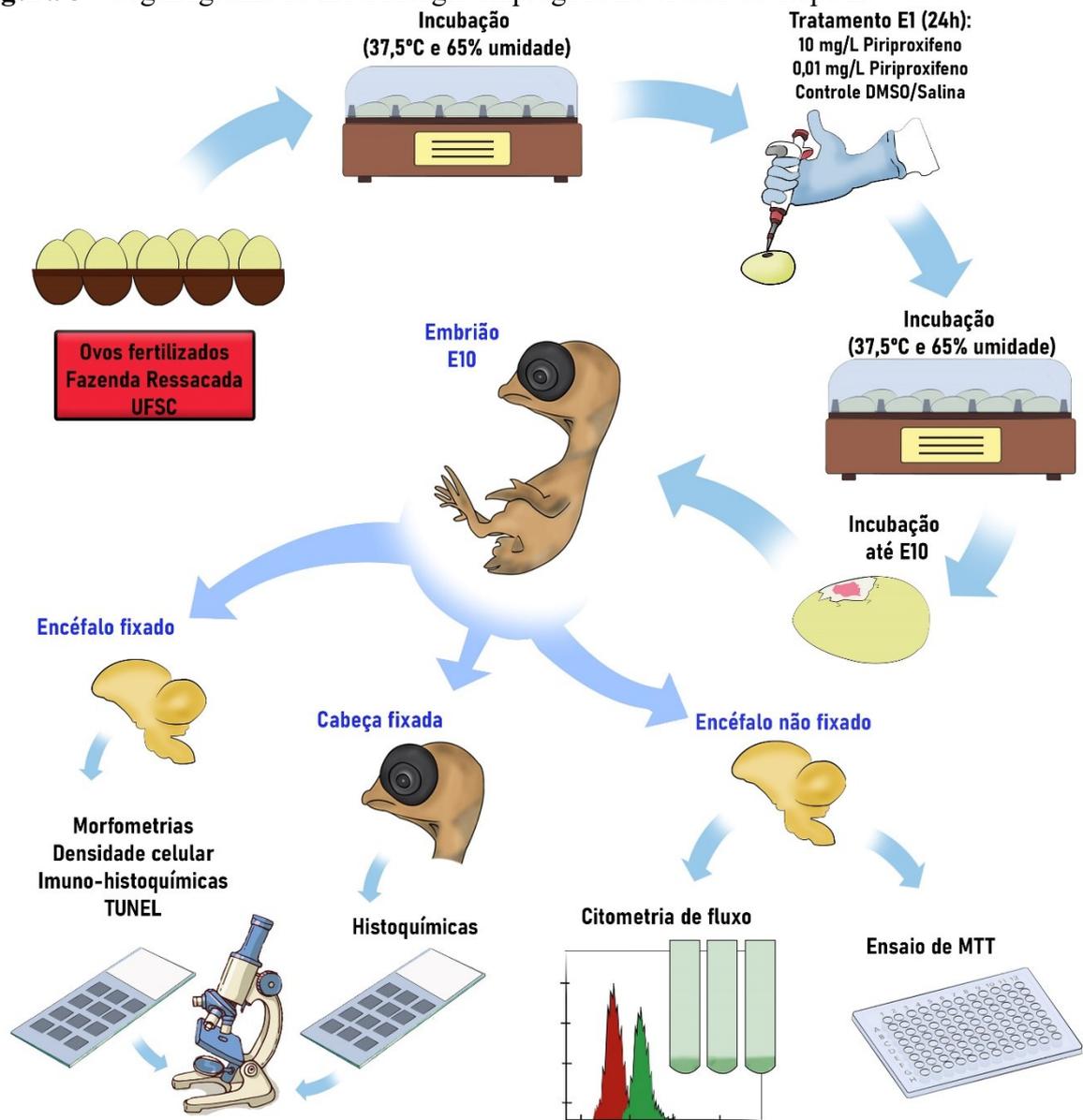


**a:** Desenho experimental utilizado na curva de sobrevivência (Etapa I). **b:** Desenho experimental utilizado nas análises de microscopia de luz, citometria de fluxo e ensaio de MTT (Etapa II). E=: Dia embrionário.

Fonte: O autor (2019).

A metodologia utilizada na etapa II está representada em um organograma (Figura 5) que demonstra de forma geral os procedimentos utilizados para a obtenção dos resultados no presente trabalho.

**Figura 5** - Organograma da metodologia empregada no estudo da etapa II.



Os embriões foram expostos ao PPF na idade embrionária (E1), sendo a exposição realizada *in ovo*. Em E10, os embriões foram removidos dos ovos e fixados. Os encéfalos foram dissecados e destinados para técnicas histológicas, imuno-histoquímicas e método de TUNEL. As cabeças foram dissecadas e destinadas para a técnica de histoquímica. Os encéfalos não fixados foram dissecados e destinados para as técnicas de citometria de fluxo e ensaio de MTT. Os ovos foram obtidos na Fazenda Ressacada - CCA - UFSC, os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) e no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).

### 3.2 OBTENÇÃO DOS OVOS FERTILIZADOS DE *Gallus domesticus*

Ovos fertilizados de galinha doméstica da raça Hy-Line Brown foram utilizados como modelo experimental para investigar os efeitos do larvicida PPF sobre o SNC. Ovos fertilizados foram obtidos por doação da Fazenda Experimental da Ressacada do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC de Florianópolis/SC. No Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - LRDA, no Centro de Ciências Biológicas - CCB da UFSC, os ovos foram higienizados com algodão seco, numerados aleatoriamente e divididos para realização das etapas I e II. Os ovos foram colocados em incubadora Golden® em condições controladas de temperatura (37,5°C) e umidade (65%).

A utilização de embriões como modelo de estudo e os demais procedimentos adotados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFSC nº 5843231018. As análises propostas nesta metodologia foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - LRDA e no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB / CCB / UFSC.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Como não foram encontrados estudos avaliando o efeito do PPF no desenvolvimento embrionário de *G. domesticus*, foi realizada a análise da sobrevivência dos embriões expostos ao PPF, por meio de uma curva de sobrevivência de 96h, baseada na metodologia de DeLean et al. (1978).

A partir da formulação química do produto Pyriproxyfen Pestanal™ (Sigma-Aldrich®) com teor de pureza  $\geq 98.0\%$ , foi preparada uma solução estoque de PPF dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (ARAÚJO et al., 2018) na concentração de 900 mg/L. As diluições da solução estoque de PPF foram feitas em solução salina 0,9% para obter as concentrações de exposição por diluição em série (10 X). Para o grupo controle foi utilizado 1 mL de DMSO diluído em 50  $\mu$ L de solução salina a 0,9%.

Foram utilizadas 6 concentrações de PPF, sendo: 0,001 mg/L ( $n = 22$  embriões), 0,01 mg/L ( $n = 21$  embriões), 0,1 mg/L ( $n = 21$  embriões), 1 mg/L ( $n = 22$  embriões), 10 mg/L ( $n = 22$  embriões), 100 mg/L ( $n = 22$  embriões) e o grupo controle ( $n = 21$  embriões). O valor de  $n$  corresponde ao número total de embriões utilizados para cada concentração.

As concentrações de PPF foram administradas *in ovo* após 24 h de incubação, que corresponde ao primeiro dia embrionário (E1). Os ovos foram perfurados na região da câmara de ar com auxílio de uma seringa esterilizada para aspiração de cerca de 1 mL de albúmen, a fim de permitir a abertura da casca sem correr o risco de atingir o embrião durante esse procedimento e facilitar o contato do embrião com as concentrações a serem pipetadas. Após a retirada do albúmen, a abertura foi selada com fita adesiva atóxica. Na região superior do ovo foi realizada uma abertura aproximada de 1 cm com o auxílio de uma pinça e as soluções de estudo foram pipetadas sobre o embrião no volume final de 50 µL. A abertura do ovo foi selada com fita adesiva transparente atóxica, sendo os ovos devolvidos para a incubadora.

Durante a incubação, a sobrevivência dos embriões foi observada a cada 24 h durante o período de 96 h, até o quinto dia embrionário (E5) (Figura 4a). Os embriões foram considerados vivos quando os batimentos cardíacos eram visualizados ao estereomicroscópio.

### 3.4 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A partir dos resultados da curva de sobrevivência foram definidos 3 grupos experimentais:

- 10 mg/L de PPF (10 mg de PPF solubilizados em 1 mL de DMSO), diluído em 50 µL de solução salina a 0,9% ( $n = 80$  embriões);
- 0,01 mg/L de PPF (0,01 mg de PPF solubilizados em 1 mL de DMSO), diluído em 50 µL de solução salina a 0,9% ( $n = 80$  embriões);
- Controle (1 mL de DMSO) diluído em 50 µL de solução salina a 0,9% ( $n = 51$  embriões).

O PPF foi administrados *in ovo* em E1, estágio do desenvolvimento em que o tubo neural começa a ser formado e as células do neuroepitélio estão em processo de proliferação (LAVAIL e COWAN, 1971). Os embriões permaneceram na incubadora até o décimo dia embrionário (E10). A idade de análise (E10) foi escolhida, pois as vesículas encefálicas secundárias já estão formadas, sendo o telencéfalo e o mesencéfalo bem evidentes (LAVAIL e COWAN, 1971) (Figura 4b).

Em E10, os embriões foram retirados da incubadora, crióanestesiados a 4°C por 15 min e removidos dos ovos e das membranas extraembrionárias com auxílio de tesoura e pinça. Os embriões foram lavados em solução salina a 0,9% e visualizados em estereomicroscópio (70 X) para observação das estruturas morfológicas externas e confirmação da idade embrionária E10, baseando-se no estagiamento proposto por Hamburger e Hamilton (SANES, 1992). Os

embriões destinados às análises por microscopia foram fixados em formaldeído a 10% por 48 h e após, conservados em etanol a 70%.

Foram registradas as informações referentes às taxas de mortalidade e anomalias congênitas, observadas quando os embriões foram retirados do ovo.

- Taxa de mortalidade (%):  $n^{\circ}$  indivíduos mortos /  $n^{\circ}$  ovos incubados x 100.

- Taxa de anomalias congênitas (%):  $n^{\circ}$  indivíduos com anomalias /  $n^{\circ}$  ovos incubados x 100.

Os embriões com anomalias congênitas não foram incluídos nas análises seguintes.

### 3.5 MORFOMETRIA TOTAL DOS EMBRIÕES

Para a análise do comprimento corporal (mm), logo após retirados do ovo, os embriões foram medidos com auxílio de paquímetro digital Digimess. O comprimento total do embrião foi definido pela medida céfalo-caudal. Em 10 repetições/incubações distintas foram utilizados para o grupo controle ( $n = 38$  embriões), 0,01 mg/L ( $n = 55$  embriões) e 10 mg/L ( $n = 55$  embriões).

Para a obtenção da massa corporal (mg), em balança de precisão Ohaus (0,1 mg) foram utilizados os embriões conservados em etanol a 70%. Após, o encéfalo foi dissecado ao estereomicroscópio com auxílio de pinça e tesoura, sendo sua massa aferida em balança de precisão. Em 10 repetições/incubações de ovos distintas, para a massa corporal e a massa do encéfalo foram utilizados para o grupo controle ( $n = 26$  embriões), 0,01 mg/L ( $n = 55$  embriões) e 10 mg/L ( $n = 55$  embriões).

### 3.6 MORFOMETRIA EXTERNA DA REGIÃO CEFÁLICA

As morfometrias externas da região cefálica dos embriões nos diferentes grupos experimentais foram realizadas logo após a retirada dos embriões dos ovos, com base nas descrições de Kobus (2007) (Quadro 2). Foram realizados registros fotográficos da cabeça dos embriões por meio de estereomicroscópio Olympus FZH10 com câmera acoplada, sendo as morfometrias realizadas com auxílio do programa ImageJ<sup>®</sup>. Em 6 repetições/incubações distintas, para a morfometria externa da região cefálica foram utilizados para o grupo controle ( $n = 25$  embriões), 0,01 mg/L ( $n = 37$  embriões) e 10 mg/L ( $n = 38$  embriões).

**Quadro 2** - Descrição das morfometrias externas da região cefálica realizadas em embriões de *Gallus domesticus*.

Morfometrias	Localização	Ilustração das medidas
(1) Distância cefálica ântero-posterior	Medida externa entre a extremidade anterior do olho próxima ao bico até a extremidade posterior do mesencéfalo.	 <p>Fonte: Adaptado de Hamburger e Hamilton (1951)</p>
(2) Distância cefálica transversal	Medida externa entre o teto do mesencéfalo até a altura da faringe.	
(3) Altura cefálica	Medida externa entre o topo do telencéfalo até a altura da faringe.	

### 3.7 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os embriões em E10 foram dissecados a fim de obter a cabeça e o encéfalo. Após dissecados, os encéfalos foram desidratados em uma série crescente de etanol a 70% - 90% por 1 h e 10 min, e dois banhos de etanol a 100% por 2 h cada, diafanizados em xilol : etanol a 100% (1 : 1) por 5 min e dois banhos de xilol por 5 min cada. Foram realizados três banhos para a inclusão dos encéfalos em parafina em temperatura de 57°C por 1 h cada. As peças foram emblocadas e após a solidificação da parafina, foram seccionadas em micrótomo rotativo Olympus Cut 4055. Foram realizadas secções transversais no encéfalo na espessura de 6 µm. As secções foram dispostas em lâminas histológicas gelatinizadas. Todos as secções dos grupos experimentais foram distribuídas na mesma lâmina, a fim de serem submetidas às mesmas condições de processamento das técnicas para microscopia de luz.

As cabeças foram dissecadas e desidratadas em série crescente de etanol a 70% - 90% por 1 h e 50 min e dois banhos de etanol a 100% por 3 h e 45 min e diafanizados em xilol por 45 min. Foram realizados três banhos para a inclusão das cabeças em parafina em temperatura de 57°C por 1 h cada. Em micrótomo rotativo, foram realizadas secções coronais da cabeça na espessura de 8 µm. As secções foram dispostas em lâminas gelatinizadas e todos os grupos experimentais distribuídos na mesma lâmina.

O encéfalo dos embriões foi destinado para a morfometria do encéfalo, das vesículas encefálicas e das camadas celulares, para o cálculo da densidade numérica de células por área (NA), para a técnica de imuno-histoquímica e para o método de TUNEL (do inglês *TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*). A cabeça dos embriões foi destinada para as técnicas histoquímicas.

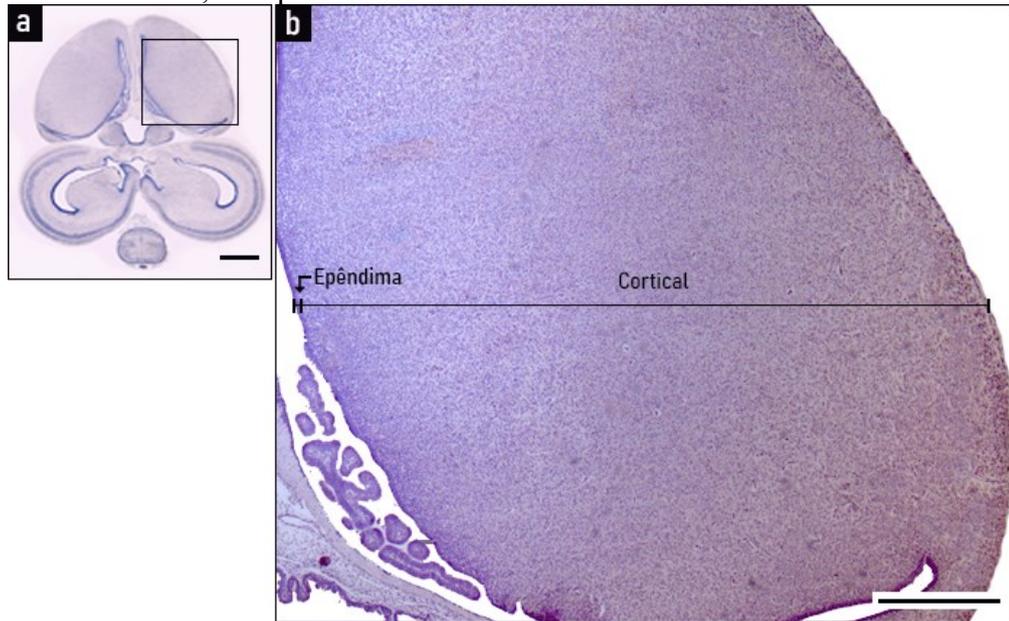
### 3.7.1 Morfometria do Encéfalo, das Vesículas Encefálicas e das Camadas Celulares

As secções foram desparafinizadas em dois banhos de xilol por 10 min cada, reidratadas em série etanólica decrescente (100% - 70%) por 50 min, lavadas com água corrente por 5 min, imersas em Hematoxilina por 1 min e 15 seg, lavadas novamente com água corrente por 5 min, imersas em Eosina por 20 seg e lavadas com água destilada por 5 min. Foram desidratadas em série etanólica crescente (70 – 100%) por 50 min e submetidas a dois banhos de xilol por 5 min cada. As lâminas foram finalizadas com meio de montagem Entellan<sup>®</sup> e lamínula.

As morfometrias do encéfalo, das vesículas encefálicas e a organização das camadas celulares do telencéfalo e do teto óptico do mesencéfalo foram obtidas a partir das secções coradas com hematoxilina-eosina (HE). As imagens das secções foram captadas por câmera acoplada ao microscópio de luz Olympus BX 41 com câmera digital acoplada de 3.3 megapixel Q-imaging (aumentos de 100 X, 200 X e 400 X) (LAMEB) e pelo digitalizador de lâminas Axio Scan.Z1 Zeiss (aumentos de 10 X – 400 X) (LAMEB) e as morfometrias avaliadas com o auxílio do software ImageJ<sup>®</sup>. Em 3 repetições/incubações distintas, para as morfometrias do encéfalo, das vesículas encefálicas e das camadas celulares foram utilizados para o grupo controle ( $n = 9$  encéfalos), 0,01 mg/L ( $n = 9$  encéfalos) e 10 mg/L ( $n = 9$  encéfalos).

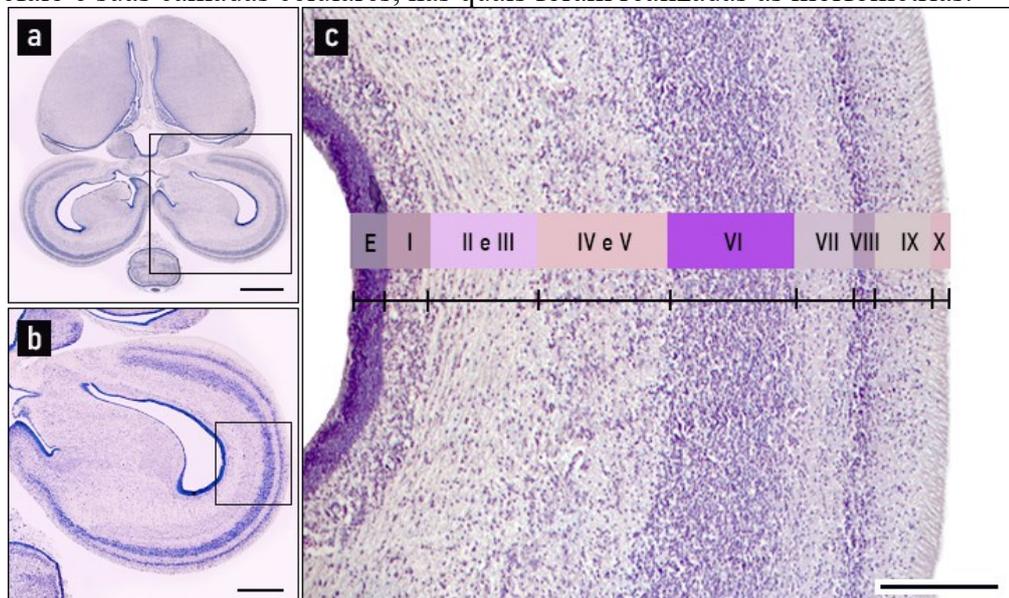
Foram realizadas medidas do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) e largura ( $\mu\text{m}$ ) para o encéfalo total. Para as morfometrias na região do telencéfalo (hemisfério cerebral direito) foram realizadas medidas da altura ( $\mu\text{m}$ ) e largura ( $\mu\text{m}$ ). Foram realizadas as morfometrias da camada epêndimária e a camada cortical (Figura 6). Para as morfometrias na região do mesencéfalo foram realizadas medidas da altura ( $\mu\text{m}$ ) e largura ( $\mu\text{m}$ ), medidas da região rostral ( $\mu\text{m}$ ), medidas da região caudal ( $\mu\text{m}$ ) e medidas da região do teto óptico do mesencéfalo ( $\mu\text{m}$ ). Foram realizadas as morfometrias da camada epêndimária e das 10 camadas celulares do teto óptico do mesencéfalo que são identificadas em embriões de *G. domesticus* na idade embrionária E10, segundo a descrição de LaVail e Cowan (1971) (Figura 7).

**Figura 6** - Secções histológicas do encéfalo de *Gallus domesticus*, destacando o telencéfalo e suas camadas celulares, nas quais foram realizadas as morfometrias.



**a:** Secção histológica transversal do encéfalo, barra de escala: 1000 µm; **b:** Aumento evidenciando a região do telencéfalo. A barra horizontal indica o local onde as morfometrias foram realizadas e as barras verticais indicam os limites entre as camadas do telencéfalo, barra de escala: 500 µm. Coloração: HE. Fonte: O autor (2019).

**Figura 7** - Secções histológicas do encéfalo de *Gallus domesticus*, destacando o teto óptico do mesencéfalo e suas camadas celulares, nas quais foram realizadas as morfometrias.



**a:** Secção histológica transversal do encéfalo, barra de escala: 1000 µm; **b:** Aumento evidenciando a região do mesencéfalo, barra de escala: 500 µm; **c:** Aumento evidenciando a região do teto óptico do mesencéfalo. A barra horizontal indica o local onde as morfometrias foram realizadas e as barras verticais indicam os limites entre as camadas do teto óptico do mesencéfalo, barra de escala: 200 µm. Coloração: HE. Fonte: O autor (2019).

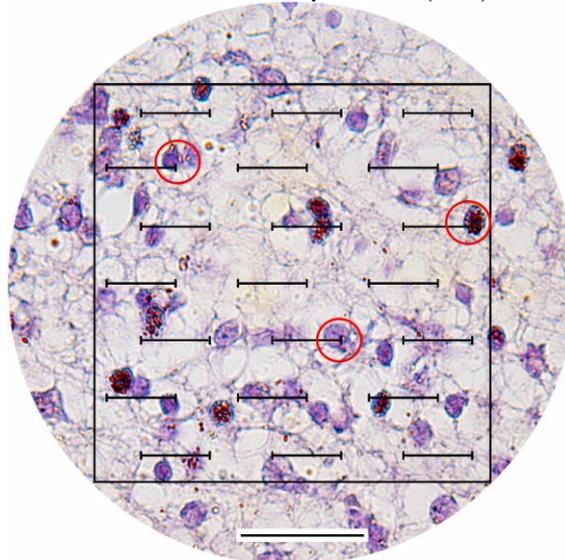
### 3.7.2 Cálculo da Densidade Numérica de Células por Área (NA)

A partir das lâminas coradas com HE, a NA de cada camada celular foi quantificada em microscopia pelo método estereológico, utilizando a gráticula de Weibel nº 2 – M42 (Tonbridge, England) acoplada ao microscópio de luz Olympus CBA (aumento de 1000 X). A gráticula é formada por um sistema que contém 21 linhas ( $d$ ) e 42 pontos em uma área de teste equivalente a  $36,36 \text{ mm} (d^2)$  (WEIBEL et al., 1966).

No telencéfalo, as contagens foram realizadas utilizando 3 campos alternados na camada epêndimária e 10 campos na camada do manto. No mesencéfalo, a contagem foi realizada utilizando 3 campos alternados em camada celular do teto do mesencéfalo. Foram contabilizadas apenas as células que se encontravam localizadas nas extremidades da barra da gráticula (Figura 8).

O cálculo da NA foi realizado através da fórmula  $NA = [n^\circ \text{ de células positivas} / 36,36 * (0,02)^2]$ , onde 36,36 corresponde a área da gráticula e 0,02 corresponde ao fator de correção para o aumento em objetiva de 1000 X (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Em 3 repetições/incubações distintas, para o cálculo da NA foram utilizados para o grupo controle ( $n = 9$  encéfalos), 0,01 mg/L ( $n = 9$  encéfalos) e 10 mg/L ( $n = 9$  encéfalos).

**Figura 8** – Imagem da gráticula de Weibel acoplada à ocular do microscópio de luz utilizada para o cálculo da densidade numérica de células por área (NA).



Posicionamento da gráticula sobre a secção histológica corada com HE do teto do mesencéfalo de *Gallus domesticus*, barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

Fonte: O autor (2019).

### 3.7.3 Marcações Celulares por Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para localizar as proteínas relacionadas aos eventos celulares como proliferação celular, diferenciação neuronal, diferenciação glial, apoptose e dano ao DNA. As secções histológicas foram desparafinizadas, hidratadas em série etanólica decrescente (100% - 70%) e submetidas a um banho de peróxido de hidrogênio/metanol (1:2) para bloqueio de peroxidases endógenas por 15 min. As lâminas foram lavadas com tampão PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) a 1M pH 7,4 duas vezes por 5 min cada, lavadas com PBS a 1M + Triton X-100 a 0,3% por 15 min para permeabilização das membranas celulares e lavadas com FBS (do inglês, *fetal bovine serum*) a 5% em tampão PBS a 1M + Triton X-100 a 0,3% para bloqueio de sítios inespecíficos. Os anticorpos primários utilizados, foram diluídos na proporção (1:100) em FBS a 5% + PBS a 1M + Triton X-100 a 0,3%, e incubados em câmara escura e úmida a 4°C por 12 h (Quadro 3).

Foram realizadas seis lavagens com PBS a 1M + Triton X-100 a 0,3% por 5 min cada. Os anticorpos secundários conjugados à peroxidase correspondentes aos anticorpos primários foram diluídos em FBS a 5% + PBS a 1M + Triton X-100 a 0,3%, e incubados por 4 h a temperatura ambiente (Quadro 4). Foram realizadas seis lavagens com PBS a 1M + Triton X-100 a 0,1% e uma lavagem com PBS a 1M. A revelação das marcações foi realizada com 3-3'-diaminobenzidina (DAB) diluído em PBS a 1M + peróxido de hidrogênio a 10% na proporção (1:1:1). As secções foram desidratadas em série etanólica crescente (70 – 100%), em xilol e as lâminas finalizadas com meio de montagem Entellan® e lamínula. O controle negativo da técnica foi realizado pela substituição do anticorpo primário por PBS a 1M.

Em microscópio invertido Olympus IX83 com câmara digital acoplada de 17 megapixel Olympus DP73 (aumento de 100 X – 1000 X) (LAMEB) foram registradas imagens das regiões do telencéfalo e do mesencéfalo a fim de localizar as marcações por imuno-histoquímica. Para as análises foram utilizados para o grupo controle ( $n = 3$  encéfalos), 0,01 mg/L ( $n = 3$  encéfalos) e 10 mg/L ( $n = 3$  encéfalos).

**Quadro 3** - Anticorpos primários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo para o estudo da proliferação celular, diferenciação neuronal, diferenciação glial, apoptose e dano ao DNA.

Indicação da marcação	Anticorpo primário	Origem da proteína	Espécie desenvolvida	Isotipo	Diluições	
					IH	CF
Proliferação celular	anti-Fosfo-histona H3	Humano	Coelho	IgG	1:100	1:1000
Dano ao DNA	anti- $\gamma$ H2A.X	Humano	Coelho	IgG	1:100	1:1000
Morte celular por apoptose	anti-Caspase 3	Humano	Coelho	IgG	1:100	1:1000
Diferenciação neuronal	anti- $\beta$ 3 Tubulina	Humano	Camundongo	IgG1	1:100	1:1000
Diferenciação glial	anti-GFAP	Humano	Coelho	IgG	1:100	1:1000

As cores no quadro são as mesmas utilizadas nas representações gráficas dos resultados. IH: Imuno-histoquímica; CF: Citometria de Fluxo; IgG: Imunoglobulina G; IgG1: Imunoglobulina G1.

**Quadro 4** - Anticorpos secundários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo para o estudo da proliferação celular, diferenciação neuronal, diferenciação glial, apoptose e dano ao DNA.

Tipo de marcação	Anticorpo secundário	Isotipo	Diluições	
			IH	CF
Colorimétrica	Anti-coelho conjugado à peroxidase	IgG	1:100	-
	Anti-camundongo conjugado à peroxidase	IgG	1:100	-
Fluorescente	Anti-coelho Alexa-fluor 633	IgG	-	1:1000
	Anti-camundongo Alexa-fluor 633	IgG	-	1:1000

IH: Imuno-histoquímica; CF: Citometria de Fluxo. IgG: Imunoglobulina G.

### 3.7.4 Marcações Celulares pelo Método de TUNEL

A análise da marcação de células apoptóticas, foi realizada por meio da identificação da fragmentação do DNA, utilizando o Kit DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL System. As secções foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série etanólica decrescente (100% - 70%). As secções foram lavadas com NaCl a 0,85% por 5 min e por PBS a 1M pH 7,4 por 5 min. Foram permeabilizadas com proteinase K em tampão Tris pH 8,0 e diluída em tampão PBS a 1M na proporção (1:1000). As secções foram lavadas com PBS a 1M por 5 min, fixadas em formaldeído a 4% por 5 min e novamente lavadas com PBS a 1M por 5 min. As secções

foram incubadas com a enzima de marcação do TUNEL em câmara úmida e escura a 37°C por 1 h, segundo recomendações do fabricante. As lâminas foram montadas com Gelmount® com o marcador nuclear fluorescente DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol).

Em microscópio invertido Olympus IX83 com câmera digital acoplada de 17 megapixel Olympus DP73 (aumento de 400 X – 1000 X) (LAMEB) foram registradas imagens das regiões do telencéfalo e do mesencéfalo e realizado contagem direta por campos das marcações por TUNEL. Para as análises do método de TUNEL foram utilizados para o grupo controle ( $n = 4$  encéfalos), 0,01 mg/L ( $n = 4$  encéfalos) e 10 mg/L ( $n = 4$  encéfalos).

### 3.7.5 Análises por Reação Histoquímica

Para a observação das cartilagens e dos centros de ossificação da cabeça, as secções foram desparafinizadas em xilol e hidratados em série etanólica decrescente (100% - 70%) para posterior realização de:

- Histoquímica com Azul de Alcian: utilizada para marcar glicosaminoglicanos, logo adequada para observação de cartilagens e utilizada para verificar a condrogênese na região da cabeça dos embriões em E10. As secções foram lavadas em água corrente e imersas em Azul de Alcian (pH 2,5) por 30 min. Após, as secções foram lavadas com água destilada e passaram por desidratação em série etanólica crescente (70% - 100%), e as lâminas finalizadas com meio de montagem Entellan® e lamínula.

- Histoquímica com Vermelho de Alizarina: utilizada para reconhecer os centros de ossificação na região da cabeça dos embriões em E10. As secções foram lavadas em água corrente e imersas em Vermelho de Alizarina por 3 min. Após, as secções foram lavadas com água destilada e passaram por desidratação em série etanólica crescente (70% - 100%), e as lâminas finalizadas com meio de montagem Entellan® e lamínula.

Foi realizado a coloração com Tricômico de Mallory em lâminas histológicas para controle histológico, a fim de facilitar a localização espacial das lâminas com reação por histoquímica. As secções foram lavadas em água corrente, coradas com Fucsina ácida a 0,5% por 5 min e Tricômico de Mallory por 50 min. Após, as secções passaram por desidratação em série etanólica crescente (90% - 100%), e as lâminas finalizadas com meio de montagem Entellan® e lamínula.

As imagens das secções foram captadas pelo digitalizador de lâminas Axio Scan.Z1 Zeiss (aumentos de 10 X – 400 X) (LAMEB) e a quantificação das marcações por histoquímica

foram realizadas utilizando o sistema de escores, onde os símbolos (- ou +) indicam a intensidade das marcações: ausente (-), fraca (+), moderada (++), intensa (+++) por visualização em microscopia de luz. Para as análises histológicas da cabeça foram utilizados para o grupo controle ( $n = 4$  embriões), 0,01 mg/L ( $n = 4$  embriões) e 10 mg/L ( $n = 4$  embriões).

### 3.8 QUANTIFICAÇÃO DE MARCAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a quantificação de células reativas para as proteínas de interesse (Quadro 3), os mesmos anticorpos utilizados para a técnica de imuno-histoquímica foram utilizados para a citometria de fluxo. Para a técnica, os encéfalos foram dissecados, homogeneizados com pistilo em microtubos e submetidos a lavagens com tampão PBS a 1M pH 7,8 (4°C). O material foi incubado em banho maria a 40°C com Tripsina a 0,25% para dissociação celular durante 30 min, e em seguida incubados com 100 µL de FBS, em agitação a 4°C por 45 min. As amostras foram centrifugadas a 640 X g por 5 min e o sobrenadante foi coletado e incubado com anticorpo primário por 1 h, em seguida foi incubado o anticorpo secundário por 45 min.

As quantificações foram realizadas no Citômetro de fluxo FACSCanto II BD Biosciences (LAMEB). Os dados foram processados e analisados pelo programa Flowing 3.0<sup>®</sup> onde foram analisadas previamente células não marcadas e células marcadas com iodeto de propídeo para a determinação da população celular de interesse. Os gráficos de dispersão obtidos avaliaram 10.000 células (eventos) e as regiões de interesse foram determinadas considerando os parâmetros de dispersão lateral (SSC-A, do inglês *side scatter*) para a complexidade de células e os parâmetros de dispersão frontal (FSC-A, do inglês *forward scatter*) para o tamanho de células. Em 3 repetições/incubações distintas, para as análises de citometria de fluxo foram utilizados para o grupo controle ( $n = 9$  encéfalos), 0,01 mg/L ( $n = 9$  encéfalos) e 10 mg/L ( $n = 9$  encéfalos).

### 3.9 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular no encéfalo foi realizado o ensaio do MTT, Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio, do inglês *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), segundo metodologia desenvolvida por Mosmann (1983). Para a técnica, padronizada conforme o Apêndice A, os encéfalos foram dissecados, homogeneizados com pistilo em microtubos e

submetidos a lavagens com tampão PBS a 1M pH 7,4 (4°C) por 10 min. O material foi centrifugado a 640 X g por 10 min, o sobrenadante do material celular foi coletado e pipetado em uma placa de 96 poços adicionando uma solução de 50 µL de MTT na concentração de 0,5 mg/mL. O material foi incubado a uma temperatura de 37°C durante 30 min. Foi adicionado 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) para solubilizar a formação de cristais de formazan. A análise foi realizada por espectrofotometria com absorvância de 540 nm em multileitora de placas Infinite M200 TECAN (LAMEB). Os resultados dos grupos experimentais 0,01 mg/L e 10 mg/L de PPF foram comparados com os resultados do grupo controle, para o qual foi atribuído 100% de viabilidade. Em 4 repetições/incubações distintas, para as análises de viabilidade celular foram utilizados para o grupo controle ( $n = 16$  encéfalos), 0,01 mg/L ( $n = 16$  encéfalos) e 10 mg/L ( $n = 16$  encéfalos).

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para definir a curva de sobrevivência dos embriões através do método de Kaplan-Meier, foi realizado o teste de Log-rank através do software GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 7.

Para testar a presença de *outliers* nos dados obtidos, foi realizado o teste de Grubbs pelo programa Graphpad *online*. Para avaliar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram analisados por meio do teste de variância de uma via (One - Way ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados não paramétricos foram analisados por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn's ( $p < 0,05$ ). Os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 7.

## 4 RESULTADOS

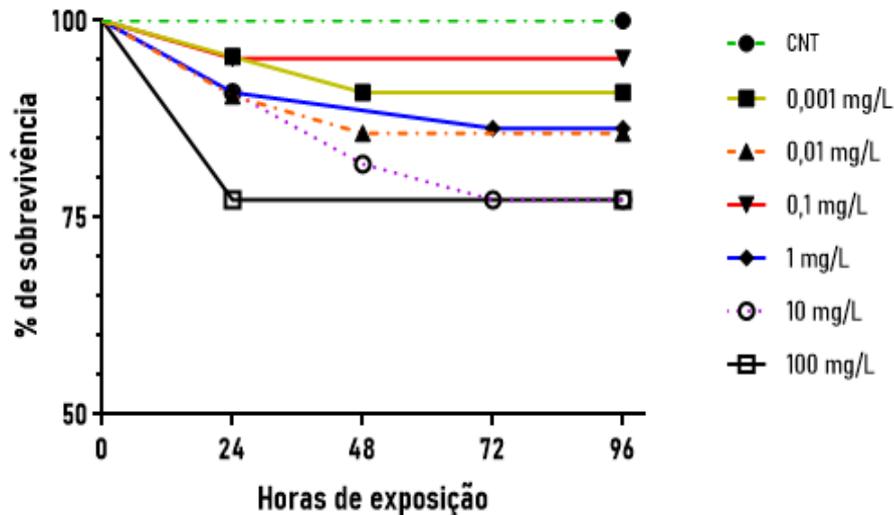
### 4.1 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES

A curva de sobrevivência, realizada na etapa I, através do método de Kaplan-Meier, revelou que os embriões do grupo controle exibiram a taxa mais alta de sobrevivência em comparação com os demais grupos experimentais. A redução da sobrevivência dos embriões expostos às concentrações de PPF, não foram significativamente diferentes em relação ao grupo controle, segundo o teste de Log-rank ( $p = 0,1986$ ) (Figura 9).

Entretanto, após 24 horas de exposição o grupo de embriões exposto à concentração de 100 mg/L apresentou 77% de sobrevivência, resultado esse que permaneceu até o final do experimento, enquanto que 100% de sobrevivência foi observada no grupo controle. O grupo exposto à concentração de 10 mg/L apresentou mortalidade ao longo do experimento, apresentando ao final da análise 77% de sobrevivência. Os grupos expostos às concentrações de 1 mg/L e 0,01 mg/L ao final do experimento apresentaram 85% de sobrevivência, o grupo exposto à concentração de 0,001 mg/L apresentou 90% de sobrevivência e o grupo exposto a concentração de 0,1 mg/L apresentou 95% de sobrevivência.

Devido ao fato dos embriões expostos às concentrações de 10 mg/L e 100 mg/L de PPF apresentarem os mesmos resultados de sobrevivência, optou-se por utilizar a menor concentração (10 mg/L) para observar os efeitos desta concentração nos experimentos realizados posteriormente. A concentração de 0,01 mg/L também foi utilizada nos demais experimentos, pois como já citado, é a concentração máxima de PPF permitida em reservatórios de água potável.

**Figura 9** - Curva de sobrevivência de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



Curva pelo método de Kaplan-Meier evidenciando redução na taxa de sobrevivência (%) nos embriões dos grupos expostos as concentrações de 10 mg/L e 100 mg/L de PPF.

#### 4.2 MORFOLOGIAS E MORFOMETRIAS DOS EMBRIÕES

Durante os experimentos realizados na etapa II, com as duas concentrações testadas e o grupo controle, observou-se que a taxa de mortalidade do grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF foi de 34,30% de um total de 137 ovos incubados, no grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF a taxa de mortalidade foi de 30,93% de um total de 139 ovos incubados e no grupo controle a taxa de mortalidade foi de 29,91% de um total de 117 ovos incubados, dados estes que não diferiram significativamente entre os grupos.

Foram observadas anomalias congênitas relacionadas a alterações visíveis na cabeça dos embriões como anoftalmia, microoftalmia e microcefalia nos grupos experimentais. A taxa de anomalias congênitas observadas no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF foi de 10,78%, no grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF foi de 8,82% e no grupo controle foi de 6,49%. A taxa de anomalias congênitas não foi significativamente diferente entre os grupos experimentais e estes embriões não foram utilizados nas análises seguintes.

Em relação às morfometrias, observou-se que o comprimento (mm) dos embriões não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (Tabela 1). Em relação a massa corporal (mg), os embriões do grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF apresentaram massa reduzida e qual diferiu significativamente do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Em relação a massa do encéfalo (mg), os embriões do grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF

apresentaram massa reduzida, que diferiu significativamente do grupo de 0,01 mg/L ( $p < 0,05$ ) e do controle ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** - Morfometrias realizadas nos embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

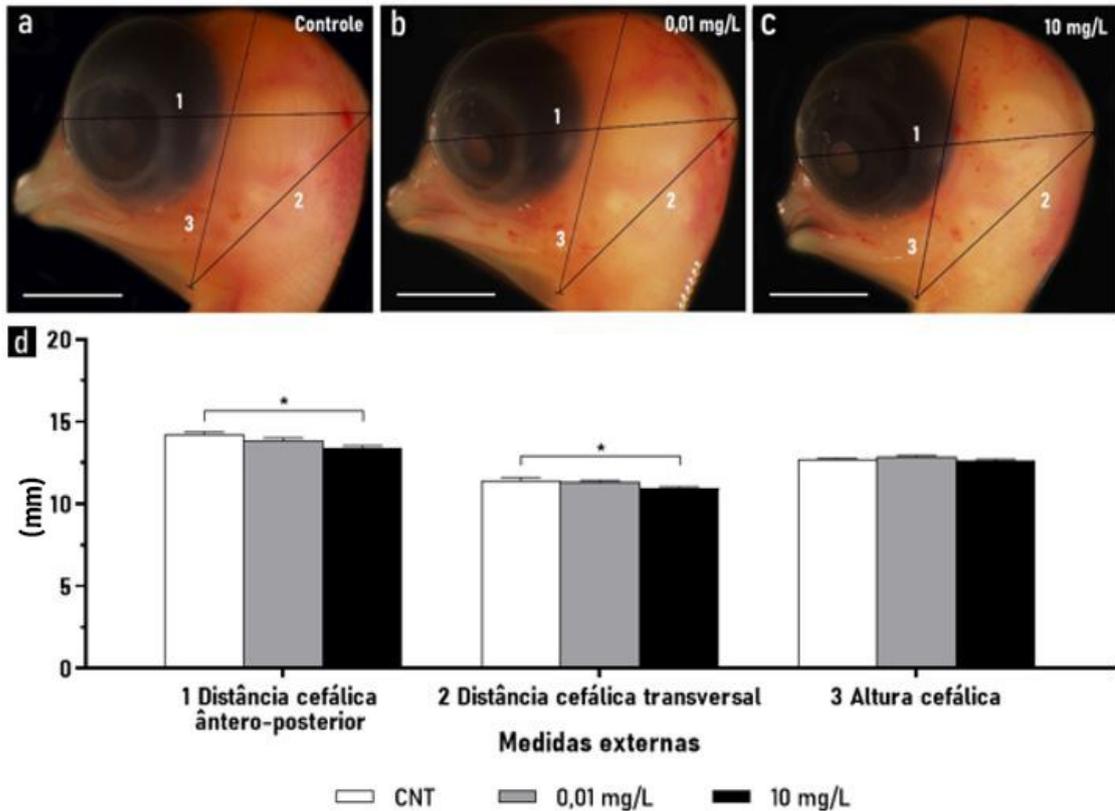
Medidas externas dos embriões		Grupos experimentais			
		Controle	0,01 mg/L	10 mg/L	
1		Comprimento do embrião (mm)	33,6 (± 0,59)	32,63 (± 0,59)	32,41 (± 0,42)
2		Massa corporal (mg)	1877 (± 87,66)	1748 (± 78,55)	1577 (± 68,57) <sup>a*</sup>
3		Massa do encéfalo (mg)	185,2 (± 4,33)	186,5 (± 5,90)	166,5 (± 4,54) <sup>ab*</sup>

Dados estão apresentados em média ± erro padrão da média (EPM); a figura 1 indica a região mensurada, a figura 2 representa o indivíduo mensurado e a figura 3 representa o órgão mensurado; as letras abc indicam os grupos experimentais. As letras ao lado dos valores na tabela indicam de quais o valor difere significativamente; \*  $p < 0,05$ .

Considerando que os embriões do grupo exposto à contração de 10 mg/L de PPF apresentaram reduções na massa do encéfalo, diferindo do grupo controle, optou-se também por avaliar se a exposição ao PPF foi capaz de alterar medidas (mm) da região cefálica nos embriões. A distância cefálica ântero-posterior no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (13,34 mm ± 0,19) apresentou-se significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (14,23 mm ± 0,15). O grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF apresentou uma média de 13,85 mm (± 0,17) (Figura 10). Na medida da distância cefálica transversal o grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (10,94 mm ± 0,10) apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (11,41 mm ± 0,17). O grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF apresentou uma média de 11,29 mm (± 0,13).

A medida da altura cefálica não apresentou diferenças significativas em relação aos três grupos de exposição. As médias entre os grupos experimentais para esta medida foram semelhantes, onde o grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF apresentou média de 12,67 mm (± 0,10), o grupo de 0,01 mg/L de PPF apresentou média de 12,84 mm (± 0,09) e o grupo controle apresentou média de 12,62 mm (± 0,10).

**Figura 10** - Morfometrias externas realizadas na região cefálica de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



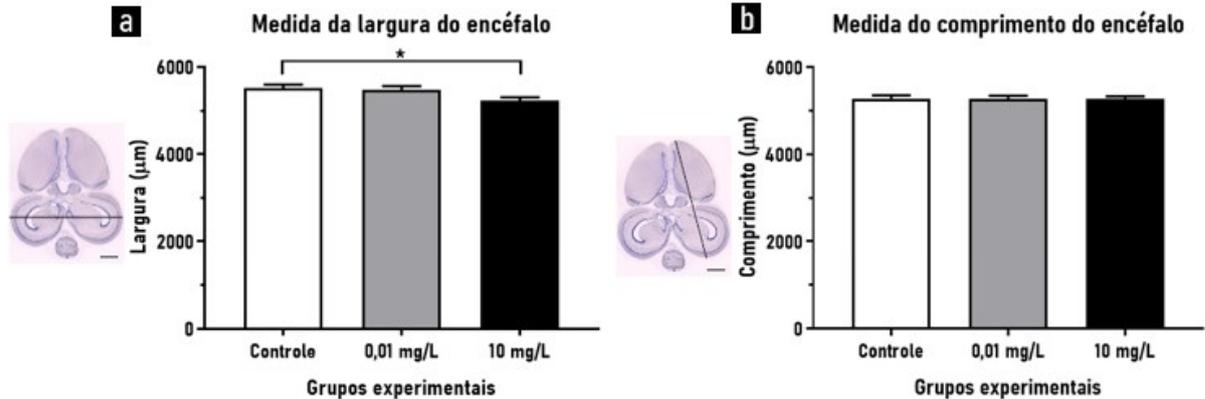
**a:** Embrião controle em E10 e as medidas morfométricas estabelecidas, (1) distância cefálica ântero-posterior, (2) distância cefálica transversal, (3) altura cefálica; **b:** Embrião do grupo de 0,01 mg/L e as medidas morfométricas estabelecidas; **c:** Embrião do grupo de 10 mg/L e as medidas morfométricas estabelecidas; **d:** Gráfico representando média  $\pm$  EPM para a distância cefálica ântero-posterior, para a medida da distância cefálica transversal e para a medida da altura cefálica; \*  $p < 0,05$ . Barras de escala: 5 mm.

#### 4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ENCÉFALO E VESÍCULAS ENCEFÁLICAS

Como foram observadas reduções significativas nas medidas externas da região cefálica e na massa do encéfalo do grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle, optou-se por investigar as medidas de largura e comprimento do encéfalo. Quando comparada a largura do encéfalo do grupo experimental exposto à concentração de 10 mg/L de PPF ( $5220 \mu\text{m} \pm 87,63$ ) com o grupo controle ( $5517 \mu\text{m} \pm 79,85$ ), observou-se uma redução significativa na largura dos encéfalos analisados ( $p < 0,05$ ). A largura dos encéfalos do grupo experimental de 0,01 mg/L ( $5476 \mu\text{m} \pm 85,6$ ) foi semelhante ao grupo controle. A medida de comprimento do encéfalo não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 11). O grupo experimental de 10 mg/L de PPF teve média de  $5275 \mu\text{m} (\pm 58,83)$ , o grupo experimental de

0,01 mg/L de PPF teve média de 5273  $\mu\text{m}$  ( $\pm 72,34$ ) e o grupo controle teve média de 5282  $\mu\text{m}$  ( $\pm 75,31$ ).

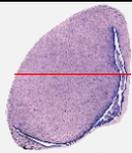
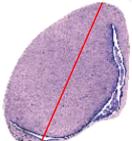
**Figura 11** - Medidas de largura e comprimento do encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



**a:** Gráfico representando média  $\pm$  EPM para a medida da largura do encéfalo; linhas na figura à esquerda indicam a região mensurada; **b:** Gráfico representando média  $\pm$  EPM para a medida do comprimento do encéfalo; linhas na figura à direita indicam a região mensurada; \*  $p < 0,05$ . Barras de escala: 1 mm.

Foram realizadas micromorfometrias para avaliar a largura total do telencéfalo, e observou-se diferenças significativas com redução da largura desta vesícula no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) e também em relação ao grupo exposto à concentração 0,01 mg/L de PPF ( $p < 0,01$ ) (Tabela 2). A altura do telencéfalo foi significativamente menor no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ).

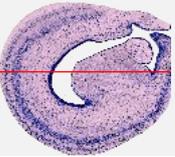
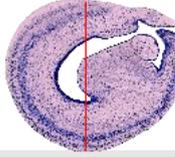
**Tabela 2** - Morfometrias realizadas no telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

Morfometrias do telencéfalo		Grupos experimentais		
		Controle	0,01 mg/L	10 mg/L
	Medida da largura do telencéfalo ( $\mu\text{m}$ )	2139 ( $\pm 43,03$ )	2111 ( $\pm 31,01$ )	1956 ( $\pm 29,54$ ) <sup>ab**</sup>
	Medida da altura do telencéfalo ( $\mu\text{m}$ )	2826 ( $\pm 43,41$ )	2692 ( $\pm 41,33$ )	2557 ( $\pm 37,64$ ) <sup>****</sup>

Dados estão apresentados em média  $\pm$  EPM; linhas vermelhas nas imagens à esquerda indicam a região mensurada; as letras abc indicam os grupos experimentais. As letras ao lado dos valores na tabela indicam de quais o valor difere significativamente; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

A largura total do mesencéfalo no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF apresentou redução significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). A altura do mesencéfalo foi semelhante entre os três grupos experimentais. A medida rostral do mesencéfalo foi significativamente menor no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). O grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF também apresentou redução significativa da medida rostral em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A medida caudal do mesencéfalo foi significativamente menor no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) e também em relação ao grupo exposto à concentração 0,01 mg/L de PPF ( $p < 0,05$ ). A medida do teto do mesencéfalo (teto óptico) foi significativamente menor no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 3** - Morfometrias realizadas no mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

Morfometrias do mesencéfalo		Grupos experimentais		
		Controle	0,01 mg/L	10 mg/L
	Medida da largura do mesencéfalo ( $\mu\text{m}$ )	2742 ( $\pm 40,82$ )	2706 ( $\pm 47,42$ )	2585 ( $\pm 42,95$ ) <sup>a*</sup>
	Medida da altura do mesencéfalo ( $\mu\text{m}$ )	2297 ( $\pm 37,21$ )	2215 ( $\pm 49,74$ )	2247 ( $\pm 45,38$ )
	Medida rostral do mesencéfalo ( $\mu\text{m}$ )	585 ( $\pm 14,9$ )	516,1 ( $\pm 11,52$ ) <sup>a*</sup>	535,3 ( $\pm 14,29$ ) <sup>a**</sup>
	Medida caudal do mesencéfalo ( $\mu\text{m}$ )	673,1 ( $\pm 18,82$ )	669 ( $\pm 14,3$ )	586,7 ( $\pm 13,8$ ) <sup>a***</sup> <sub>b*</sub>
	Medida do teto óptico do mesencéfalo ( $\mu\text{m}$ )	786,9 ( $\pm 17,4$ )	732,7 ( $\pm 16,97$ )	691,1 ( $\pm 19,42$ ) <sup>a***</sup>

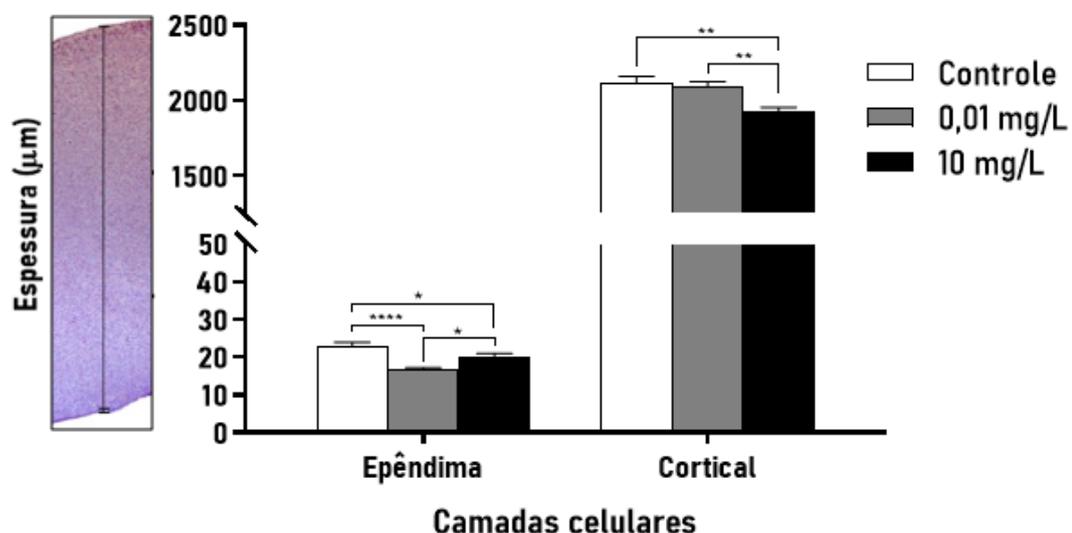
Dados estão apresentados em média  $\pm$  EPM; linhas vermelhas nas imagens à esquerda indicam a região mensurada; as letras abc indicam os grupos experimentais. As letras ao lado dos valores na tabela indicam de quais o valor difere significativamente; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS CAMADAS CELULARES

Ao observar as alterações nas medidas gerais do telencéfalo, decidiu-se também investigar as medidas das camadas celulares que o compõem. No telencéfalo podem ser definidas até três camadas celulares: a zona ventricular (ou epêndima), a zona sub-ventricular e a camada cortical. Essas regiões podem ser facilmente distinguidas em uma secção coronal, porém como as secções realizadas no telencéfalo foram transversais foi possível mensurar a espessura do epêndima e da camada cortical (Figura 6).

Em relação ao telencéfalo, as morfometrias realizadas mostraram diferenças significativas na espessura das camadas celulares. Observou-se que o epêndima (camada epêndimária) apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF ( $20,03 \mu\text{m} \pm 0,99$ ) em relação ao grupo de 0,01 mg/L de PPF ( $16,72 \mu\text{m} \pm 0,56$ ), e redução significativa da espessura ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle ( $23 \mu\text{m} \pm 0,99$ ). O grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF ( $11,41 \mu\text{m} \pm 1,29$ ) também apresentou redução significativa ( $p < 0,0001$ ) na espessura do epêndima em relação ao grupo controle (Figura 12). A camada cortical apresentou redução significativa na espessura ( $p < 0,01$ ) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF ( $1926 \mu\text{m} \pm 30,27$ ) em relação ao grupo de 0,01 mg/L de PPF ( $2095 \mu\text{m} \pm 31,8$ ) e redução significativa da espessura ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle ( $2117 \mu\text{m} \pm 43,33$ ).

**Figura 12** - Morfometria das camadas celulares do telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

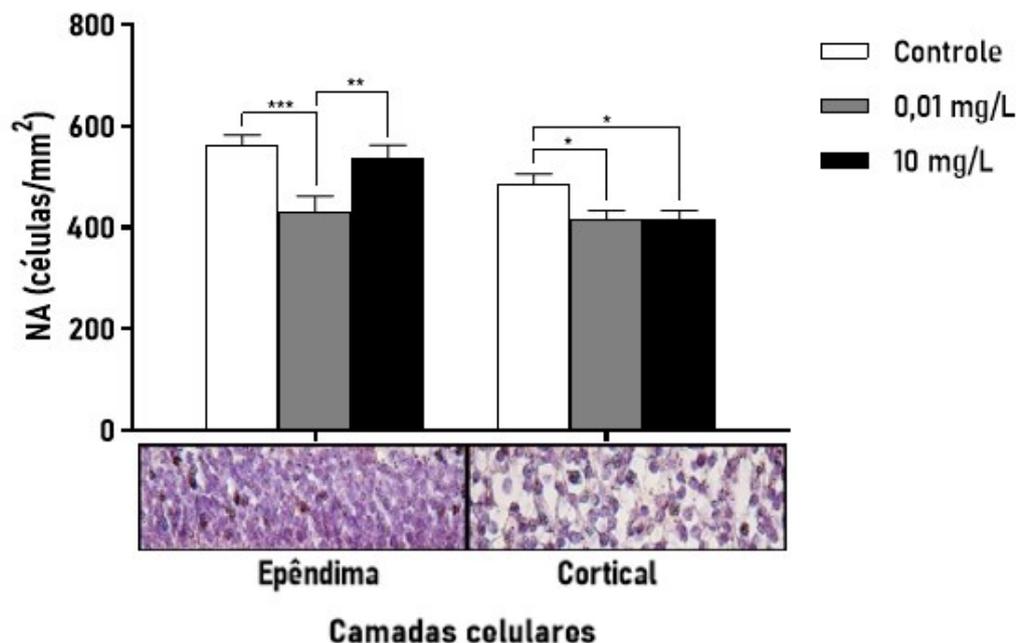


Dados apresentados em média  $\pm$  EPM para as morfometrias das camadas celulares do telencéfalo; figura à esquerda indica a região mensurada; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Foi realizado o cálculo da NA nas camadas celulares do telencéfalo para observar se a redução da espessura das camadas celulares entre os grupos experimentais teve relação com a densidade numérica de células por área (NA).

No epêndima, o cálculo da NA revelou redução significativa ( $p < 0,01$ ) na densidade celular do grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF em relação ao grupo de 10 mg/L de PPF, e redução significativa ( $p < 0,001$ ) e em relação ao grupo controle (Figura 13 e Tabela 4). Na camada cortical reduções significativas na NA foram observadas no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), e no grupo de 0,01 mg/L de PPF também em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

**Figura 13** - Densidade numérica de células por área (NA) nas camadas celulares do telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



Dados apresentados em média  $\pm$  EPM; figura à baixo do eixo x indica a região mensurada; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A NA relativa (%) apresentada na Tabela 4, indica o quanto da densidade celular de cada camada representa no total da densidade celular do telencéfalo.

**Tabela 4** - Relação da densidade numérica de células por área (NA) referente as camadas celulares do telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

Camadas do telencéfalo		Grupos experimentais		
		Controle	0,01 mg/L	10 mg/L
Epêndima	NA Total (mm <sup>2</sup> )	562,80 (± 20,45)	430,40 (± 31,70) <sup>a***</sup>	537,3 (± 25,40) <sup>b**</sup>
	NA Relativo (%)	53,63	50,87	56,43
Cortical	NA Total (mm <sup>2</sup> )	486,60 (± 19,71)	415,60 (± 17,95) <sup>a*</sup>	414,8 (± 19,30) <sup>a*</sup>
	NA Relativo (%)	46,36	49,12	43,56

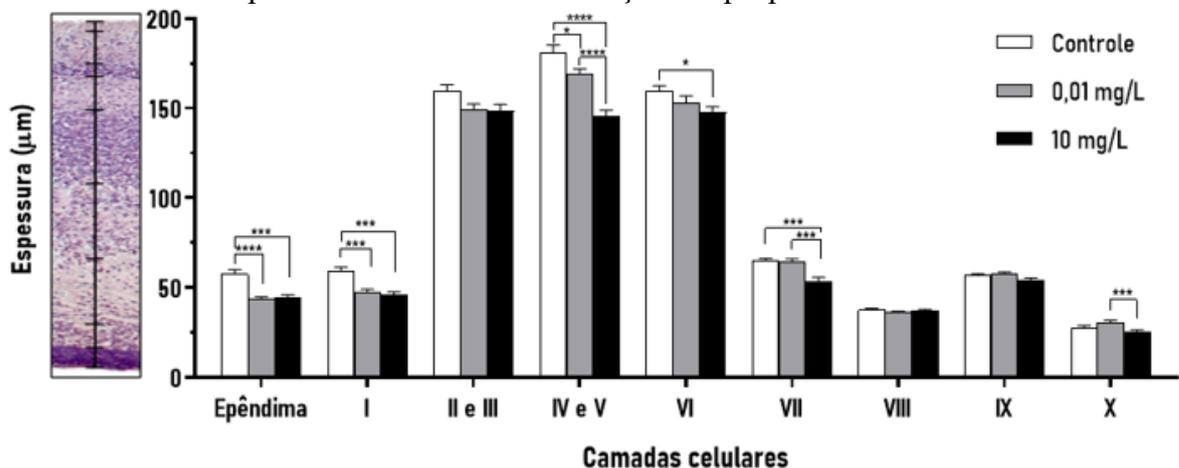
Dados apresentados em média ± EPM; as letras abc indicam os grupos experimentais. As letras ao lado dos valores na tabela indicam de quais o valor difere significativamente; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Ao observar alterações nas medidas do mesencéfalo, decidiu-se investigar as medidas das camadas celulares que o compõem. A região mensurada foi o teto óptico do mesencéfalo, região composta pela camada epêndimária (epêndima) e mais 10 camadas celulares (Figura 6).

As morfometrias realizadas identificaram diferenças significativas na espessura de algumas camadas do teto óptico do mesencéfalo. O epêndima teve redução significativa (p < 0,0001) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (44,55 µm ± 1,33) em relação ao grupo controle (57,41 µm ± 2,51), e redução significativa (p < 0,001) no grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF (11,41 µm ± 1,29) em relação ao grupo controle (Figura 14). A camada I teve redução significativa da espessura (p < 0,001) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (45,52 µm ± 2,04) em relação ao grupo controle (59,05 µm ± 2,43), e redução significativa (p < 0,001) no grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF (47,52 µm ± 1,58) em relação ao grupo controle. Nas camadas II e III mensuradas juntas pela dificuldade de definição entre as duas, não foram observadas diferenças significativas nas espessuras no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (148,40 µm ± 3,93), 0,01 mg/L de PPF (149,30 µm ± 3,19) e grupo controle (159,40 µm ± 3,84). Nas camadas IV e V também mensuradas juntas, os grupos apresentaram diferenças significativas entre si, com o grupo de 10 mg/L de PPF (145,40 µm ± 3,17) tendo a espessura significativamente reduzida em relação ao grupo de 0,01 mg/L de PPF (169 µm ± 3,16; p < 0,0001) e o grupo controle (181,30 µm ± 4,17; p < 0,0001) ainda, o grupo de 0,01 mg/L de PPF apresentou espessura significativamente reduzida em relação ao grupo controle (p < 0,05). A camada VI apresentou redução significativa da espessura (p < 0,05) no grupo de 10 mg/L de PPF (147,70 µm ± 3,22) em relação ao grupo controle (159,80 µm ± 2,86), o grupo de 0,01 mg/L de PPF (153,30 µm ± 3,63), não diferiu dos demais grupos. A camada VII apresentou redução significativa da espessura (p < 0,001) no

grupo de 10 mg/L de PPF ( $53,26 \mu\text{m} \pm 2,48$ ) em relação ao grupo controle ( $64,88 \mu\text{m} \pm 1,38$ ), e diferença significativa ( $p = 0,0002$ ) em relação ao grupo de 0,01 mg/L de PPF ( $64,19 \mu\text{m} \pm 1,81$ ). Na camada VIII não foram observadas diferenças significativas nas espessuras do grupo de 10 mg/L de PPF ( $37,02 \mu\text{m} \pm 0,97$ ), 0,01 mg/L de PPF ( $35,91 \mu\text{m} \pm 0,90$ ) e grupo controle ( $37,49 \mu\text{m} \pm 0,90$ ). Na camada IX também não foram observadas diferenças significativas nas espessuras do grupo de 10 mg/L de PPF ( $54,20 \mu\text{m} \pm 1,23$ ), 0,01 mg/L de PPF ( $57,53 \mu\text{m} \pm 1,19$ ) e controle ( $56,59 \mu\text{m} \pm 1,18$ ). A camada X revelou uma redução significativa da espessura ( $p < 0,001$ ) no grupo de 10 mg/L de PPF ( $24,92 \mu\text{m} \pm 1,58$ ) em relação ao grupo de 0,01 mg/L de PPF ( $30,57 \mu\text{m} \pm 1,23$ ), o grupo controle ( $27,81 \mu\text{m} \pm 0,95$ ) não diferiu dos demais grupos.

**Figura 14** - Morfometria das camadas celulares do teto óptico do mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



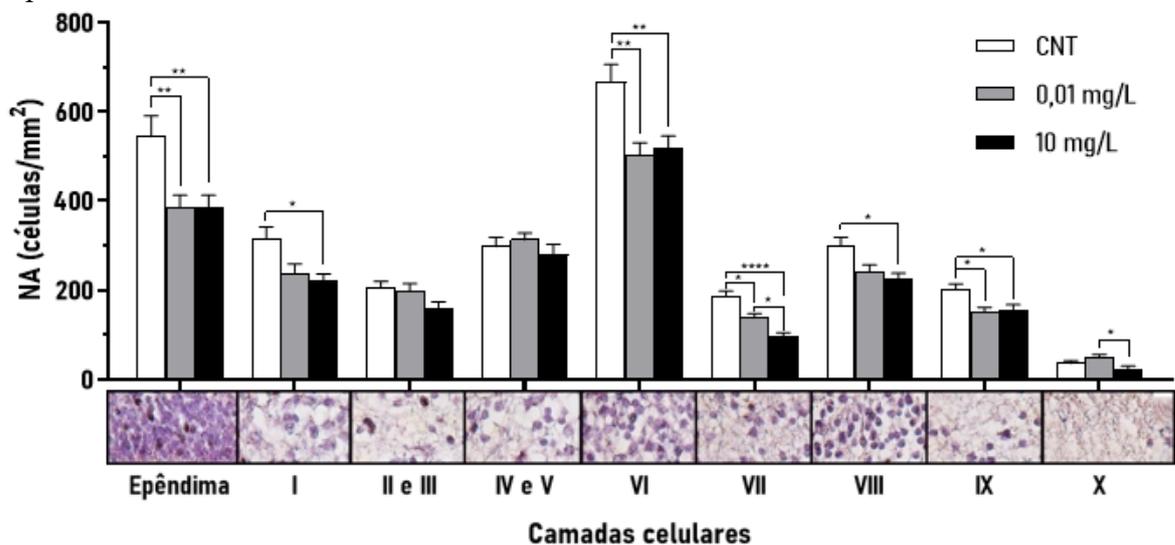
Dados apresentados em média  $\pm$  EPM para as morfometrias das camadas celulares do teto óptico do mesencéfalo; figura à esquerda indica a região mensurada; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Para ajudar a elucidar o motivo da redução da espessura de algumas camadas celulares do teto óptico do mesencéfalo entre os grupos experimentais, foi realizado a contagem do número de células em cada camada celular por meio do cálculo da densidade de células por área (NA).

No epêndima, o cálculo da NA revelou redução significativa ( $p < 0,01$ ) na densidade celular do grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle, e redução significativa ( $p < 0,01$ ) no grupo de 0,01 mg/L de PPF em relação ao grupo controle (Figura 15 e Tabela 5). Na camada I, a NA reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle. As camadas II e III apresentaram médias semelhantes na NA, assim como as camadas IV e V. Na camada VI, a NA reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em

relação ao grupo controle, e reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) no grupo de 0,01 mg/L de PPF em relação ao grupo controle. Na camada VII, a NA apresentou redução significativa no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo de 0,01 mg/L de PPF ( $p < 0,05$ ) e o grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Ainda, o grupo de 0,01 mg/L de PPF apresentou NA significativamente reduzida em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Na camada VIII a NA reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle. Na camada IX a NA reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF em relação ao grupo controle, e reduziu significativamente ( $p = 0,05$ ) no grupo de 0,01 mg/L de PPF em relação ao grupo controle. Por fim, na camada X, o grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF teve a NA reduzida significativamente ( $p = 0,05$ ) em relação a concentração de 0,01 mg/L.

**Figura 15** - Densidade numérica de células por área (NA) nas camadas celulares do teto óptico do mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



Dados apresentados em média  $\pm$  EPM; figura à baixo do eixo x indica a região mensurada; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

A NA relativa (%) apresentada na Tabela 5, indica o quanto da densidade celular de cada camada representa no total da densidade celular do teto do mesencéfalo.

**Tabela 5** - Relação da densidade numérica de células por área (NA) referente a cada camada celular do teto óptico do mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

Camadas do mesencéfalo		Grupos experimentais		
		Controle	0,01 mg/L	10 mg/L
Epêndima	NA Total (mm <sup>2</sup> )	544,3 (± 46,81)	387,10 (± 25,99) <sup>a**</sup>	387,10 (± 25,99) <sup>a**</sup>
	NA Relativo (%)	19,76	17,46	18,75
I	NA Total (mm <sup>2</sup> )	314,70 (± 27,81)	238,00 (± 21,31)	220,00 (± 16,84) <sup>a*</sup>
	NA Relativo (%)	11,42	10,73	10,65
II e III	NA Total (mm <sup>2</sup> )	206,30 (± 13,23)	198,60 (± 16,55)	160,40 (± 14,21)
	NA Relativo (%)	7,49	8,9	7,77
IV e V	NA Total (mm <sup>2</sup> )	297,90 (± 20,76)	313,20 (± 14,83)	280,10 (± 23,19)
	NA Relativo (%)	10,81	14,12	13,56
VI	NA Total (mm <sup>2</sup> )	667,20 (± 38,81)	501,70 (± 29,32) <sup>a**</sup>	516,90 (± 29,67) <sup>a**</sup>
	NA Relativo (%)	24,24	22,63	25,04
VII	NA Total (mm <sup>2</sup> )	185,90 (± 12,61)	137,50 (± 10,38) <sup>a*</sup>	96,77 (± 8,41) <sup>b*</sup> <sub>a****</sub>
	NA Relativo (%)	6,75	6,20	4,68
VIII	NA Total (mm <sup>2</sup> )	300,50 (± 18,77)	241,90 (± 14,85)	224,10 (± 14,49) <sup>a*</sup>
	NA Relativo (%)	10,91	10,91	10,85
IX	NA Total (mm <sup>2</sup> )	201,20 (± 13,19)	150,20 (± 11,63) <sup>a*</sup>	155,00 (± 12,50) <sup>a*</sup>
	NA Relativo (%)	7,30	6,77	7,50
X	NA Total (mm <sup>2</sup> )	35,65 (± 6,73)	48,38 (± 7,16)	23,80 (± 6,54) <sup>b*</sup>
	NA Relativo (%)	1,29	2,18	1,15

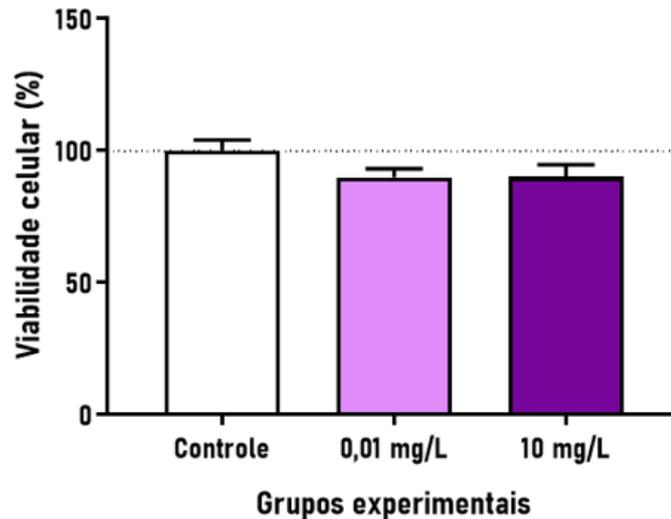
Dados apresentados em média ± EPM; as letras abc indicam os grupos experimentais. As letras ao lado dos valores na tabela indicam de quais o valor difere significativamente; \* indica  $p < 0,05$ ; \*\* indica  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* indica  $p < 0,0001$ .

#### 4.5 EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

A fim de compreender melhor os efeitos do PPF sobre a histogênese do encéfalo, optou-se por avaliar a viabilidade celular através da atividade das desidrogenases mitocondriais, uma vez que a viabilidade celular pudesse estar ligada a redução da densidade da população celular e da espessura das camadas celulares do mesencéfalo e telencéfalo.

Segundo a análise, os grupos experimentais apresentaram médias semelhantes na viabilidade celular, onde o grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF apresentou redução de 89,94% da viabilidade média e o grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF apresentou redução de 89,86% da viabilidade celular (Figura 16). Desta forma, pode-se observar que o PPF não reduziu significativamente a viabilidade das células do encéfalo em relação ao grupo controle.

**Figura 16** - Viabilidade celular no encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



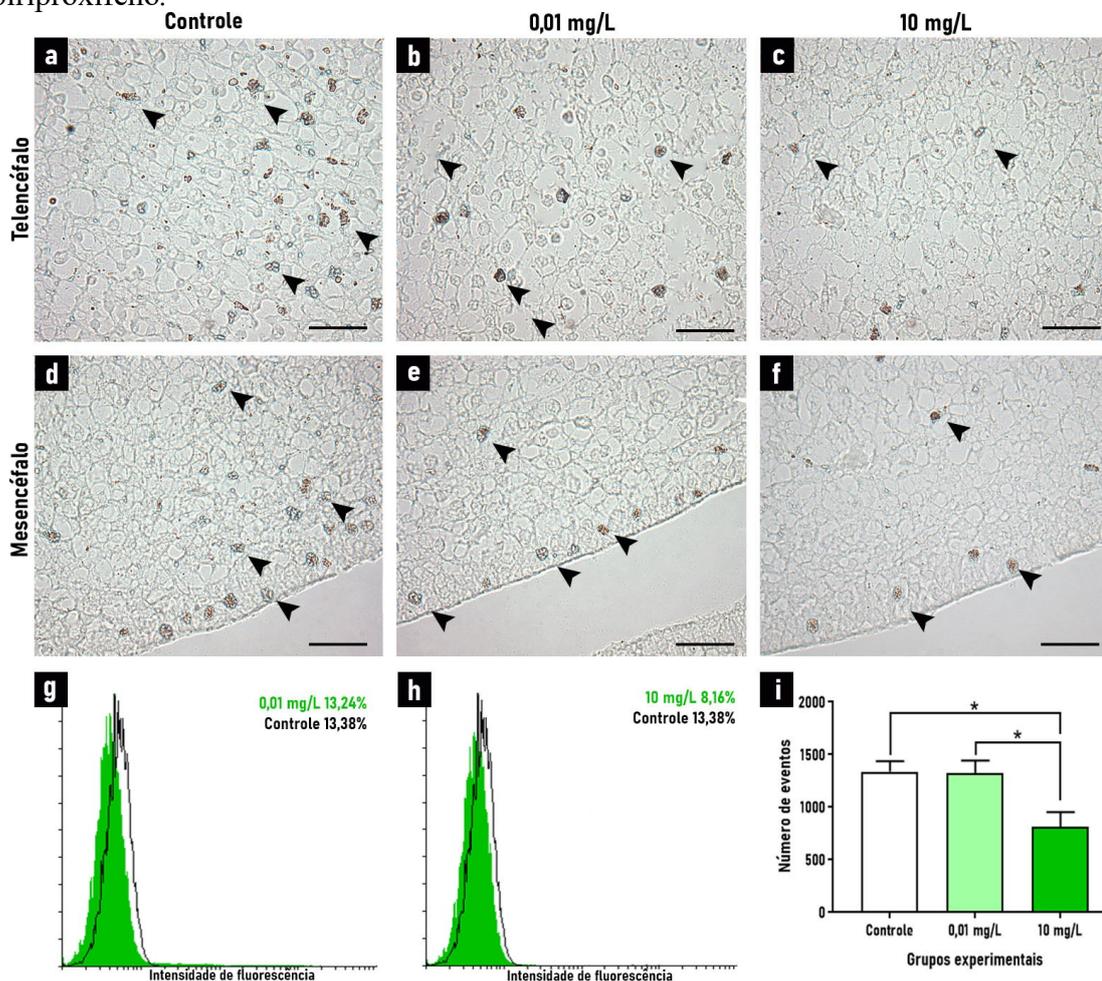
Dados estão apresentados como porcentagem da absorbância média ( $\pm$  EPM) sendo adotado 100% de viabilidade para o grupo controle.

#### 4.6 EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para entender os efeitos do PPF em nível celular, uma vez que o PPF reduziu a densidade numérica de células por área e a espessura de camadas celulares, passou-se a investigar o conteúdo da proteína Fosfo-histona H3 envolvida na condensação da cromatina durante a proliferação celular. A imunolocalização desta proteína foi evidenciada no telencéfalo, principalmente na camada cortical, e também na camada epêndimária do mesencéfalo (Figura 17).

A proteína Fosfo-histona H3 foi quantificada por citometria de fluxo e os resultados mostraram redução significativa no conteúdo de células positivas no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (816,5 células positivas  $\pm$  137,6) em relação ao grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF (1324 células positivas  $\pm$  118,6,  $p < 0,05$ ) e também em relação ao grupo controle (1338 células positivas  $\pm$  99,99,  $p < 0,05$ ). O conteúdo de células positivas para Fosfo-histona H3 no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF, 0,01 mg/L de PPF e controle corresponderam a 8,16%, 13,24% e 13,48% do total de células analisadas, respectivamente.

**Figura 17** - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína Fosfo-histona H3 no encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



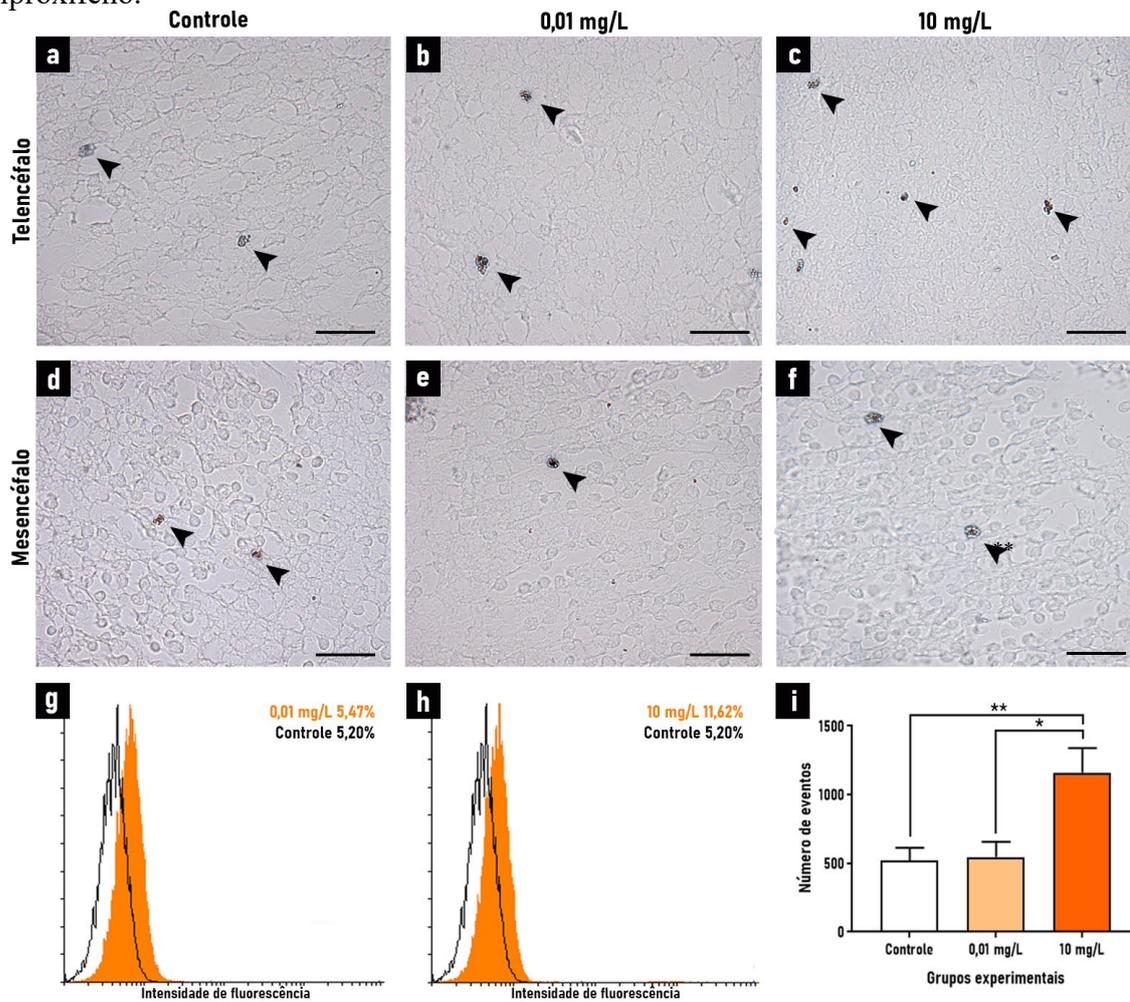
**a, b, c:** Secções transversais do telencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20 μm. **d, e, f:** Secções transversais do mesencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20 μm. **g, h:** Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas analisadas por citometria de fluxo. **i:** Gráfico de barras representando o número absoluto de células positivas para Fosfo-histona H3; os dados foram apresentados em média ± EPM; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.7 EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A INDUÇÃO DE DANO AO DNA E MORTE CELULAR POR APOPTOSE

Considerando os efeitos observados do PPF sobre a proliferação celular, optou-se por analisar o conteúdo da proteína  $\gamma$ -H2A.X, a fim de investigar se o PPF foi capaz de causar danos ao DNA. Foi realizada a quantificação das células positivas para a proteína histona  $\gamma$ -H2A.X, uma vez que esta é evidenciada quando há quebras na fita de DNA. A imunolocalização dessa proteína foi realizada no telencéfalo onde foi evidenciada em maior quantidade na camada

cortical, e também realizada no teto do mesencéfalo onde foi evidenciada em maior quantidade na camada VI (Figura 18).

**Figura 18** - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína  $\gamma$ -H2A.X no encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piperproxifeno.



**a, b, c:** Secções transversais do telencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20  $\mu$ m. **d, e, f:** Secções transversais do mesencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20  $\mu$ m. **g, h:** Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas analisadas por citometria de fluxo. **i:** Gráfico de barras representando o número absoluto de células positivas para  $\gamma$ -H2A.X; os dados foram apresentados em média  $\pm$  EPM; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

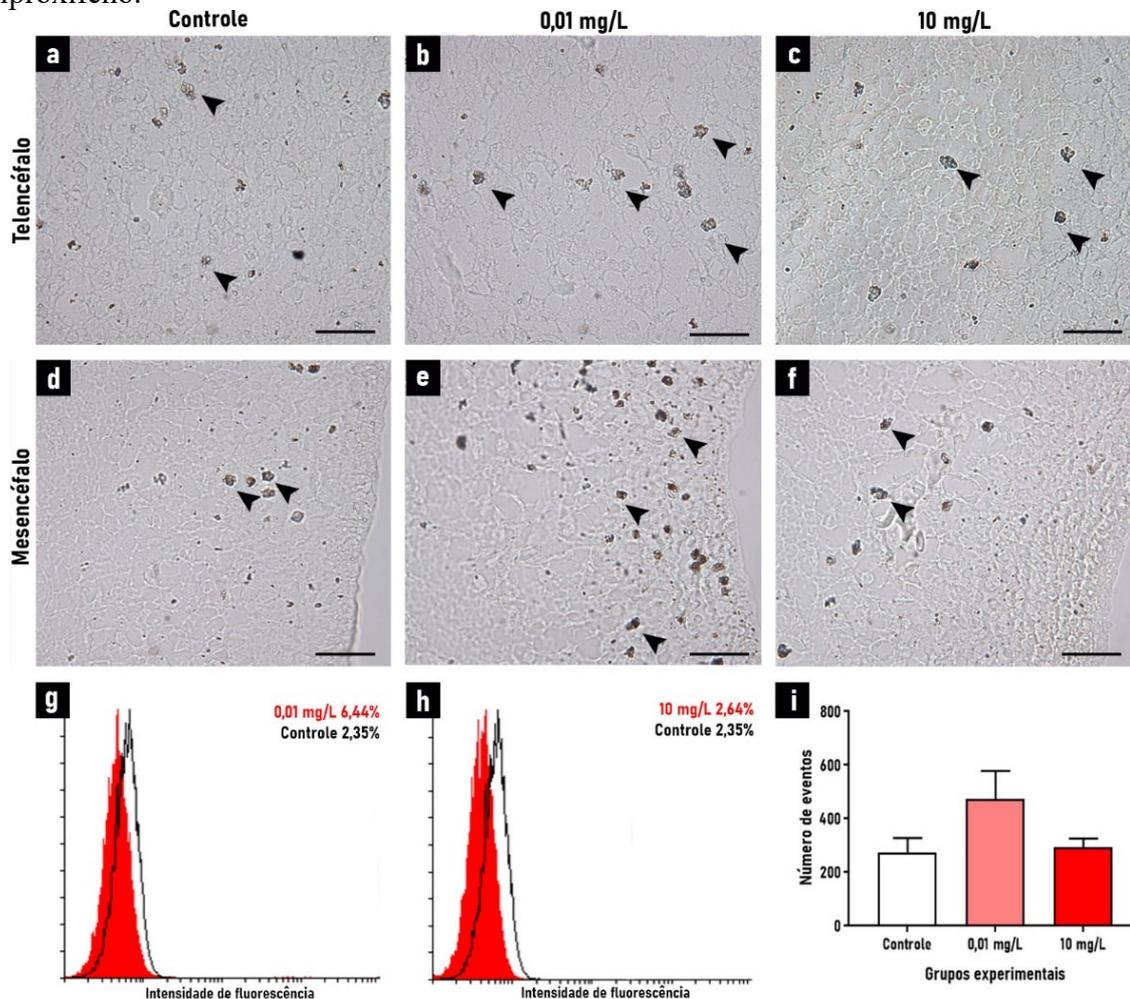
A quantificação de células positivas para  $\gamma$ -H2A.X revelou um aumento significativo no conteúdo de células positivas no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (1162 células positivas  $\pm$  177,6) em relação ao grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF (547 células positivas  $\pm$  110,1, p < 0,05) e também em relação ao grupo controle (520,6 células positivas  $\pm$  92,25, p < 0,01). O conteúdo de células positivas para  $\gamma$ -H2A.X no grupo exposto à

concentração de 10 mg/L de PPF, 0,01 mg/L de PPF e controle corresponderam a 11,62%, 5,47% e 5,20% do total de células analisadas, respectivamente.

Considerando os efeitos do PPF sobre o aumento do dano ao DNA, avaliado pela quantificação da molécula  $\gamma$ -H2A.X, decidiu-se investigar se essa alteração poderia induzir o processo de apoptose. Para isso, investigou-se o conteúdo da proteína Caspase 3, considerada a caspase efetora do apoptose. A imunolocalização de células positivas para Caspase 3 foi realizada no telencéfalo sendo evidenciada em todas as camadas celulares e também realizada no teto do mesencéfalo sendo evidenciada na maioria das camadas celulares e em maior quantidade nas camadas próximas a camada epêndimária (Figura 19).

Após a quantificação, os resultados mostraram que o conteúdo de células positivas para Caspase 3 foi semelhante entre o grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (292 células positivas  $\pm$  34,61), o grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF (473,6 células positivas  $\pm$  104,8) e o grupo controle (273,5 células positivas  $\pm$  54,75). O conteúdo de células positivas para Caspase 3 no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF, 0,01 mg/L de PPF e controle corresponderam a 2,64%, 6,44% e 2,35% do total de células analisadas, respectivamente.

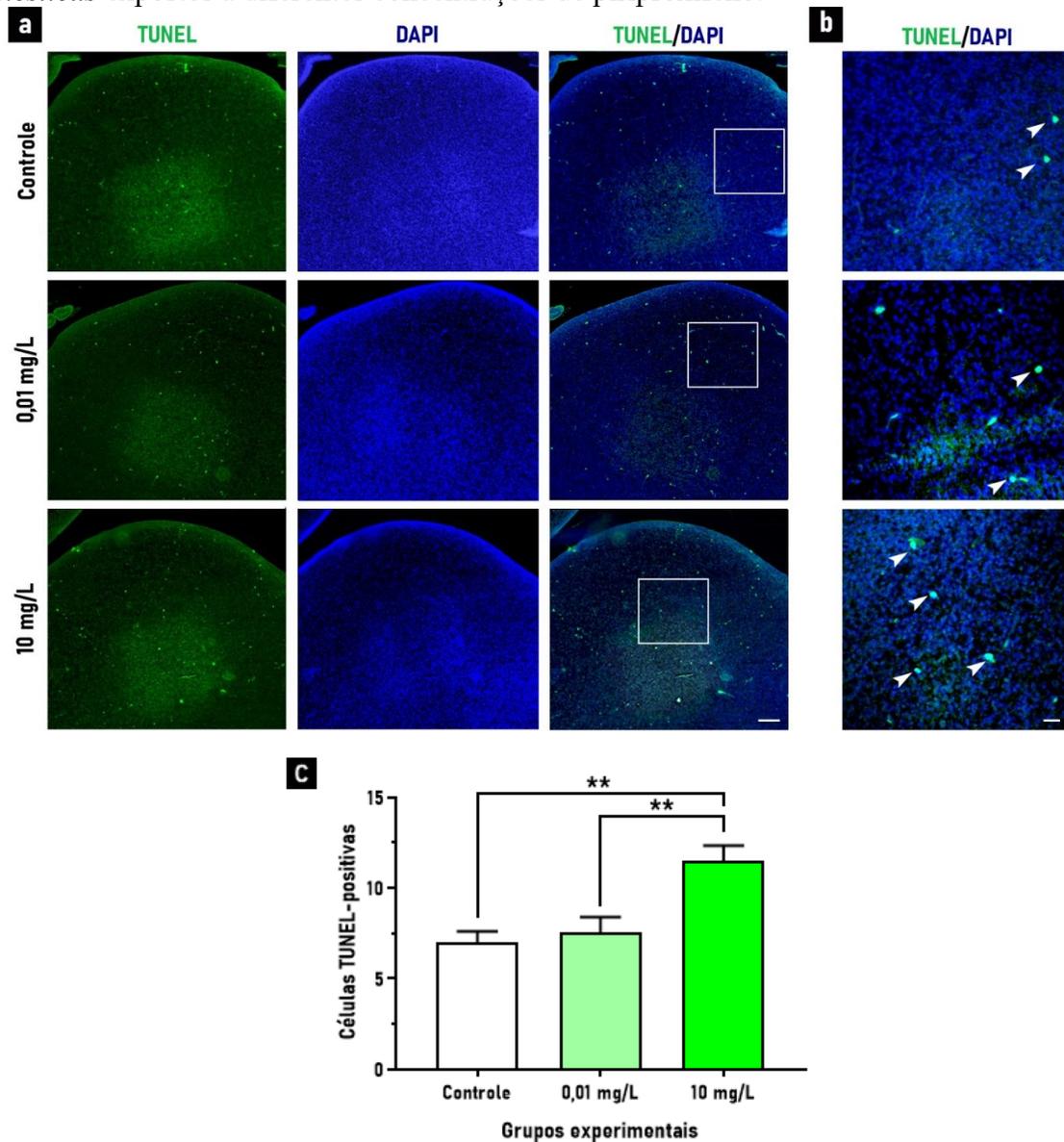
**Figura 19** - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína Caspase 3 no encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



**a, b, c:** Secções transversais do telencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20 μm. **d, e, f:** Secções transversais do mesencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20 μm. **g, h:** Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas analisadas por citometria de fluxo. **i:** Gráfico de barras representando o número absoluto de células positivas para Caspase 3; os dados foram apresentados em média ± EPM.

Uma vez que não foi identificado o efeito do PPF no conteúdo da proteína Caspase 3, decidiu-se analisar a fragmentação do DNA associada ao processo apoptótico pelo método de TUNEL. A marcação positiva para TUNEL foi observada em todas as camadas celulares do telencéfalo, assim como em praticamente todas as camadas celulares do mesencéfalo. Na região do telencéfalo foi observado um aumento significativo de células em apoptose pela marcação positiva para TUNEL no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (11,53 células ± 0,82) em relação ao grupo exposto a concentração de 0,01 mg/L de PPF (7,53 células ± 0,87,  $p < 0,01$ ) e em relação ao grupo controle (7 células ± 0,62,  $p < 0,01$ ) (Figura 20).

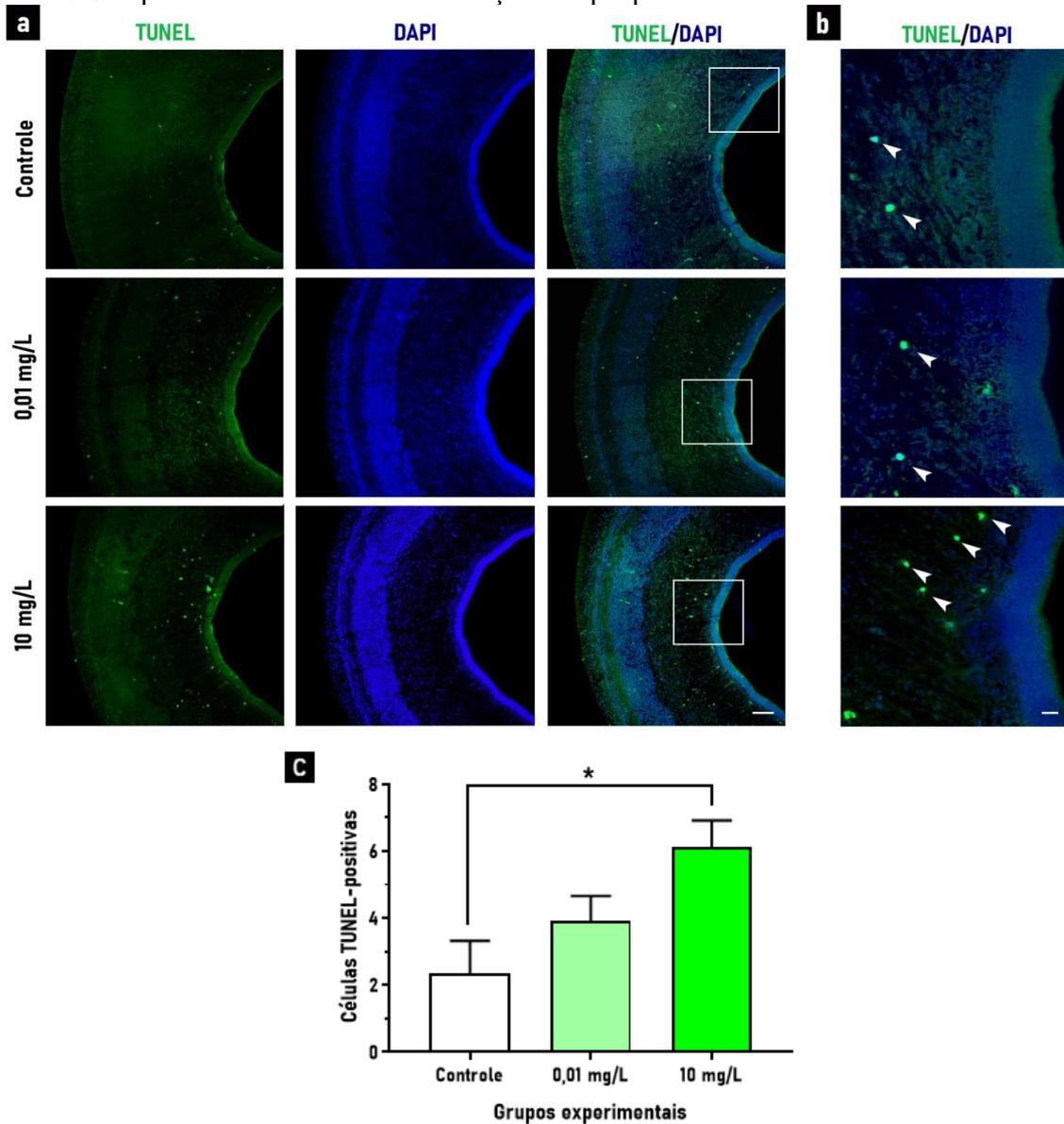
**Figura 19** - Quantificação de células apoptóticas no telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



**a:** Secção transversal evidenciando células positivas para TUNEL no telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* com detalhe da região demarcada em b, barra de escala: 200  $\mu$ m. **b:** Setas indicam células em apoptose, barra de escala: 20  $\mu$ m. **c:** Gráfico de barras representando o número absoluto de células positivas para TUNEL; os dados foram apresentados com média  $\pm$  EPM; \*\*  $p < 0,01$ .

Na região do teto do mesencéfalo também se observou um aumento significativo de células em apoptose pela marcação positiva para TUNEL no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (6,12 células  $\pm$  0,67) em relação ao grupo controle (2,33 células  $\pm$  0,98,  $p < 0,05$ ). O grupo exposto a concentração de 0,01 mg/L de PPF apresentou média de 3,90 células ( $\pm$  0,76) não diferindo estatisticamente dos demais grupos (Figura 21).

**Figura 20** - Quantificação de células apoptóticas no mesencéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



**a:** Secção transversal evidenciando células positivas para TUNEL no mesencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* com detalhe da região demarcada em b, barra de escala: 200  $\mu$ m. **b:** Setas indicam células em apoptose, barra de escala: 20  $\mu$ m. **c:** Gráfico de barras representando o número absoluto de células positivas para TUNEL; os dados foram apresentados com média  $\pm$  EPM; \*  $p < 0,05$ .

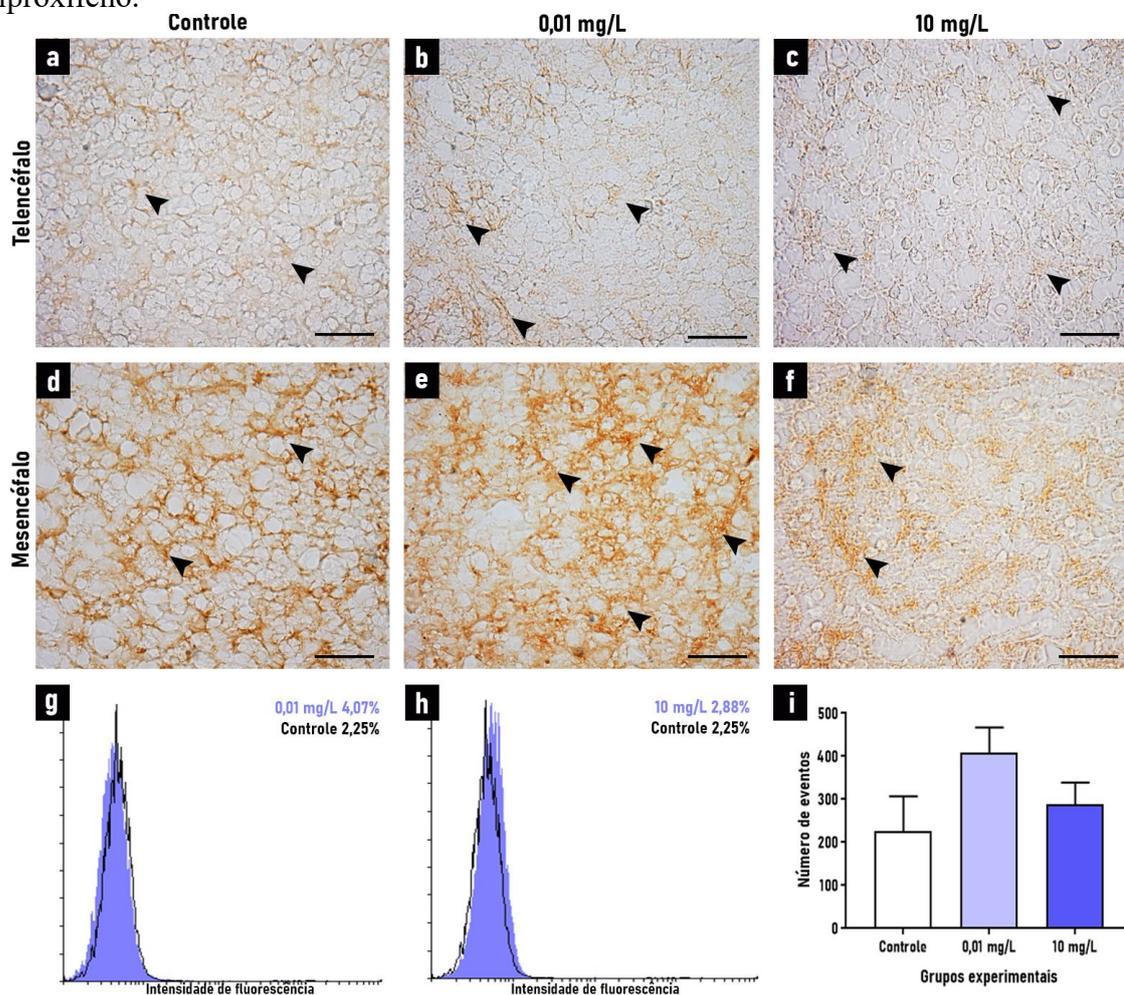
#### 4.8 EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Para investigar se o PPF foi capaz de interferir na diferenciação neuronal, optou-se por investigar a proteína  $\beta$ 3 Tubulina. A imunolocalização desta proteína foi realizada no telencéfalo onde foi evidenciada em maior quantidade na camada cortical, e também realizada no teto do mesencéfalo onde foi evidenciada em maior quantidade na camada VI (Figura 22).

O conteúdo de células positivas para  $\beta 3$  Tubulina não diferiu significativamente entre o grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (288,3 células positivas  $\pm$  50,61), o grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF (407,8 células positivas  $\pm$  59,42) e o grupo controle (225,6 células positivas  $\pm$  81,5).

O conteúdo de células positivas para  $\beta 3$  Tubulina no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF, 0,01 mg/L de PPF e controle corresponderam a 2,88%, 4,07% e 2,25% do total de células analisadas, respectivamente.

**Figura 21** - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína  $\beta 3$  Tubulina no encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

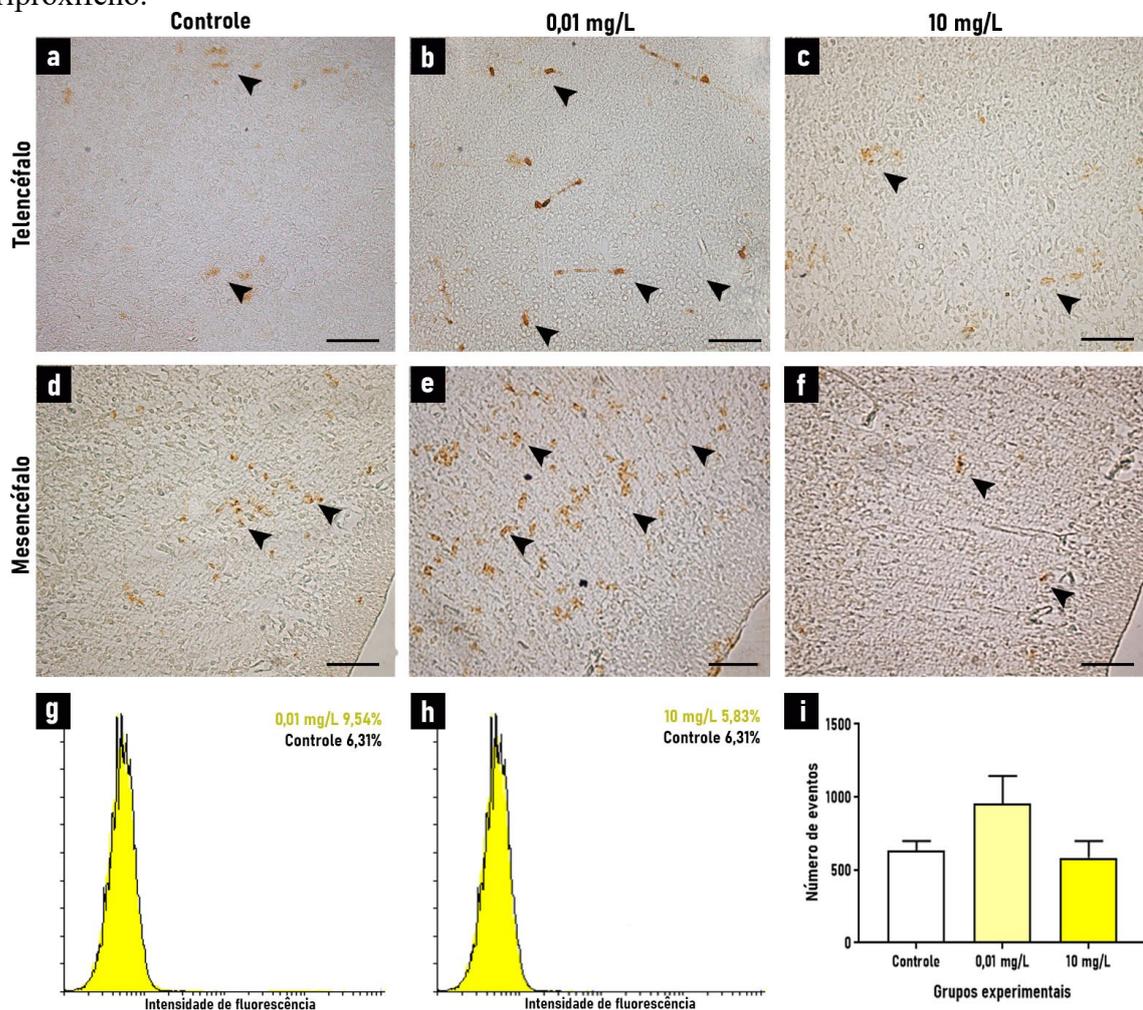


**a, b, c:** Secções transversais do telencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20  $\mu$ m. **d, e, f:** Secções transversais do mesencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20  $\mu$ m. **g, h:** Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas analisadas por citometria de fluxo. **i:** Gráfico de barras representando o número absoluto de células positivas para  $\beta 3$  Tubulina; os dados foram apresentados em média  $\pm$  EPM.

#### 4.9 EFEITO DO PIRIPROXIFENO SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GLIAL

Efeitos similares do PPF foram observados sobre a diferenciação glial por meio da investigação do conteúdo da proteína GFAP. A imunolocalização desta proteína foi realizada no telencéfalo onde foi evidenciada em maior quantidade na camada cortical, e também realizada no teto do mesencéfalo onde foi evidenciada em maior quantidade nas camadas II, III, IV e V (Figura 23).

**Figura 22** - Imunolocalização e quantificação das células positivas para a proteína GFAP no encéfalo de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.



**a, b, c:** Secções transversais do telencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20  $\mu\text{m}$ . **d, e, f:** Secções transversais do mesencéfalo destacando células imunomarcadas (seta), barra de escalas: 20  $\mu\text{m}$ . **g, h:** Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas analisadas por citometria de fluxo. **i:** Gráfico de barras representando o número absoluto de células positivas para GFAP; os dados foram apresentados em média  $\pm$  EPM.

A quantificação de células positivas para GFAP não diferiu significativamente entre o grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF (583 células positivas  $\pm$  115,7), o grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF (954 células positivas  $\pm$  190,2) e o grupo controle (631,7 células positivas  $\pm$  66,4).

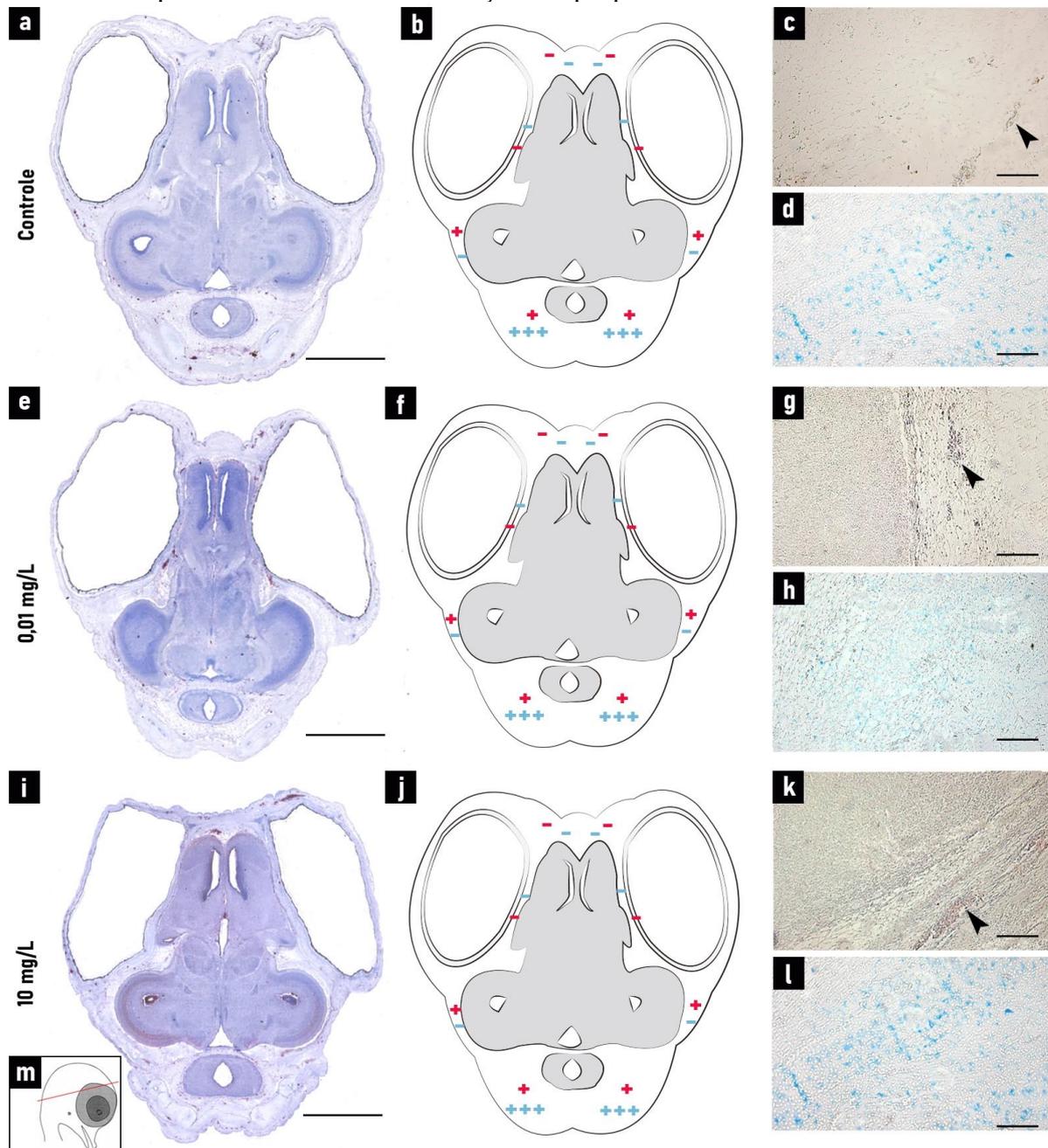
O conteúdo de células positivas para GFAP no grupo exposto à concentração de 10 mg/L de PPF, 0,01 mg/L de PPF e controle corresponderam a 5,83%, 9,54% e 6,31% do total de células analisadas, respectivamente.

#### 4.10 ANÁLISES DO PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO DA CABEÇA

Considerando os efeitos do PPF sobre a morfometria externa da região cefálica dos embriões, sobre a massa e a morfometria do encéfalo e das vesículas encefálicas e a espessura de suas camadas celulares, optou-se por investigar se o PPF interferiu nos processos de ossificação intramembranosa ou endocondral na região cefálica dos embriões.

Nas secções analisadas, poucos centros de ossificação foram identificados nos embriões de todos os grupos experimentais, baseado na reação histoquímica com vermelho de Alizarina (Figura 24). Foi evidenciado reação histoquímica mais intensa com azul de Alcian, evidenciando a presença de cartilagem, não havendo diferença entre os grupos experimentais.

**Figura 24** - Análises das reações histoquímicas na região cefálica de embriões de *Gallus domesticus* expostos a diferentes concentrações de piriproxifeno.

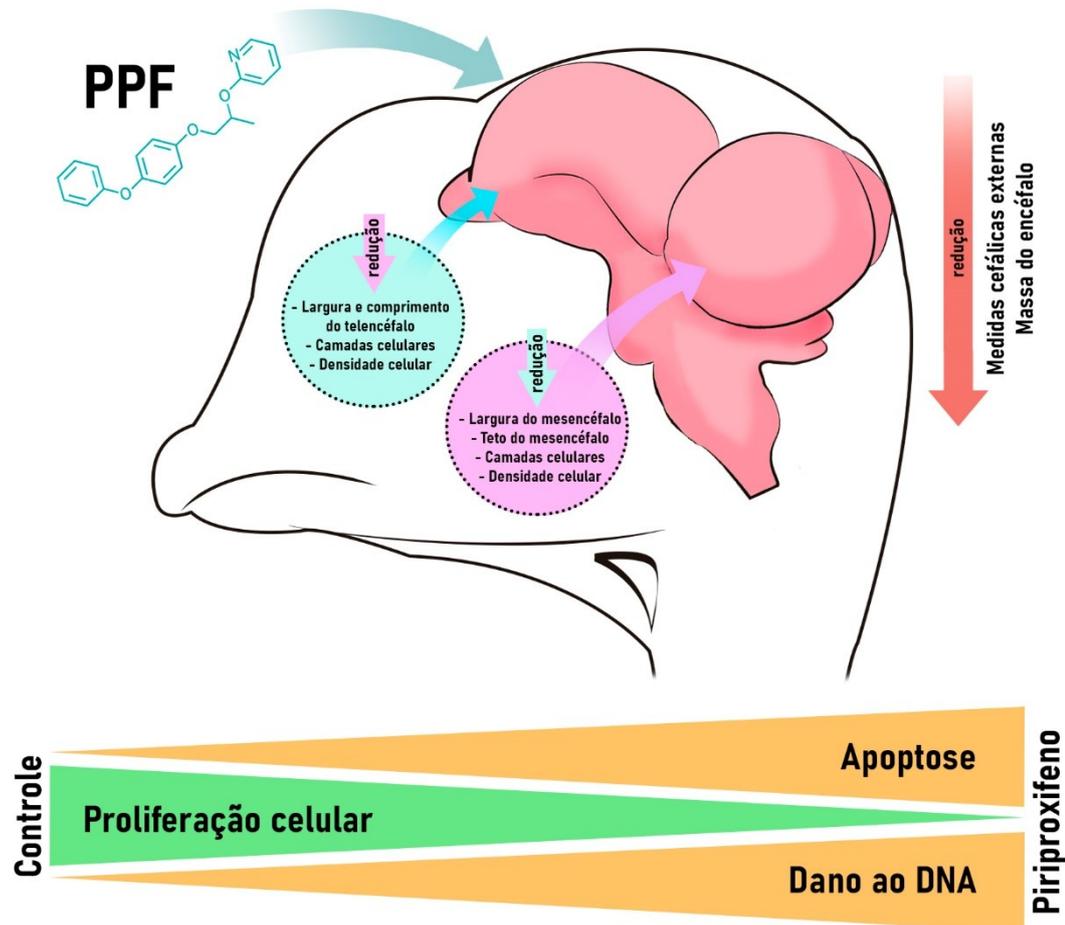


**a, e, i:** Secções coronais na região cefálica de embrião de *Gallus domesticus*; coloração por Tricômico de Mallory; barra de escala: 2000  $\mu\text{m}$ . **m:** Quadro com a representação gráfica da região da secção coronal. **b, f, j:** esquema com escores evidenciando o local das reações histoquímicas; símbolos (- ou +) indicam o local onde as reações foram visualizadas: ausente (-), fraca (+), intensa (+++); símbolos vermelhos indicam reação histoquímica com vermelho de Alizarina; símbolos azuis indicam reação histoquímica com azul de Alcian. **d, h, l:** Região de condrogênese observada pela reação histoquímica com azul de Alcian; barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . **c, g, k:** Pequenos centros de ossificação evidenciados pela reação histoquímica com vermelho de Alizarina; cabeça de seta preta indicando local da reação histoquímica; barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

Fonte: O autor (2019).

Em síntese, os dados obtidos neste trabalho mostraram que a concentração mais elevada de PPF foi capaz de reduzir significativamente medidas da massa total do embrião e do encéfalo. A concentração maior de PPF também foi capaz de reduzir as medidas cefálicas dos embriões. Adicionalmente, observou-se reduções na largura do encéfalo e medidas das vesículas encefálicas, como a redução da largura e altura do telencéfalo e, largura total do mesencéfalo, acompanhado de reduções na medida da região rostral, da região caudal e do teto mesencefálico. As concentrações de PPF foram capazes de reduzir significativamente a espessura e densidade numérica de células por área (NA) das camadas celulares do telencéfalo e da maioria das camadas celulares do mesencéfalo. O PPF não afetou a viabilidade das células do encéfalo, e também não aumentou os centros de ossificação na região da cabeça. Os resultados demonstraram que a maior concentração de PPF promoveu a redução na proliferação celular e aumento no dano ao DNA. O PPF não interferiu na diferenciação neural. Por outro lado, promoveu o aumento do número de células apoptóticas de forma significativa na maior concentração, como observado pela análise da fragmentação do DNA (Figura 25).

**Figura 23** - Resumo esquemático dos efeitos do PPF sobre o desenvolvimento do encéfalo de embriões de *Gallus domesticus*.



O PPF interferiu no conteúdo da proteína Fosfo-histona H3 e  $\gamma$ -H2A.X envolvidas na proliferação celular e no dano ao DNA, respectivamente. O PPF aumentou o conteúdo de células apoptóticas visualizado pela fragmentação do DNA. A nível morfológico, o PPF reduziu a densidade de células por área das camadas celulares e a espessura das camadas celulares do telencéfalo e do mesencéfalo. O PPF também reduziu medidas das vesículas encefálicas e do encéfalo, bem como medidas na região cefálica de embriões de *Gallus domesticus*.

Fonte: O autor (2019).

## 5 DISCUSSÃO

Os dados apresentados nesse trabalho, demonstram que as concentrações de PPF não foram letais para os embriões expostos, no entanto essas concentrações de PPF promoveram redução significativa nas medidas do embrião, da região cefálica e do encéfalo. Além disso, o PPF causou redução na espessura das camadas celulares do telencéfalo e do mesencéfalo, acompanhada da redução na proliferação celular, do aumento do dano ao DNA e do aumento na morte celular por apoptose. Em conjunto, esses resultados mostram o efeito neurotóxico larvicida PPF durante o desenvolvimento embrionário de *G. domesticus*, utilizado neste estudo como modelo experimental.

Estudos sobre a toxicidade do PPF no desenvolvimento do SNC de vertebrados são escassos na literatura. Ao revisar a literatura, constatou-se que a maioria dos estudos realizados datam das décadas de 1980 e 1990, sendo os estudos realizados principalmente com animais adultos (HIROHASHI et al., 1988; SAEGUSA et al., 1988a; SAEGUSA et al., 1988b; SAEGUSA et al., 1988c; SAEGUSA et al., 1988d; ROBINSON et al., 1991). Nos escassos experimentos sobre toxicidade no desenvolvimento embrionário, poucos são os estudos que buscam identificar algum vínculo com as anomalias congênitas no sistema nervoso, como por exemplo a microcefalia. Na maioria dos estudos, foram realizadas observações macroscópicas nos embriões, fetos ou recém-nascidos de ratos e coelhos. As alterações no sistema nervoso não foram suficientemente bem investigadas ou comparadas em outras espécies.

Buscando quantificar o número de trabalhos disponíveis nas bases de dados PubMed e ScienceDirect e que relacionam o desenvolvimento embrionário de vertebrados e exposição ao larvicida PPF, constatou-se um número reduzido de publicações nesta área. Ao utilizar as palavras-chave “pyriproxyfen AND central nervous system”, “pyriproxyfen AND vertebrates”, “pyriproxyfen AND embryo” nas bases de dados citadas, em 06 de janeiro de 2020, observou-se que a maioria das publicações utilizando vertebrados com modelo experimental foram publicadas a partir do ano de 2015. Acredita-se que a maioria destas publicações justificam seus estudos em decorrência do aumento de casos de microcefalia em neonatos no Brasil e pela escassez de dados que correlacionam a toxicidade do PPF no desenvolvimento embrionário de vertebrados. Somando o número de artigos científicos encontrados a partir da busca realizada com todas as palavras-chave citadas, foi possível reunir nove artigos que utilizaram vertebrados em estágio de desenvolvimento para observar os efeitos do larvicida PPF (TRUONG et al., 2016; HORIE et al., 2016; OSE et al., 2017; SPIRHZANOVA et al., 2017;

DZIECIOLOWSKA et al., 2017; MAHARAJAN et al., 2018; AZEVEDO-LINHARES et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018; LAJMANOVICH et al., 2019). Pelo modo no qual a busca foi realizada não foram encontrados estudos que avaliem os efeitos do PPF no desenvolvimento embrionário ou na neurogênese de aves, como por exemplo em *G. domesticus*. Os estudos encontrados nesta busca foram realizados na década de 1990 e descrevem a avaliação de metabólitos do PPF no fígado, rins e em excrementos de indivíduos adultos de *G. domesticus* (PANTHANI et al., 1996a; PANTHANI et al., 1996b).

A primeira etapa realizada em nosso estudo, foi avaliar a interferência da exposição com PPF na sobrevivência dos embriões de *G. domesticus*. A curva de sobrevivência é uma análise interessante que permite inferir o grau de toxicidade de determinada substância. Essa análise, foi utilizada para avaliar a proporção de indivíduos que responderam ao efeito do PPF no período de 96h após a sua administração, na idade embrionária E1. Os embriões expostos ao PPF demonstraram uma redução na taxa de sobrevivência, mas nenhuma concentração testada reduziu a sobrevivência a pelo menos 50%, desta forma não foi possível definir a LC50 para os embriões de *G. domesticus* neste experimento. Para diversos modelos experimentais são descritas curvas de sobrevivência com dados da LC50 (PADILLA et al., 2012; TRUONG et al., 2016; DZIECIOLOWSKA et al., 2017; HORIE et al., 2017; OSE et al., 2017; AZEVEDO-LINHARES et al., 2018), porém não foi encontrada literatura que descreve uma curva de sobrevivência para embriões de *G. domesticus* expostos ao larvicida PPF, destacando desta forma, a importância deste estudo. As concentrações de PPF utilizadas no presente estudo foram semelhantes às concentrações utilizadas para avaliar a neurotoxicidade do PPF em embriões e larvas de *D. rerio*, sendo observado 100% de letalidade nos indivíduos expostos à concentração de 1 mg/L após 5 dias de experimentos e 100% de letalidade com as concentrações de 10 mg/L e 100 mg/L em 2 dias de experimentos (DZIECIOLOWSKA et al., 2017). Nos estudos citados, diferentes concentrações do PPF foram descritas para a LC50 nos diferentes organismos analisados. Essas divergências na LC50, podem ser explicadas pela utilização do larvicida na sua formulação pura ou na formulação comercial que é composta por surfactantes, pelo modo no qual a exposição foi realizada, a idade de exposição dos organismos, o tempo de exposição ao PPF e os mecanismos de detoxificação entre as espécies estudadas. Adicionalmente, esses dados mostram a importância de utilizar diferentes modelos animais, pois os mesmos apresentam sensibilidade diferenciada quando expostas ao PPF.

Ao avaliar a massa corporal dos embriões em E10, observamos que os embriões expostos à concentração de 10 mg/L de PPF apresentaram redução da massa corporal quando comparado aos embriões controle, caracterizando os efeitos deletérios do PPF sobre o ganho de massa corporal. Estudos utilizando o PPF em altas concentrações na dieta alimentar de organismos adultos como ratos (KAWAGUCHI et al., 1988; MOORE et al., 1993), camundongos (COX et al., 1990) e cães (NAKANO et al., 1988) demonstraram a capacidade do PPF em reduzir a massa corporal dos organismos nas diferentes concentrações utilizadas e também nos diferentes períodos de exposição. Saegusa et al. (1988b) abordaram o efeito do PPF sobre o peso corporal em neonatos de ratos, observando redução na massa corporal. Spirhanzlova et al. (2017) ao expor girinos ao metabólito 4'OH-PPF, no período de 7 e 15 dias na concentração de 300 ppb, observaram retardo do peso corporal, e justificam essa redução pelos efeitos tóxicos sistêmicos do PPF juntamente com a redução do consumo de alimentos. Não observamos redução no comprimento dos embriões de *G. domesticus* expostos às concentrações de PPF. Dzieciolowska et al. (2017) ao analisar os efeitos do PPF na morfologia geral, como o comprimento total do corpo e o diâmetro dos olhos durante o desenvolvimento larval de *D. rerio*, também não encontraram diferenças significativas no comprimento do corpo. Acreditamos que a concentração de PPF que comprometeu a massa corporal dos embriões no presente estudo, possa ter causado também redução de reserva energética e de massa muscular, como observado em outro estudo, utilizando outras substâncias no desenvolvimento embrionário (CORREA et al., 2004).

Durante os experimentos da etapa II, observamos que a exposição de embriões de *G. domesticus* ao PPF causou anomalias congênitas relacionadas principalmente, a alterações visíveis na cabeça, e em maior porcentagem no grupo exposto a concentração de 10 mg/L de PPF, embora não significativas. Anomalias congênitas em embriões de *D. rerio* expostos ao PPF também foram relatadas por Horie et al. (2017), Dzieciolowska et al. (2017) e Maharajan et al. (2018), nas concentrações de 0,66 µg/mL, 1 µg/mL, 1,66 µg/mL, respectivamente. Azevedo-Linhares et al. (2018), também relataram deformidades expressivas em embriões e larvas de *R. quelen* expostas à concentração de 0,84 µg/L. Esses autores, descreveram diversas anomalias congênitas nos organismos, sendo que as mais frequentes foram os danos cefálicos, principalmente no tamanho de olhos e cabeça, assim como observado em nosso estudo. Esses danos podem prejudicar a alimentação e a reprodução do indivíduo, com consequências para a manutenção da população (AZEVEDO-LINHARES et al., 2018).

A redução significativa das medidas da distância cefálica ântero-posterior e distância cefálica transversal observadas em nosso estudo, evidencia a interferência do PPF no tamanho da cabeça dos embriões de *G. domesticus*, confirmando nossa hipótese científica. Estudos recentes que buscaram avaliar o envolvimento do PPF com os casos de microcefalia, utilizando vertebrados em estágios iniciais do desenvolvimento, observaram resultados significativos. Truong et al. (2016) demonstraram que o PPF foi capaz de induzir alterações morfológicas adversas, incluindo defeitos craniofaciais em *D. rerio* na concentração de 5,2  $\mu\text{M}$ . Nos estudos de Spirhanzlova et al. (2018) a exposição ao 4'OH-PPF, um metabólito do PPF na concentração de  $3 \times 10^{-1}$  mg/L, foi capaz de reduzir significativamente o tamanho da cabeça do *X. laevis*. Dzieciolowska et al. (2017) descrevem a exposição de *D. rerio* ao PPF letal em altas concentrações, mas não observaram malformações no crânio. Maharajan et al. (2018) também não observaram nenhum sinal de deformidade na região da cabeça de embriões *D. rerio*, mas relataram que a concentração de 1,66  $\mu\text{g/mL}$  de PPF induziu apoptose na região cefálica dos embriões. O PPF é utilizado para afetar negativamente a metamorfose de insetos e em estudos com outros organismos, efeitos negativos também foram observados. Portanto, autores como Truong et al. (2016) e Spirhanzlova et al. (2018) atestam que a toxicidade do PPF no desenvolvimento embrionário pode não estar limitada apenas à insetos.

A Sumitomo fabricante do PPF, apresentou em um dos seus relatórios (SAEGUSA, 1988a) que filhotes de fêmeas de ratos expostas durante a gestação à diferentes concentrações de PPF, não apresentaram alterações significativas na região cefálica, no sistema nervoso ou o sistema reprodutor. No entanto, Parens et al. (2017) em sua revisão, relatam que o relatório da Sumitomo, descreve baixa massa cerebral e um caso de microcefalia nos filhotes de ratos, ainda sugerem que o ensaio realizado pode não ter sido suficientemente sensível, já que foi amplamente restrito à análise do impacto em animais adultos. Destacamos que os dados observados em nosso estudo em conjunto com os trabalhos já publicados, apontam para uma redução da região cefálica de embriões de *G. domesticus* e em outros vertebrados, dados estes que devem ser levados em consideração. Em humanos, o diagnóstico de microcefalia já é considerado se o neonato apresentar um perímetro cefálico menor que 2 desvios-padrões abaixo da média específica para o sexo e idade gestacional (MOCHIDA, 2009), sendo definidos 30,24 cm para meninas e 30,54 cm para meninos, em 24-48h de vida (VILLAR, 2014; WHO, 2016).

Buscamos analisar morfológicamente o encéfalo dos embriões de *G. domesticus* expostos ao PPF, e observamos que a concentração de 10 mg/L de PPF utilizada no estudo foi

capaz de reduzir a massa encefálica e a largura do encéfalo, assim como reduziu as medidas das vesículas encefálicas. A maior concentração de PPF foi capaz de reduzir a largura e comprimento do telencéfalo. O PPF também reduziu a largura do mesencéfalo, e reduziu medidas da região rostral, caudal e do teto do mesencéfalo. Diante dos resultados obtidos, aceitamos a hipótese científica proposta de redução das medidas do encéfalo e das vesículas encefálicas pela ação do PPF. Essas alterações morfológicas, podem indicar um atraso no desenvolvimento do encéfalo. E sendo o encéfalo um importante órgão que coordena e regula as atividades corporais (pois é o centro do sistema nervoso em todos os animais vertebrados e em muitos invertebrados), anomalias congênitas ocorridas neste órgão podem ter efeitos sobre todo o organismo. A microcefalia por exemplo, pode causar retardo no desenvolvimento cognitivo, motor e fala, além de problemas de visão e audição (OPTIZ e HOLT, 1990). Alterações no teto óptico do mesencéfalo, por exemplo, podem causar efeitos diretos sobre a visão dos indivíduos, uma vez que este é o centro visual de aves (LAVAIL e COWAN, 1971).

Considerando a redução das medidas nas vesículas encefálicas, optou-se por investigar o efeito do PPF sobre a espessura das camadas do telencéfalo e do mesencéfalo. A avaliação da espessura das camadas celulares é um importante parâmetro de análise durante o desenvolvimento, uma vez que pode indicar alterações no balanço dos mecanismos como proliferação, diferenciação, migração e apoptose os quais são necessários para o estabelecimento de camadas celulares funcionais (FARAH, 2006). Os dados das morfometrias mostraram que o PPF reduziu a espessura da maioria das camadas celulares do telencéfalo e do teto do mesencéfalo. O cálculo da NA também indicou redução de células na maioria destas camadas celulares. Desta forma, aceitamos a hipótese de redução na espessura e da densidade numérica de células por área (NA) das camadas celulares do telencéfalo e mesencéfalo. A redução na espessura das camadas celulares do telencéfalo (epêndimária e cortical) e do mesencéfalo (epêndimária; I; IV e V; VI; VII) está diretamente ligada a redução da densidade celular, o que nos faz acreditar que o PPF tem efeito deletério sobre as células neurais. Logo, a redução de alguns tipos de células neurais, estaria diretamente ligada a redução das camadas celulares, que estão ligadas às reduções nas medidas das vesículas encefálicas, que por sua vez estão ligadas às reduções nas medidas como largura e massa do encéfalo. Algumas das camadas celulares são compostas majoritariamente por prolongamentos celulares, a exemplo da camada VII, acredita-se que camadas com essa configuração tiveram redução de espessura devido à redução de células como comprovado pelo cálculo da NA, e que possivelmente os neurônios

que sobreviveram também apresentaram redução de seus prolongamentos, o que poderia ser avaliado em estudos seguintes, baseado no método de Golgi (1873).

Considerando a redução das medidas do encéfalo, das vesículas encefálicas e da espessura e NA das camadas celulares, procedemos com a avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais, para avaliar a viabilidade das células neurais. Em nosso estudo, a utilização do ensaio do MTT utilizando encéfalos de embriões de *G. domesticus*, não demonstrou reduções significativas de viabilidade celular frente à exposição ao PPF. Sendo assim, rejeitamos a hipótese de redução da viabilidade celular no encéfalo. Liu et al. (2019) relataram a perda da viabilidade celular juntamente com a perda da função mitocondrial em hepatócitos de ratos adultos expostos ao PPF.

Em nosso estudo, foram realizadas análises por meio da reação histoquímica com vermelho de Alizarina para observar processos de ossificação intramembranosa e reação histoquímica com azul de Alcian para observar processos de ossificação endocondral na cabeça de embriões de *G. domesticus*. Embora a reação com azul de Alcian apresentou-se mais intensa do que a reação com vermelho de Alizarina, não foram observadas diferenças significativas na intensidade das reações entre os grupos experimentais, indicando que o PPF não interferiu nos processos de ossificação intramembranosa ou endocondral na região cefálica. Logo, rejeitamos a hipótese de aumento dos centros de ossificação na cabeça. O estágio de ossificação observado nas análises, é condizente com o que se espera, onde alguns ossos da cabeça começam a ser ossificados a partir do dia embrionário E9 (ROMANOFF, 1960). Os resultados não parecem apontar a ossificação como causa das reduções nas medidas do encéfalo de embriões de *G. domesticus* estudados em E10.

Levando em conta que os casos de microcefalia são causados também pelo retardo no processo de divisão de células progenitoras e na diferenciação neural (FAHEEM et al., 2015), é possível pressupor que o PPF possa agir no processo de proliferação celular. O anticorpo anti-Fosfo-histona H3 foi utilizado como marcador celular de proliferação, uma vez que a proteína histona H3 fosforilada é necessária no processo de condensação da cromatina durante o processo de divisão celular (POLO e ALMOUZNI, 2005). Em nosso estudo, foi realizada a imunolocalização e a quantificação da proteína Fosfo-histona H3 nos encéfalos de embriões de *G. domesticus*, e observou-se que o PPF foi capaz de reduzir a proliferação celular, confirmando nossa hipótese científica. A análise celular demonstrou marcação positiva para esta proteína, principalmente na camada ependimária, sendo esta camada uma região importante onde

localizam-se as células precursoras dos neurônios e das células da glia. A redução da proliferação celular como efeito do PPF, ainda é pouco descrita em estudos com vertebrados. Liu et al. (2019) também descreveram a redução da proliferação celular, porém em hepatócitos de ratos adultos expostos à diferentes concentrações de metabólitos do PPF.

É descrito que alterações no hormônio tireoideano podem atuar diretamente na proliferação celular durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico, alterando a proliferação de células-tronco, diferenciação, migração, sinaptogênese e mielinização de neurônios (BERNAL, 2005; MORREALE DE ESCOBAR et al., 2004). E como o larvicida PPF é documentado como um disruptor químico do hormônio tireoideano (SPIRHZANOVA, et al., 2017; MAHARAJAN et al., 2018), alterações neste hormônio, podem estar atuando na proliferação celular do encéfalo como observado em nosso estudo com *G. domesticus*.

Ao observar a redução da proliferação celular, optou-se por investigar o conteúdo da proteína  $\gamma$ -H2A.X. A histona H2A.X fosforilada ( $\gamma$ -H2AX) é usada como um marcador de resposta celular à quebra de dupla fita do DNA (VALDIGLESIAS et al., 2013). Em nosso estudo, foi realizada a imunolocalização e a quantificação da proteína  $\gamma$ -H2A.X nos encéfalos de embriões de *G. domesticus*, e de fato, os resultados deste estudo apontam para o aumento do dano ao DNA em embriões expostos ao PPF na maior concentração analisada, o que confirma nossa hipótese científica. A exposição ao larvicida PPF também induziu danos ao DNA em embriões de *D. rerio* (MAHARAJAN et al., 2018) e em ratos adultos (LIU et al., 2019) dados estes, obtidos através do ensaio cometa que é amplamente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de substâncias através da quebra da dupla fita de DNA (LEE et al., 2003).

As alterações na integridade do DNA podem comprometer mecanismos como a replicação do DNA, a transcrição de genes, os quais afetam os mecanismos de proliferação, diferenciação, podendo levar a morte celular. A morte celular por apoptose, é um mecanismo importante durante o desenvolvimento embrionário, atuando na remoção de células excedentes e modelagem de estruturas e órgãos (veja detalhes na revisão proposta por DOSEFF, 2004). A Caspase 3 é utilizada como um marcador de apoptose e pertence a uma família de caspases que são proteases que podem ser ativadas por diversos estímulos apoptóticos, sendo a Caspase 3 a efetora de apoptose, responsável pela clivagem de vários substratos celulares (PORTER et al., 1999). Em nosso estudo, foi realizada a imunolocalização e a quantificação da proteína Caspase 3 nos encéfalos de embriões de *G. domesticus* e não foram observadas alterações significativas no processo de apoptose pela análise do conteúdo da proteína Caspase 3. Porém, o aumento de

células apoptóticas foi evidenciado pela aplicação do método de TUNEL, no telencéfalo e no mesencéfalo do grupo exposto à maior concentração de PPF, confirmando desta forma, a hipótese científica de aumento de apoptose frente à exposição de PPF. Sugerimos que a imunohistoquímica para Caspase-3 não tenha sido sensível a ponto de apresentar alterações significativas desta proteína na idade embrionária E10, diferentemente do método de TUNEL. Galluzzi et al. (2012) descrevem que a apoptose é ativada por duas vias, onde a via extrínseca indica a morte celular induzida por estresses extracelulares e a via intrínseca está relacionada aos indicadores de dano ao DNA, estresse intracelular ou estresse oxidativo, ambas são induzidas pelas proteínas da família caspase. Maharajan et al. (2018) e Lajmanovich et al. (2019) demonstram que o PPF induziu danos celulares, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que provocam estresse oxidativo, que por sua vez podem estimular efeitos tóxicos para as células e levar à apoptose.

Esses dados nos fazem acreditar que a redução na proliferação celular podem ser o resultado de quebras de fita dupla no DNA induzidas pelo PPF no desenvolvimento de tecido neural dos embriões de *G. domesticus*. É descrito que o dano ao DNA pode ativar a expressão de p53, a qual atua como um fator de transcrição para produtos gênicos, como p21 e PCNA que controlam a progressão do ciclo celular (ZANG et al., 2011), que envolvem a expressão da Ciclina E até que o dano possa ser reparado (JOERGER e FERSHT, 2008). Danos ao DNA comprometem mecanismos vitais para o desenvolvimento, que afetam diretamente a proliferação, diferenciação, portanto é necessário que ocorra um mecanismo de reparo celular (KRUMAN et al., 2002; OIKAWA et al., 2003). A confirmação do aumento do dano ao DNA (observado pelo aumento do conteúdo da proteína  $\gamma$ -H2A.X) pode indicar interrupção do ciclo celular, o que reduziu a capacidade proliferativa das células (observada pela redução do conteúdo da proteína Fosfo-histona H3) e quando não realizado o reparo, a célula foi conduzida à apoptose, como de fato, foi observado pelo aumento de células reativas para TUNEL. Esses danos a nível celular podem ter impactado na morfologia do encéfalo dos embriões de *G. domesticus*, o que interferiu diretamente na densidade celular, reduzindo a espessura das camadas celulares do telencéfalo e do mesencéfalo e conseqüentemente a massa do encéfalo.

Para investigar o efeito do PPF sobre a diferenciação neuronal, optou-se por investigar o conteúdo da proteína  $\beta$ 3 Tubulina. Essa, pertence a um grupo de proteínas do citoesqueleto que proporciona manutenção da morfologia e mobilidade aos neurônios principalmente durante a migração, sendo o subtipo 3 predominantemente encontrado no cérebro, e amplamente

utilizado como marcador para neurônios jovens (BRADY et al., 2009). Em nosso estudo, foi realizada a imunolocalização e a quantificação da proteína  $\beta$ 3-Tubulina nos encéfalos de embriões de *G. domesticus* e não foram observadas alterações significativas no processo de diferenciação neuronal. Desta forma, rejeitamos a hipótese de diminuição de diferenciação neuronal frente à exposição ao PPF. Nossos resultados são semelhantes aos observados por Dzieciolowska et al. (2017), que avaliaram linhagens transgênicas *elavl3 : GFP* de *D. rerio* que expressavam GFP em neurônios jovens expostos a concentrações de PPF e também não observaram alterações no conteúdo de neurônios.

A diferenciação glial foi analisada através do conteúdo da proteína GFAP. Essa é a principal proteína dos filamentos intermediários de astrócitos e também está presente em células da glia radial (ENG et al., 2000; CAMPBELL e GÖTZ, 2002). Em nosso estudo, foi realizada a imunolocalização e a quantificação da proteína GFAP nos encéfalos de embriões de *G. domesticus* e não foram observadas alterações significativas no processo de diferenciação glial. Como já citado, as camadas celulares das vesículas encefálicas apresentaram redução de espessura frente a exposição do PPF, e embora os processos de diferenciação neuronal e glial não foram afetados, sugere-se que o PPF pode ter afetado os progenitores neurais. Dzieciolowska et al. (2017), ao avaliarem o efeito de concentrações de PPF no desenvolvimento de embriões de *D. rerio*, quantificaram o conteúdo de proteínas GFAP através da técnica de citometria de fluxo, e também não observaram alterações no conteúdo de células da glia.

Embora não significativo, notou-se elevação do conteúdo de GFAP principalmente no grupo exposto à concentração de 0,01 mg/L de PPF. Logo, rejeitamos a hipótese de diminuição de diferenciação glial frente à exposição ao PPF. Astrócitos e micróglias atuam como suporte neuronal e em resposta a ação de substâncias tóxicas, tornam-se reativas, constituindo a chamada gliose reativa, onde ocorre hipertrofia do corpo celular e dos processos astrocitários bem como o aumento do conteúdo de proteínas do citoesqueleto como a GFAP (NORTON et al., 1992; PITANGA et al., 2012; BURDA e SOFRONIEW, 2014). Como resposta celular, é requerida uma restauração do tecido afetado através da produção de fatores neurotróficos e citocinas auxiliam na sobrevivência neural (NORTON et al., 1992; GIMENEZ Y RIBOTTA, 2001). Essa resposta celular, pode variar em intensidade, dependendo do dano causado. Assim, pode ocorrer um processo inflamatório e em seguida, uma deposição de matriz extracelular onde um perceptível aumento na expressão de GFAP (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Embora não significativa, a elevação no conteúdo de GFAP observada no presente estudo, pode indicar o processo de gliose reativa frente à exposição ao PPF. O processo de gliose reativa

pode ter ocorrido em uma idade embrionária anterior e estar sendo revertida em E10, o que explicaria a elevação do conteúdo desta proteína, embora não diferindo significativamente do grupo controle. Uma análise em uma idade embrionária anterior poderia elucidar essa questão.

Embora existam muitas variáveis que possam influenciar a toxicidade do PPF, e com isso, interferir nos processos celulares, ainda não está elucidado como o PPF atua sobre o SNC de vertebrados. Logo, estudos que avaliem diversos eventos celulares para entender como o PPF interfere nas vias de sinalização fazem-se necessários, inclusive em outras idades embrionárias a fim de avaliar se este larvicida é dependente da temporalidade, atuando de forma diferente na formação das estruturas do SNC. A avaliação de eventos celulares envolvidos no ciclo celular, na sobrevivência e manutenção de células neurais, bem como a integridade da barreira hematoencefálica a qual permite permeabilidade seletiva à diversas substâncias, podem auxiliar no entendimento dos efeitos do PPF sobre o SNC. Além disso, a análise dos compartimentos subcelulares e estudos moleculares são necessários para uma melhor compreensão do efeito do PPF no SNC de organismos como embriões de *G. domesticus*.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta dissertação revelam dados inéditos e importantes sobre a morfologia e os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento do encéfalo de embriões de *G. domesticus* utilizados como modelo de estudo, expostos ao PPF.

Dentre as principais conclusões obtidas destacam-se que as diferentes concentrações de PPF não impactaram na sobrevivência dos embriões; as concentrações consideradas seguras do PPF causaram redução nas biometrias corporais e do encéfalo, porém não foi observada alteração do processo de ossificação do crânio; o PPF causou dano ao DNA, reduziu a proliferação celular e induziu aumento da morte celular por apoptose e; o PPF causou redução na espessura e na densidade de células nas camadas do telencéfalo e no mesencéfalo.

Por fim, acreditamos que o aumento do dano ao DNA indica uma interrupção do ciclo celular, o qual reduziu a capacidade proliferativa das células e quando o dano não foi reparado, a célula foi conduzida à apoptose. A redução de alguns tipos de células neurais, como por exemplo o progenitores neurais, uma vez que não foram observadas alterações no conteúdo de neurônios e células da glia, podem ter relação direta com a redução da espessura e densidade celular das camadas celulares do telencéfalo e mesencéfalo, o que interferiu diretamente nas medidas do encéfalo dos embriões de *G. domesticus* em E10.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABRASCO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. Nota técnica sobre microcefalia e doenças vetoriais relacionadas ao *Aedes aegypti*: os perigos das abordagens com larvicidas e nebulizações químicas – fumacê. Disponível em: <<https://www.abrasco.org.br/site/outras-noticias/institucional/nota-tecnica-sobre-microcefalia-e-doencas-vetoriais-relacionadas-ao-aedes-aegypti-os-perigos-das-abordagens-com-larvicidas-e-nebulizacoes-quimicas-fumace/15929/>>. Acesso em: 16 jul. 2018.
- ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; DE SOUZA W. V.; DE MENDES, A. C. G.; LYRA T. M.; XIMENES, R. A.; ARAÚJO, T.V.; BRAGA, C.; MIRANDA-FILHO, D. B.; MARTELLI, C. M.; RODRIGUES, L. C. Pyriproxyfen and the microcephaly epidemic in Brazil - an ecological approach to explore the hypothesis of their association. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 111, p.774–776, 2016.
- ARAI, Y.; TAVERNA, E. Neural progenitor cell polarity and cortical development. *Frontier in Cellular Neuroscience*. v. 11, n. 384, 2017.
- ARAÚJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, K. C. C.; SOUZA, K. S.; AZEVEDO, R. S.; ALVES, M. H. M. E.; SILVA, L. Ç.; SILVA, V. L. ADAM, M. L.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S.; OLIVEIRA, M. B. L. Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. *Aquatic Toxicology*. v. 205, p. 213–226, 2018.
- AZEVEDO-LINHARES, M.; SOUZA, A. T. C.; LENZ, C. A.; LEITE, N. F.; BRITO, I. A.; FOLLE, N. M. T.; GARCIA, J. E.; FELIPAK NETO, F. ; RIBEIRO, C. A. O. Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 166, p. 311–319, 2018.
- BARRY, D.; MCDERMOTT, K. Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. *Glia*. v. 50, n. 3, p. 187-197, 2005.
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. *The Atlas of Chick Development*. 3. ed. London: Academic Press, 2014.
- BERNAL, J. Thyroid Hormones and Brain Development. In *Vitamins and Hormones*. Academic Press. v. 438, p. 95-122, 2005.
- BRADY, S.; COLMAN, D. R.; BROPHY, P. *From Molecules to Networks*. Elsevier. 2004.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Orientações técnica para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*. Brasília: [s.n.], 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo de Vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do Sistema Nervoso Central (SNC). Brasília-DF. 2015.

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: situação epidemiológica, ações desenvolvidas e desafios, 2015 a 2019. *Boletim Epidemiológico*. v. 50, p. 1-31, nov. 2019.
- BURDA, J. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. v. 81, n.2, p. 229-248, 2014.
- BUSS, R. R.; SUN, W.; OPPENHEIM, R. W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annual Review of Neuroscience*. v. 29, p. 1-35, 2006.
- CAMPBELL, K.; GÖTZ, M., Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences*. v. 25, n. 5, p. 235-238, 2002.
- CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC Concludes Zika Causes Microcephaly and Other Birth Defects. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/media/releases/2016/s0413-zika-microcephaly.html>>. Acesso em: 1 out. 2018.
- CHŁOPECKA, M.; MENDEL, M.; DZIEKAN, N.; KARLIK, W. The effect of pyriproxyfen on the motoric activity of rat intestine - In vitro study. *Environmental Pollution*. v. 241, p. 1146–1152, 2018.
- COLAS, J. F.; SCHOENWOLF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics*. v. 221, n. 2, p. 117-145, jun. 2001.
- COLLINS, M. D.; MAO, G. E. Teratology of retinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. v. 39, n. 1, p. 399, 1999.
- CORREA, M.; ROIG-NAVARRO, A. F.; ARAGON C. M. G. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sciences*. v. 74, n. 16, p. 2009-2021, 2004.
- COSTA, L. G.; PELLACANI, C.; GUIZZETTI, M. In Vitro and Alternative Approaches to Developmental Neurotoxicity. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. Elsevier, p. 241–253, 2017.
- COTGREAVE, I.; GHAVANINI, A. A.; ALFARO-MORENO, E.; BERGMAN, A.; CEDERBRANT, K.; FORSBY, A.; FÖRARE, J.; GUSTAFSSON, A.; HELLMOLD, H.; LINDBERG, J; LUPU, L.; NORINDER, U.; RÜEGG, J.; TANG M.; ÖBERG, M.; KYLIN, H.; ANDERSSON, P.; ZHANG, Z.; JAKOBSSON, K.; LINDH, B.; DEMENEIX, B.; KNUDSEN, L. Pyriproxifen and microcephaly: An investigation of potential ties to the ongoing "Zika epidemic". The Swedish Center for Toxicology Sciences, 2016.
- COX, R. H.; ZOETIS, T.; VOELKER, R. W.; ALSAKER, R. D.; KUHLMAN, S. M.; LEWIS, S. A.; THAKUR, A. K.; PHIPPS, N. G. Subchronic toxicity study in mice. Unpublished study from Hazleton Laboratories America, Inc. Reference No. NNT-01-0066. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd, 1990.

- COWAN W. M.; ADAMSON L.; POWELL T. P. An experimental study of the avian visual system. *Journal of Anatomy*. v. 95, p. 545–563, 1961.
- DAHLSTRAND, J.; ZIMMERMAN, L. B.; MCKAY, R. D.; LENDAHL, U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *Journal of Cell Science*. v. 103, n. 2, 1992.
- DELEAN, A.; MUNSON, P. J.; RODBARD, D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. v. 235, n. 2, p. 97–102, 1978.
- DIVE. DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. SANTA CATARINA. BRASIL. Orientações para uso do larvicida Pyriproxyfen 0,5G no Programa de Controle da Dengue em Santa Catarina. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Florianópolis: [s.n.], 2014.
- DOMOWICZ, M. S.; HENRY, J. G.; WADLINGTON, N.; NAVARRO, A.; KRAIG, R. P.; Schwartz, N. B. Astrocyte precursor response to embryonic brain injury. *Brain Research*, v. 1389, p. 35–49, 2011.
- DOSEFF, A. I. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells and Development*. v. 13, n. 5, p. 473-483, 2004.
- DZIECIOLOWSKA, S.; LARROQUE, A. L.; KRANJEC, E. A.; DRAPEAU, P.; SAMARUT, E. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Scientific Reports*. v. 7, p. 40067, 2017.
- EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyriproxyfen. *EFSA Scientific Report*. v. 336; p. 1-99, 2009.
- ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S. GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*. v. 4, n.3, p. 229–237, 1994.
- ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; Lee, Y. L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochemical Research*. v. 25, n.9/10, p. 1439-1451, 2000.
- EVANS, D.; NIJHOUT, F.; PARENS, R.; MORALES, A. J.; BAR-YAM, Y. A possible link between pyriproxyfen and microcephaly. *PLoS Current*. v. 9, p. 1-6, 2017.
- FAHEEM, M.; NASEER, M. I.; RASOOL, M.; CHAUDHARY, A.; KUMOSANI, T. A.; ILYAS, A. M.; PUSHPARAJ, P. M.; AHMED, F.; ALGAHTANI, H. Á.; AL-QAHTANI, M. H.; JAMAL, H. S. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Medical Genomics*. v. 8, 2015.
- FARAH, M. H. Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina. *Brain Research Reviews*. v. 52, n. 2, p. 264-274, 2006.

- FATHULLA, R. N.; OHNO, N. Determination of Degradation Rate Constants and Half-Lives of 4'-OH-Pyr and PYPAC, Sumitomo Chemical Company, Data Package Report No. 156629-N. DPR No. 52080-075, 1993.
- FRIAS, P.G.; SZWARCOWALD, C. L.; LIRA, P. I. C. Avaliação dos sistemas de informações sobre nascidos vivos e óbitos no Brasil na década de 2000. Caderno de Saúde Pública. v. 30, n. 10, p. 2068-2080, out. 2014.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death and Differentiation. v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.
- GARCÍA-MORENO, F.; ANDERTON, E.; JANKOWSKA, M.; BEGBIE, J.; ENCINAS, J. M.; IRIMIA, M.; MOLNÁR, Z. Absence of tangentially migrating glutamatergic neurons in the developing avian brain. Cell Reports. v. 22, n. 1, p. 96-109, 2018.
- GHASEMI, A.; SENDI, J.; GHADAMYARI, M. Physiological and biochemical effect of pyriproxyfen on indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Plant Protection Research. v. 50, n. 4, p. 416-422, 2010.
- GILBERT, S. F. Biologia do desenvolvimento. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC editora, 2003.
- GIMENEZ Y RIBOTTA, M.; MENET, V.; PRIVAT, A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. Progress in Brain Research. v. 132, p. 587-610, 2001.
- GOLDBERG, S. Studies on the mechanisms of development of the visual pathways in the chick embryo. Developmental Biology. v. 36, p. 24-43, 1974.
- GOLGI, C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. Gazzetta Medica Italiana - Lombardia. v. 6, p. 244-246, 1873.
- GOODFELLOW, F.; TESLA, B.; SIMCHICK, L.; ZHAO, Q.; HODGE, T.; BRINDLEY, M.; STICE, S. L. Zika virus induced mortality and microcephaly in chicken embryos. Stem Cells and Development. v. 25, n. 22, p. 1691-1697, 2016.
- GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology. v. 6, n. 10, p. 777-788, 2005.
- GOZES, I. Tubulin in the nervous system. Neurochemistry International. v. 4, n. 2-3, p. 101-120, 1982.

- GREENBERG, R. W.; LANE, E. L.; CANELA, J.; FARMER, P.; HYMAN, R. A. The cranial meninges: anatomic considerations. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. v. 15, n. 6, p. 454-465, 1994.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*. v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.
- HARMON, M. A.; BOEHM, M. F.; HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 92, n. 13, p. 6157-6160, 1995.
- HATAKOSHI, M.; KAWADA, H.; NISHIDA, S.; KISIDA, H.; NAKAYAMA, I. Laboratory evaluation of 2-[1-methyl-2-(4-phenoxyphenoxy) ethoxy] pyridine against larvae of mosquitoes and housefly. *Medical Entomology and Zoology*. v. 38, n. 4, p. 271-274, 1987.
- HILLIER, L.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*. v. 432, p. 695-716, 2004.
- HIROHASHI, A.; KANNAN, N.; KATO, T.; YAMADA, H. Study of S-31183 by oral administration during the period of fetal organogenesis in rabbits. Unpublished study reference No. NNT-80-0033. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1988.
- HORIE, Y.; YAMAGISHI, T.; TAKAHASHI, H.; SHINTAKU, Y.; IGUCHI, T.; TATARAZAKO, N. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *Journal of Applied Toxicology*. v. 37, n. 10, p. 1245-1253, 2017.
- JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annual Review of Biochemistry*. v. 77, n.1, p. 557-582, 2008.
- KAWADA, H.; DOHARA, K.; SHINJO, G. Evaluation of larvicidal potency of insect growth regulator, 2-[1-methyl-2-(4-phenoxyphenoxy) ethoxy] pyridine, against the housefly, *Musca domestica*. *Medical Entomology and Zoology*. v. 38, n. 4, p. 317-322, 1987.
- KAWAGUCHI, S.; YOSHIOKA, K.; ITO, S.; SUZUKI, T.; KATO, T.; YAMADA, H. Subacute inhalation toxicity of S-31183 in rats. Unpublished study reference No. NNT-80-0031. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd, 1988.
- KINTNER, C.; KOYANO-NAKAGAWA, N., Neurogenesis in the vertebrate embryo. *Essentials of Stem Cell Biology*. v. 1, p. 157-167, 2009.
- KIRKPATRICK, L. L.; BRADY, S. T. Molecular Components of the Neuronal. *In: SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; FISHER, S. K.; UHLER, M. D. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
- KOBUS, K. Ação da homocisteína e do ácido fólico sobre o padrão morfológico e estrutura

- organizacional do telencéfalo e medula espinhal de embriões de *Gallus domesticus*. 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- KRIEGSTEIN, A.; NOCTOR, S.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nature Reviews Neuroscience*. v. 7, n. 11, p. 883-890, 2006.
- KRUIDERING, M.; EVAN, G. I. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of “the end”? *IUBMB life*. v. 50, p. 85-90, 2000.
- KRUMAN, I. I.; KUMARAVEL, T. S.; LOHANI, A.; PEDERSEN, W. A.; CUTLER, R. G.; KRUMAN, Y.; HAUGHEY, N.; LEE, J.; EVANS, M.; MATTSON, M. P. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroscience*. v. 22, p. 1752-1762, 2002.
- LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; MARTINUZZI, C. S.; ATTADEMO, A. M.; BASSÓ, A.; COLUSSI, C. L. Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. *Chemosphere*. v. 220, p. 714-722, 2019.
- LAVAIL, J. H.; COWAN W. M. The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Research*. v. 28, n. 3, p. 391–419, 1971.
- LEGRAND, E.; BOULANGÉ-LECOMTE, C.; RESTOUX, G.; TRÉMOLET, G.; DUFLOT, A.; FORGET-LERAY, J. Individual and mixture acute toxicity of model pesticides chlordecone and pyriproxyfen in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Science and Pollution Research*. v. 24, n. 6, p. 5976-5984, 2017.
- LEDUC, C.; ETIENNE-MANNEVILLE, S. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*. v. 16, n. 15, p. 1389-1390, 2017.
- LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*. v. 544, p. 43-64, 2003.
- LENT, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- LIU, H.; LI, P.; WANG, P.; LIU, D.; ZHOU, Z. Toxicity risk assessment of pyriproxyfen and metabolites in the rat liver: a vitro study. *Journal of Hazardous Materials*. dez. 2019.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 246, 1994.
- MAHARAJAN, K.; MUTHULAKSHMI, S.; NATARAJ, B.; RAMESH, M.; KADIRVELU,

- K. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquatic Toxicology*. v. 196, n. January, p. 132–145, 2018.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.
- MARINHO, F.; DE ARAÚJO, V. E. M.; PORTO, D. L.; FERREIRA, E. L.; COELHO, M. R. S.; LECCA, R. C. R.; DE OLIVEIRA, H.; PONCIONI, I. P. A; MARANHÃO, M. H. N.; BRANDÃO E MENESES, Y. M. M.; FERNANDES, R. M.; DE LIMA, R. B.; NETO, D. L. R. Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. v. 25, n. 4, p. 701-712, set. 2016.
- MOCHIDA, G. H. Genetics and biology of microcephaly and lissencephaly. *Seminars in Pediatric Neurology*. v. 16, n. 3, p. 120-126, 2009.
- MOLNÁR, Z.; TAVARE, A.; CHEUNG, A. F. P. The origin of neocortex: lessons from comparative embryology. *evolution of nervous systems*. p. 13-26, 2007.
- MOODY, S. A. Cell lineage and fate determination. Washington: Elsevier. p. 1-644. 1999.
- MOORE, M. R.; ZOETIS, T.; DOYLE, D.; CARDY, R. H.; PEARSON, R. C.; WALKER, M. D.; LEWIS, S. A.; THOMAS, D. L.; THAKUR, A. K.; BURLEW, P. L.; Hatcher, C. F; VEGARRA, M. 21-day dermal toxicity study in rats with S-31183. Unpublished study from Hazleton Washington, Inc. Reference No. NNT-31-0094. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd, 1993.
- MOORE, K. L.; PERSAUD T. V. N.; TORCHIA, M. G. *Embriologia Clínica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGON, M. J.; and ESCOBAR DEL REY, F. Role of thyroid hormone during early brain development. *European Journal of Endocrinology*. v. 151, n. 3, p. 25-37, 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. v. 116, n.1, p. 201-11, 1992.
- MUOTRI, A. R.; GAGE, F. H. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*. v. 441, n. 7097, p. 1087-1093, 2006.
- NAKANO, M.; KOHDA, A.; KATO, T.; YAMADA, H. Three-month oral toxicity study of S31183 in dogs. Unpublished study reference No. NNT-80-0037. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd, 1988.

- NEMEC, V.; KODRIK, D.; MATOLIN, S.; LAUFER, H. Juvenile hormone-like effects of retinoic acid in insect metamorphosis, embryogenesis and reproduction. *Journal of Insect Physiology*. v. 39, p. 1083-1093, 1993.
- NORTON, W. T.; AQUINO, D. A.; HOZUMI, I.; CHIU, F. C.; BROSINAN, C. F. Quantative aspects of reactive gliosis. A review. *Neurochemical Research*. v. 17, p. 877-885, 1992.
- OIKAWA, S.; MURAKAMI, K.; KAWANISHI, S. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene*. v. 22, p. 3530-3538, 2003.
- OPITZ, J. M.; HOLT, M. C. Microcephaly: general considerations and aids to nosology. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*. v. 10, n. 2, p. 175-204, 1990.
- OSE, K.; MIYAMOTO, M.; FUJISAWA, T.; KATAGI, T. Bioconcentration and metabolism of pyriproxyfen in tadpoles of african clawed Frogs, *Xenopus laevis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 65, n. 46, p. 9980-9986, 2017.
- PADILLA, S.; CORUM, D.; PADNOS, B.; HUNTER, D. L.; FEIXE, A.; HOUCK, K. A.; Sipes, N.; Kleinstreuer, N.; Knudsen, T.; Dix, D. J.; Reif, D. M. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reproductive Toxicology*. v. 33, n. 2, p. 174-187, 2012.
- PALLI, S. R.; RIDDIFORD, L.M.; HIRUMA, K. Juvenile hormone and “retinoic acid” receptors in *Manduca epidermis*. *Insect Biochemistry*. v. 21, n. 1, p. 7-15, 1991.
- PANTHANI, A. M.; DIFRANCESCO, P.; SAVIDES, M. C. Metabolism of [phenoxyphenyl-14C] S-71639 (pyriproxyfen) in laying hens. Unpublished study from Ricerca, Inc. Reference No. NNM-0045. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1996a.
- PANTHANI, A. M.; DIFRANCESCO, P.; SAVIDES, M. C. Metabolism of [pyridyl-14C] S71639 (pyriproxyfen) in laying hens. Unpublished study from Ricerca, Inc. Reference No. NNM-0044. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1996b.
- PARENS, R.; NIJHOUT, H. F.; MORALES, A.; COSTA, F. X.; BAR-YAM, Y. A possible link between pyriproxyfen and microcephaly. *PLoS Currents*. v. 9, 2017.
- PERSON, F.; WILCZAK, W.; HUBE-MAGG, C.; BURDELSKI, C.; MÖLLER-KOOP, C.; SIMON, R.; NORIEGA, M.; SAUTER, G.; STEURER, S.; BURDAK-ROTHKAMM, S.; JACOBSEN, F. Prevalence of  $\beta$ III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. *Tumor Biology*. v. 39, n. 10, p. 1-11, 2017.
- PETTMANN, B.; HENDERSON, C. E. Neuronal cell death. *Neuron*. v. 20, n. 4, p. 633-647, 1998.
- PITANGA, B. P. S.; NASCIMENTO, R.; SILVA, V.; COSTA, S. The role of astrocytes in metabolism and neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, the main toxin of *Crotalaria retusa*. *Frontiers in Pharmacology*. v. 3, p.144, 2012.

- POLO, S. E.; ALMOUZNI, G., Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Letters*. v. 220, n.1, p. 1-9, 2005.
- PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U.; NICKE, E. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. v. 6, p. 99-104, 1999.
- PRÉAU, L.; FINI, J. B.; MORVAN-DUBOIS, G.; DEMENEIX, B. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1849, n. 2, p.112-21, 2015.
- RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A.; PETERSEN, L. R. Zika virus and birth defects - reviewing the evidence for causality. *New England Journal of Medicine*. v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.
- RHINN M.; DOLLE P. Retinoic acid signalling during development. *Development*. v. 139, p. 843-858, 2012.
- RIVERO, L. B. D. O.; SCHATZ, J. C.; CARVALHO, M. S. L.; DE CARVALHO, M. C.; RAUH MÜLLER, Y. M. Ação do acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. v. 1, n. 1, p. 83-87, 2006.
- ROBINSON, K.; WASHER, G.; NOVEROSKE, J. A dietary 2-generation (1 litter) reproduction study of S-31183 in the rat. Unpublished study from Bio-Research Laboratories Ltd. Reference No. NNT-11-0087. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1991.
- ROESSMANN, U.; VELASCO, M. E.; SINDELY, S. D.; GAMBETTI, P. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Research*. v. 200, n. 1, p. 13-21, 1980.
- ROMANOFF, A. L. The avian embryo. Structural and functional development. New York: The Macmillan Company, 1960.
- SAEGUSA, T; KITAJIMA, S.; NARAMA, I. SUMILARV - Study of 5-31183 by oral administration during the period of fetal organogenesis in rats. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1988a.
- SAEGUSA, T.; KITAJIMA, S.; NARAMA, I. Study on administration of a test substance prior to and in the early stages of pregnancy in rats. Unpublished study from Hamamatsu, Seigiken Research Co., Ltd. Reference No. NNT-80-0036. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1988b.
- SAEGUSA, T.; KITAJIMA, S.; NARAMA, I. Study on administration of S-31183 during the perinatal and lactation periods in rats. Unpublished study from Hamamatsu, Seigiken Research Co., Ltd. Reference No. NNT-80-0030 Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1988c.

- SAEGUSA, T.; KITAJIMA, S.; NARAMA, I. Study by administration of S-31183 during the period of fetal organogenesis in rats. Unpublished study from Hamamatsu, Seigiken Research Co., Ltd. Reference No. NNT-80-0029. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1988d.
- SANES, J. R. On the republication of the Hamburger - Hamilton stage series. *Developmental Dynamics*. v. 195, n. 4, p. 229-230, 1992.
- SAUVAGEOT, C. M.; STILES, C. D. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*. v. 12, n. 3, p. 244-249, 2002.
- SCHOENWOLF, G. C. Laboratory studies of vertebrate and invertebrate embryos: guide and atlas of descriptive and experimental development. 9. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2009.
- SCHOENWOLF, G. C.; FRANKS, M. V. Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Developmental Biology*. v. 105, n. 2, p. 257-272, 1984.
- SCICOLONE, G.; PEREYRA-ALFONSO, S.; BRUSCO, A.; SAAVEDRA, J. P.; FLORES, V. Development of the laminated pattern of the chick tectum opticum. *International Journal of Developmental Neuroscience*. v. 13, n. 8, p. 845-858, 1995.
- SINGH, S.; SOLECKI, D. J. Polarity transitions during neurogenesis and germinal zone exit in the developing central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. v. 9, n. 64, p. 1-8, 2015.
- SHAHID, A.; ZAIDI, S. D.; AKBAR, H.; SAEED, S. An investigation on some toxic effects of pyriproxyfen in adult male mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. v. 22, n. 9, p. 997-1003, 2009.
- SLACK, J. M. W. *Essential Developmental Biology*. 2. ed. New York: Wiley-Blackwell, 2006.
- SMITH, J. L.; SCHOENWOLF, G. C. Neurulation: coming to closure. *Trends in Neurosciences*. v. 20, n. 11, p. 510-517, 1997.
- SOBEIH, M. M.; CORFAS, G. Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *International Journal of Developmental Neuroscience*. v. 20, p. 349-357, 2002.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathological*. v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.
- SPIRHZANLOVA, P.; LE MÉVEL, S.; WEJAPHIKUL, K.; MUGHAL, B.; SÉBILLOT, A.; BUTRUILLE, L.; LEEMANS, M.; VISSER, T.; FINI, J.-B.; DEMENEIX, B. The pyriproxyfen metabolite 4'OH- pyriproxyfen disrupts thyroid hormone signaling and enhances Musashi-1 levels in neuroprogenitors. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/06/27/352088>>. Acesso em: 2 set. 2018.
- TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S.; CAVINESS, V. S. The cell cycle of the

- pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. v. 15, n. 9, p. 6046-6057, 1995.
- TRUONG, L.; GONNERMAN, G.; SIMONICH, M. T.; TANGUAY, R. L. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environmental Pollution*. v. 218, p. 1089-1093, 2016.
- UNSWORTH, B.; HENNEN, S.; KRISHNAKUMARAN, A.; TING, P.; HOFFMAN, N. Teratogenic evaluation of terpenoid derivatives. *Life Sciences*. v. 15, n. 9, p. 1649-1655, 1974.
- VALDIGLESIAS, V.; GIUNTA, S.; FENECH, M.; NERI, M.; BONASSI, S.  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. v. 753, n. 1, p. 24-40, 2013.
- VAN HERCK, S. L. J.; GEYSENS, S.; DELBAERE, J.; DARRAS, V. M. Regulators of thyroid hormone availability and action in embryonic chicken brain development. *General and Comparative Endocrinology*. v. 190, p. 96-104, 2012.
- VAZQUEZ, M. A. Report from Physicians in the Crop-Sprayed Villages regarding Dengue-Zika, microcephaly, and mass-spraying with chemical poisons. *Red Universitaria de Ambiente y Salud. Red Universitaria de Ambiente y Salud-Medicos de pueblos fumigados*. v. 3, 2016.
- VILLAR, J.; ISMAIL, L. C.; VICTORA, C. G.; OHUMA, E. O.; BERTINO, E.; ALTMAN, D. G.; LAMBERT, A.; PAPAGEORGHIU, A. T.; CARVALHO, M.; JAFFER, Y. A.; GRAVETT, M. G.; PURWAR, M.; FREDERICK, F. O.; NOBLE, A. J.; PANG, R.; BARROS, F. C.; CHUMLEA, C.; BHUTTA, Z. A.; KENNEDY, S. H. Padrões internacionais para peso, comprimento e perímetro cefálico do recém-nascido por idade gestacional e sexo: o Estudo Transversal para Recém-Nascidos do Projeto INTERGROWTH-21<sup>st</sup>. *The Lancet*. v. 384, n. 9946, p. 857-868, 2014.
- WATANABE, Y.; YAGINUMA, H. Tangential cell migration during layer formation of chick optic tectum. *Development Growth and Differentiation*. v. 57, n. 8, p. 539-543, 2015.
- WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. *Journal of Cell Biology*. v. 30, n. 1, p. 23-38, 1966.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2002. Geneva: WHO Press, 2001.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pyriproxyfen in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers. 1. ed. Geneva: WHO Press, 2008.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition. 4. ed. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva: WHO Press, 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Screening, assessment and management of neonates and infants with complications associated with Zika virus exposure in utero. 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/csr/resources/publications/zika/assessment-infants/en/>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

WHOPES. WORLD HEALTH ORGANIZATION PESTICIDE EVALUATION SCHEME. 2012. WHOPES-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. Disponível em: <<http://www.who.int/whopes/quality/newspecif/en/>> Acesso em: 18 jul. 2018.

WOLPERT, L.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; ROBERTSON, E.; SMITH, J. Princípios de Biologia do Desenvolvimento. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

ZHANG, W.; QIN, Z.; ZHANG, X.; XIAO, W. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. FEBS Letters. v. 585, p. 2786-2794, 2011.

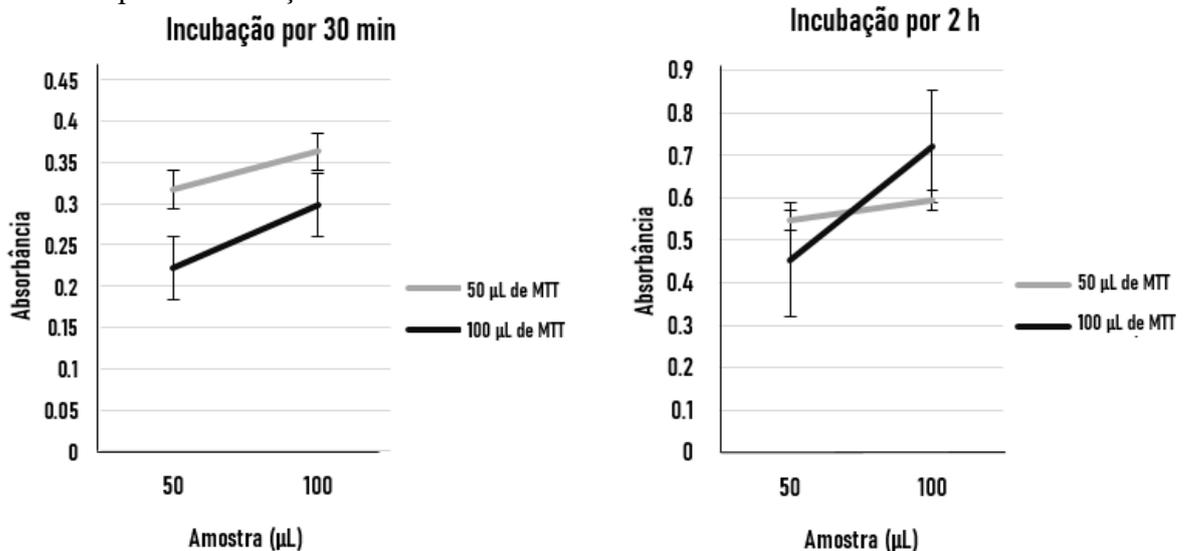
ZHENG, X. B.; LUO, X. J. ZENG, Y. H.; WU, J. P.; CHEN, S. J.; MAI, B. X. Halogenated flame retardants during egg formation and chicken embryo development: maternal transfer, possible biotransformation, and tissue distribution. Environmental Toxicology and Chemistry. v. 33, n. 8, p. 1712-1719, 2014.

## APÊNDICE A – Padronização da técnica de MTT para controle da homogeneidade das amostras.

Para verificar a homogeneidade do plaqueamento e o comportamento das amostras durante o experimento foram testadas repetições de 50  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  de amostra de encéfalos em E10, duas diluições de MTT nos volumes de 50  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  e dois períodos de incubação distintos por 30 min ou 2 h, realizadas em triplicatas.

Com os valores das absorbâncias da curva de diluição, observou-se valores mais estáveis no período de incubação de 30 min do MTT, concluindo assim que o comportamento da amostra incubada por 30 min no decorrer do experimento se manteve mais homogêneo. Como os valores de absorbância das diferentes diluições de amostra e reagente seguiram o mesmo padrão de curva, optou-se por definir a utilização de 50  $\mu\text{L}$  de amostra e 50  $\mu\text{L}$  do MTT (Figura 26).

**Figura 24** - Controle da técnica de MTT por meio da curva de diluição da amostra, do reagente MTT e tempo de incubação.



Fonte: O autor (2019).