

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

Jacqueline Pinheiro

Título: Hepatotoxicidade do metilmercúrio (MeHg) em embriões de *Gallus domesticus*

Florianópolis

2022

Jacqueline Pinheiro

**HEPATOTOXICIDADE DO METILMERCÚRIO (MeHg) EM
EMBRIÕES DE *Gallus domesticus***

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

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

Coorientadora: MSc. Nathália Ronconi Zilli Krüger

Florianópolis

2022

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

Pinheiro, Jacqueline

Hepatotoxicidade do metilmercúrio (mehg) em embriões de
gallus domesticus / Jacqueline Pinheiro ; orientadora,
Evelise Maria Nazari, coorientadora, Nathália Ronconi
Zilli Krüger, 2022.

46 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Fígado . 3. Embriotoxicidade.
4. Morfometria. 5. Metal pesado. I. Nazari, Evelise Maria
. II. Krüger, Nathália Ronconi Zilli. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
IV. Título.

Jacqueline Pinheiro

Título: Hepatotoxicidade do metilmercúrio (MeHg) em embriões de *Gallus domesticus*.

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

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2022.

Profa. Daniela de Toni, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Evelise Maria Nazari, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Gabriel Adan Araujo Leite, Dr.
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Carla Eliana Davico
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha família, que sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari, pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) quando eu estava apenas na terceira fase do curso, pelo incentivo e por todos os ensinamentos ao longo desses três últimos anos.

À Nathália por ter me acolhido e compartilhado tantos ensinamentos desde meus primeiros dias no laboratório, pela oportunidade de acompanhá-la durante o mestrado e por ter aceitado ser minha coorientadora. Por ter me ajudado a segurar a ansiedade, foram muitos dias, tardes e noites compartilhadas, feriados e fins-de-semana, juntas no laboratório realizando experimentos para que esse trabalho pudesse ficar pronto (companheiras de gastrite). Tivemos alguns momentos angústia, mas as alegrias, conquistas e brincadeiras conseguiram superar tudo isso. Obrigada pelo apoio, por ser como uma irmã de laboratório, que vou guardar para sempre no coração.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e aos seus técnicos, pelo suporte e auxílio.

Ao grupo do Fodasi, Felipe e Mirian, pela amizade e companheirismo, por todos os momentos que compartilhamos juntos ao longo do curso. Ao Bruno e a Thalia pelas risadas e dicas compartilhadas e pela amizade incrível que nós cinco acabamos formando por acaso e que vamos levar para a vida.

A minha família, minha mãe Adriana, meu pai Luciano e minhas irmãs Bárbara e Mariana, que sempre me deram muito apoio para seguir meus sonhos e por sempre me incentivarem a acreditar em mim mesma.

Aos meus avós pelo carinho e por toda ajuda que recebi. Ao meu amigo Rafael, pelo apoio e pelas conversas motivadoras.

Gostaria de agradecer a todos pelo apoio e carinho. Por fim, gostaria de agradecer a mim mesma pelo esforço, dedicação, disciplina e força de vontade, por permanecer motivada apesar dos desafios, horas de sono de lazer privadas para tornar tudo isso possível para poder trilhar meu caminho e seguir em busca dos meus sonhos e desejos.

"Fairy tales are more than true: not because they tell us that dragons exist, but because they tell us that dragons can be beaten."

Neil Gaiman.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um metal encontrado na natureza, proveniente de fontes naturais como vulcões, sendo também liberado nos ambientes pela atividade antropogênica, como a indústria e mineração. O Hg metilado por bactérias é transformado em metilmercúrio (MeHg), a forma orgânica mais tóxica do Hg, cuja toxicidade está bem documentada no sistema nervoso central. Porém, há uma disponibilidade menor de informações sobre a toxicidade do MeHg no fígado, um órgão importante para a produção de células sanguíneas, durante o desenvolvimento de embriões. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do MeHg sobre a morfologia e morfometria de hepatócitos e vasos sanguíneos hepáticos, utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo experimental. Para tal, embriões em E1,5 foram expostos *in ovo* a dose única de 0.1 µg MeHg/50 µL de solução salina até a idade de E10. Os embriões do grupo controle (CNT) foram expostos exclusivamente a 50 µL de solução salina pelo mesmo período. Embriões em E10 foram dessensibilizados a 4°C por 15 min e então removidos das membranas extraembrionárias. A massa fresca (MF) dos embriões foi obtida em balança de precisão (0,1 mg), seguida da eutanásia por decapitação. A remoção do fígado foi realizada e o valor de MF (g) do órgão foi obtido para o cálculo do índice hepatossomático (IHS). Os fígados foram fotodocumentados, fixados em formaldeído a 4% por 24h e mantidos em etanol a 70%, até o processamento histológico. Secções (6 µm) de fígado foram preparadas em lâminas histológicas e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), para análises morfológicas e morfométricas de hepatócitos e vasos sanguíneos hepáticos. Análises por imuno-histoquímica foram realizadas utilizando o anticorpo anti-fosfohistona H3 para a identificação de proliferação celular. Durante o período de exposição ao MeHg, no monitoramento diário dos embriões, foi observada maior porcentagem de mortalidade nos embriões expostos (75%), quando comparados aos do grupo CNT (25%). O IHS não diferiu entre embriões expostos e CNT, assim como o diâmetro dos vasos sanguíneos. No entanto, o diâmetro dos hepatócitos adjacentes a vasos aumentou significativamente no grupo exposto ao MeHg (8,161 µm), quando comparado ao CNT (7,018 µm; $p < 0,0001$). O diâmetro dos hepatócitos não adjacentes a vasos aumentou significativamente no grupo exposto ao MeHg (8,014 µm), quando comparado ao CNT (7,09 µm; $p < 0,0001$). Alterações morfológicas como congestão vascular, desorganização dos cordões hepáticos e esteatose hepática foram observados. Além disso, houve diminuição significativa na proliferação celular no fígado de embriões expostos ao MeHg (1,095 hepatócitos pHH3-positivos), quando comparado ao CNT (1,548 hepatócitos PHH3-positivos; $p < 0,0001$). Esses resultados mostraram que o MeHg teve um impacto significativo no fígado de embriões, afetando sua morfologia e morfometria. Como o fígado embrionário é um órgão hematopoiético importante, afetar sua estrutura morfológica funcional é um problema grave, resultando no comprometimento da produção de plasma sanguíneo e de elementos figurados do sangue.

Palavras-chave: Fígado. Embriotoxicidade. Morfologia. Morfometria. Metal pesado.

ABSTRACT

The Mercury (Hg) is a metal found in nature that comes from natural sources such as volcanos, but it can also be released in the environment by anthropogenic activities including industry and mining. The Hg methylated by bacteria is converted into methylmercury (MeHg), the most toxic organic form of Hg, which the toxicity is well established in the central nervous system. However, less information is available on the toxicity of MeHg in the liver, an important organ to the blood cell production during the embryo development. Therefore, the present work aimed to investigate the effects of MeHg on the morphology and morphometry of hepatocytes and hepatic blood vessels, using *Gallus domesticus* embryos as an experimental model. Embryos in E1.5 were exposed *in ovo* to a single dose of 0.1 µg MeHg/50 µL saline until E10, while embryos in the control group (CNT) were exposed exclusively to 50 µL saline. Embryos in E10 were desensitized at 4°C for 15 min and then removed from the extraembryonic membranes. The fresh mass (MF) of the embryos was obtained on a precision scale (0.1 mg), followed by euthanasia by decapitation. The removal of the liver was performed and the value of the MF (g) of the organ was obtained to calculate the hepatosomatic index (HIS). The livers were photodocumented, fixed in 4% formaldehyde for 24 h and kept in 70% ethanol until histological processing. Sections (6 µm) of liver were prepared on histological slides and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) for morphological and morphometric analysis of hepatocytes and hepatic blood vessels. Immunohistochemical analyzes were performed using anti-phosphohistone H3 antibody to identify cell proliferation. During the exposure period to MeHg, in the daily embryo monitoring, a higher percentage of mortality was observed in exposed embryos (75%), when compared to the CNT group (25%). The HIS did not differ between exposed and CNT group, as well as the diameter of blood vessels. However, the diameter of hepatocytes adjacent to vessels increased significantly in the group exposed to MeHg (8,161 µm) when compared to CNT (7,018 µm; $p < 0,0001$). The diameter of hepatocytes not adjacent to vessels increased significantly in the group exposed to MeHg (8.014 µm), when compared to CNT (7.09 µm; $p < 0.0001$). Morphological changes such as vascular congestion, disorganization of the hepatic cords and hepatic steatosis were observed. In addition, there was a significant decrease in cell proliferation in the liver of embryos exposed to MeHg (1.095 pHH3-positive hepatocytes), when compared to CNT (1.548 PHH3-positive hepatocytes; $p < 0.0001$). These results show that MeHg had a significant impact on the liver of embryos, being able to cause damage to the organ, impacting cell organization and proliferation, as well as its morphology and morphometry. As the embryonic liver is an important hematopoietic organ, affect its functional morphological structure is a serious problem, resulting in impaired production of blood plasma and blood formed elements.

Keywords: Liver. Embryotoxicity. Morphology. Morphometry. Heavy metal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura lobular do fígado de vertebrado e organização dos hepatócitos.....	18
Figura 2 – Procedimentos para a exposição dos ovos de <i>Gallus domesticus</i> ao MeHg e representação do período de incubação nas idades previamente definidas para exposição e análise	20
Figura 3 – Representação das morfometrias realizadas no fígado não fixado de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E10	21
Figura 4 – Representação dos conjuntos de lâminas montados com fígados para a realização das análises histológicas	22
Figura 5 – Representação das áreas intercaladas no fígado de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, utilizadas para realização de análise tecidual e morfométrica.	25
Figura 6 – Representação da gráticula de Weibel sobre o tecido hepático para contagem de células imunomarcadas	26
Figura 7 – Massa fresca do fígado, massa fresca total e índice hepatossomático de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10 expostos ao MeHg	29
Figura 8 – Morfologia e morfometria de lobos hepáticos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	31
Figura 9 – Organização tecidual de fígado de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E10 corado com Hematoxilina e Eosina.....	33
Figura 10 – Diâmetro dos vasos sanguíneos do fígado de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10 expostos ao MeHg	35
Figura 11 – Diâmetro dos hepatócitos adjacentes a vasos sanguíneos de fígados de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10 expostos ao MeHg	36
Figura 12 – Diâmetro de hepatócitos não adjacentes a vasos de fígados de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10 expostos ao MeHg	37
Figura 13 – Comparação entre o diâmetro dos hepatócitos adjacentes a vasos e não adjacentes a vasos	38
Figura 14 – Análise de proliferação celular por imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-PHH3.	39
Figura 15 – Resumo gráfico apresentando resultados analisados em fígado de <i>Gallus domesticus</i> exposto ao MeHg.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de mortalidade de embriões de <i>Gallus domesticus</i> expostos ao MeHg durante o desenvolvimento.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEG Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

CCB Centro de Ciências Biológicas

CNT Grupo Controle

DAB Diaminobenzidina

E Dia Embrionário

HE Hematoxilina-Eosina

Hg Mercúrio

IHS Índice Hepatosomático

LAMEB Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LRDA Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal

MeHg Metilmercúrio

MF Massa Fresca

N Tamanho Amostral

PBS Tampão Fosfato Salino, do inglês Phosphate Buffered Saline

PHH3 Anti-fosfohistona H3

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Obtenção dos ovos e embriões	20
3.2	Delineamento experimental	20
3.3	Acompanhamento dos embriões	21
3.4	Preparo histológico	23
3.5	Análise histológica e morfométrica do tecido hepático	24
3.6	Análise de proliferação celular por imuno-histoquímica.....	25
3.7	Análises estatísticas	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	Mortalidade	27
4.2	Índice hepatossomático	28
4.3	Morfologia e morfometria do fígado	30
4.4	Análise das características do tecido hepático.....	32
4.5	Diâmetro dos vasos sanguíneos	34
4.6	Morfologia e morfometria dos hepatócitos.....	35
4.7	Análise da proliferação celular dos hepatócitos	39
5	CONCLUSÕES.....	41
6	REFERÊNCIAS.....	42

1 Introdução

O mercúrio (Hg (Hg^{2+})) é um elemento tóxico e inorgânico, emitido em grandes quantidades na atmosfera, por meio de fontes naturais, como vulcões e fontes geotérmicas (IPCS, 1990; WENTZ et al., 2014). O Hg também pode ser liberado através de fontes antropogênicas, como a queima de combustíveis fósseis, mineração e resíduos industriais (STOPFORD e GOLDWATER, 1975; VAREKAMP e BUSECK, 1986). Em sua forma gasosa, o Hg pode percorrer longas distâncias na atmosfera até que seja depositado na superfície da terra, isso possibilita que esse elemento possa se dispersar em diferentes regiões e causar a contaminação de diversos seres vivos (IPCS, 1990; WENTZ et al., 2014). Apesar de estar presente em diversas regiões, o Hg não possui uma grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação (KIDD; CLAYDEN; JARDINE, 2011; WENTZ et al., 2014).

O metilmercúrio (MeHg), forma orgânica do Hg, é produzido por meio da metilação, um processo característico microbiano realizado por bactérias sulforedutoras, ligado às variáveis químicas e ambientais, como a presença de matéria orgânica e a ausência de oxigênio (HOFFMAN et al., 2003). O MeHg, caracteriza-se por ter um alto potencial bioacumulativo e alta biomagnificação, devido a essas características, animais no topo da cadeia alimentar tendem a acumular maiores concentrações de MeHg, quando comparados aos indivíduos que constituem a base da cadeia alimentar (HOFFMAN et al., 2003; WENTZ et al., 2014).

A contaminação por MeHg e o risco que a exposição a este metal pode representar para embriões em desenvolvimento, recebeu maior atenção científica após o surgimento da “doença de Minamata”, em 1956. Nesse período, uma alta quantidade de MeHg contaminou o mar de Shiranui, na região de Minamata Bay (Japão), intoxicando muitas pessoas que viviam próximas a região e consumiam peixes e frutos do mar (DOI; OHNO; HARANDA, 1984; HARANDA, 1995). Crianças nascidas de mães contaminadas por MeHg, apresentaram problemas neurológicos, motores, deformidade de membros, problemas de crescimento, estrabismo, ataxia, disartria, entre outros (HARANDA, 1995).

A doença de Minamata mostrou o risco que a exposição ao MeHg pode representar para embriões. Com isso, estudos utilizando diferentes modelos animais, relataram uma variedade de prejuízos associados ao MeHg. Dentre os danos causados destacam-se, diminuição na taxa de natalidade, alterações cardiovasculares, diminuição dos batimentos cardíacos, problemas no sistema nervoso central, como lesões cerebrais, degeneração de neurônios, morfologia imatura

de vasos cerebelares, anomalias congênitas, fusão das vértebras torácicas, costelas onduladas, edema generalizado, fenda palatina e alterações no DNA (BIRGE e ROBERTS, 1976; OLSON e MASSARO, 1977; FUYUTA, FUJIMOTO, HIRATA, 1978; LATIF et al., 2001; BERTOSSI et al., 2004).

Em organismos vertebrados adultos, o fígado funciona como uma glândula endócrina e exócrina, com importantes funções metabólicas, como a síntese e a excreção de hormônios, detoxificação, além de ser extremamente importante para a manutenção do metabolismo homeostático (HAZELWOOD, 2000). Desta forma, é extremamente necessário que esse órgão permaneça saudável durante toda a vida do indivíduo, afim de não comprometer diferentes funções metabólicas.

Em aves, durante a gastrulação (por volta de 5-22 h, que corresponde a 1- 4,5% do desenvolvimento) ocorre um período de intensa proliferação celular e a formação da linha primitiva, uma estrutura importante para o reconhecimento das extremidades cranial e caudal do embrião (BELLAIRS; OSMOND, 2005). A partir do folheto embrionário endoderma, diferencia-se o fígado, cuja células precursoras encontram-se em ambas as laterais da linha primitiva por volta de 18-22 h (3,55- 4,5% do período total de desenvolvimento do embrião) (HAMBURGER E HAMILTON, 1951; BELLAIRS; OSMOND, 2005). Com o dobramento do corpo do embrião forma-se o intestino primitivo (por volta de 24 – 84 h, que corresponde a 4,7- 16,5% do desenvolvimento), onde as células precursoras do fígado passam a se localizar na região anterior do intestino primitivo. As células do mesoderma esplâncnico se associam ao endoderma originando a rede vascular e os tecidos de sustentação hepática (CARLSON, 2014). As aves possuem um fígado dividido em dois lobos, esquerdo e direito, sendo que em galinhas, o lobo esquerdo é subdividido em duas partes, lateral e medial (ABDUL-AZIZ E FLETCHER, 2016).

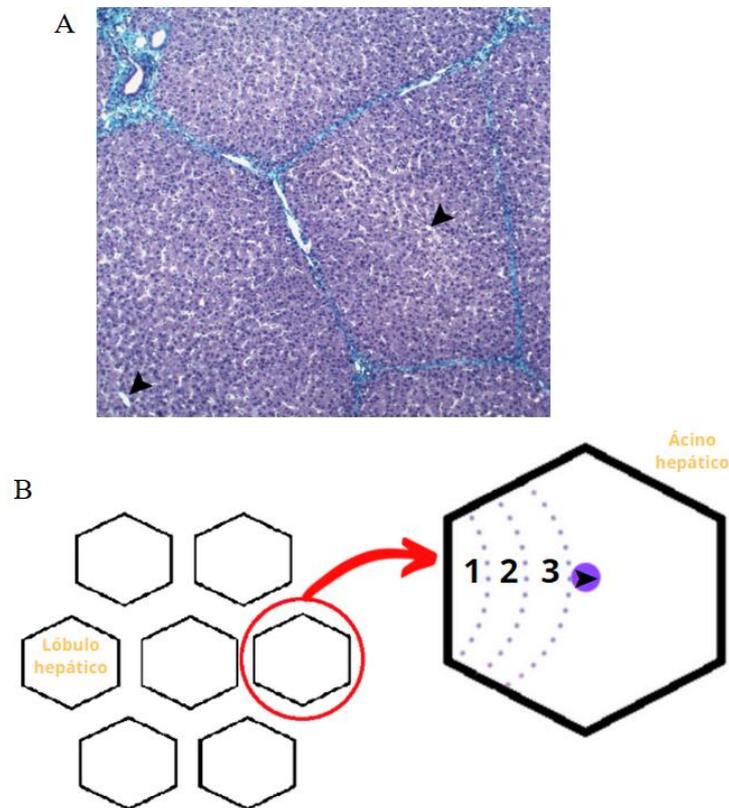
No fígado de vertebrados adultos estão presentes diferentes tipos celulares, como os hepatoblastos, também conhecidos como célula-tronco bipotencial do fígado, são células bipotentes, que migram e se diferenciam em hepatócitos imaturos ou em colangiócitos (células biliares epiteliais) (KMIEĆ, 2001; SHIN; MONGA, 2013). À medida que o desenvolvimento progride, essas células se tornam diferenciadas para desempenhar suas funções. O principal tipo celular presente no fígado são os hepatócitos, essas células são muito importantes para o organismo, pois estão envolvidas em diversas funções, sendo por exemplo, o único tipo celular capaz de inativar a amônia tóxica que faz parte do ciclo da ureia (KMIEĆ, 2001; SHIN; MONGA, 2013). Além disso, os hepatócitos também são responsáveis por sintetizar diversas

substâncias como, ácidos biliares, colesterol, hormônios, fosfolípidios e proteínas que contribuem para a defesa realizada pelo sistema imunológico. Essas células possuem um excelente mecanismo de ação contra o estresse oxidativo, sendo eficazes em processos de detoxificação do organismo, metabolizando substâncias exógenas e endógenas (SCHULZE et al., 2019).

O conceito de lóbulo hepático clássico se deu em 1833, quando foi observado que esse órgão era formado por diversas unidades (lóbulos) parenquimáticos limitados por tecido conjuntivo. Segundo esse conceito, no centro de cada lóbulo hepático há uma veia central, responsável por drenar a região. Além disso, nas extremidades dos lóbulos localizam-se tratos portais, com ramos aferentes terminais arteriais e venosos, com caminho ao longo dos lóbulos, através dos sinusóides, levando o sangue até a veia central. (KIERNAN, 1833; KMIEĆ, 2001) (Figura 1A).

Além do lóbulo hepático clássico, é importante destacar a o conceito de ácino hepático (RAPPAPORT et al., 1954). Este modelo leva em consideração a menor unidade microcirculatória hepática (ácino simples). O ácino compreende a área parenquimática do fígado que é relacionada com os vasos aferentes terminais, veia portal e artéria hepática (trato portal). Assim, esse modelo leva em conta a posição em que os hepatócitos se encontram no parênquima e conseqüentemente a quantidade e “qualidade” de sangue que eles recebem. São caracterizadas três zonas distintas (zona 1, zona 2 e zona 3), baseadas na proximidade com o trato portal. A zona 1 localiza-se mais próxima ao trato portal, sendo assim, os hepatócitos presentes nessa região recebem sangue mais oxigenado, rico em hormônios e nutrientes quando comparados aos hepatócitos presentes na zona 3, que se localiza mais proximamente da veia central e conseqüentemente acaba recebendo o sangue menos oxigenado, com menos nutrientes e com uma quantidade maior de resíduos metabólicos advindos dos hepatócitos das zonas anteriores. A ideia de que os hepatócitos possuem funções heterogêneas dependendo de sua localização é sustentada até os dias de hoje, por meio de tecnologias e estudos mais avançados (Figura 1B) (RAPPAPORT et al., 1954; RAPPAPORT, 1976; KMIEĆ, 2001; ABDUL-AZIZ e FLETCHER, 2016; MCENERNEY et al., 2017).

Figura 1- Estrutura lobular do fígado de vertebrado e organização dos hepatócitos.



(A) Lâmina histológica de fígado de vertebrado, representando lóbulos hepáticos. (B) Representa a organização do fígado. 1,2 e 3 representam as 3 diferentes zonas onde os hepatócitos se localizam segundo o conceito de ácino hepático. Setas indicam a veia central. Fonte: modificado de BUZATO; ARANA; CARVALHO, 2016.

O período de desenvolvimento embrionário é conhecido por ser um período de grande vulnerabilidade para os animais (FUYUTA; FUJIMOTO; HIRATA, 1978; HONG; KIM; LEE, 2012; ROSA-SILVA et al., 2020). Os riscos para o aparecimento de anomalias aumentam ainda mais quando embriões são expostos a agentes tóxicos como o MeHg, podendo desencadear uma série de anomalias associadas ao sistema nervoso central, fígado, ossificação, entre outros distúrbios (FUYUTA; FUJIMOTO; HIRATA, 1978; BERTOSSI, et al., 2004; ROSA-SILVA et al., 2020).

Estudos indicam que alterações morfológicas dos hepatócitos e suas características referentes à proliferação celular se fazem mais presentes no início do desenvolvimento entre o terceiro e sexto dia embrionário (E3-E6) em comparação aos dias posteriores, como E7-E8 (GUEDES et al., 2014). Além disso, organismos adultos que foram expostos ao MeHg durante

o seu desenvolvimento, apresentam uma concentração maior desse composto no fígado e nos rins, quando comparado a outras regiões como o ovário e o músculo esquelético, por exemplo (MARCH; POON; CHU, 1982; LEWIS; BECKER; FURNESS, 1993). Sabe-se que o MeHg possui uma alta capacidade de danificar órgãos e tecidos, impactando direta ou indiretamente o sistema nervoso central, cardiovascular e endócrino de animais expostos, prejudicando importantes funções que são essenciais para a saúde (LATIF et al., 2001; BERTOSSI et al., 2004; GLAZER e BRENNAN, 2021). No entanto, os reflexos da toxicidade do MeHg sobre o fígado de embriões em desenvolvimento é um assunto menos explorado em comparação a outros órgãos.

Assim, considerando o impacto e a capacidade de bioacumulação do MeHg, o presente Trabalho de Conclusão de Curso teve como foco de estudo a toxicidade do MeHg sobre o desenvolvimento do fígado, observando os efeitos em sua morfologia e morfometria, com análises macroscópicas, microscópicas e de proliferação celular. Destacando-se como hipóteses para esse trabalho o prejuízo causado pelo MeHg com relação a diminuição da proliferação celular, aumento do diâmetro dos hepatócitos e ao acúmulo de gordura nas células.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do MeHg sobre a morfologia e morfometria de hepatócitos e vasos sanguíneos hepáticos, utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a macromorfologia e morfometria de fígado de embriões expostos ao MeHg;
- Relacionar o índice hepatossomático (IHS) com a massa fresca (MF) do fígado e a MF total do embrião;
- Avaliar a micromorfologia e morfometria de hepatócitos e de vasos sanguíneos de embriões expostos ao MeHg;
- Analisar e quantificar os processos de proliferação celular nos hepatócitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS OVOS E EMBRIÕES

Os ovos de *G. domesticus* foram doados pela Fazenda Experimental da Ressacada do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e encaminhados para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), localizado no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC. No laboratório, os ovos permaneceram em repouso por 24 h antes de serem alocados em uma incubadora Golden®, em temperatura média de 37.5°C – 38°C, com 65% de umidade. A utilização dos embriões foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - 5843231018/CEUA/UFSC

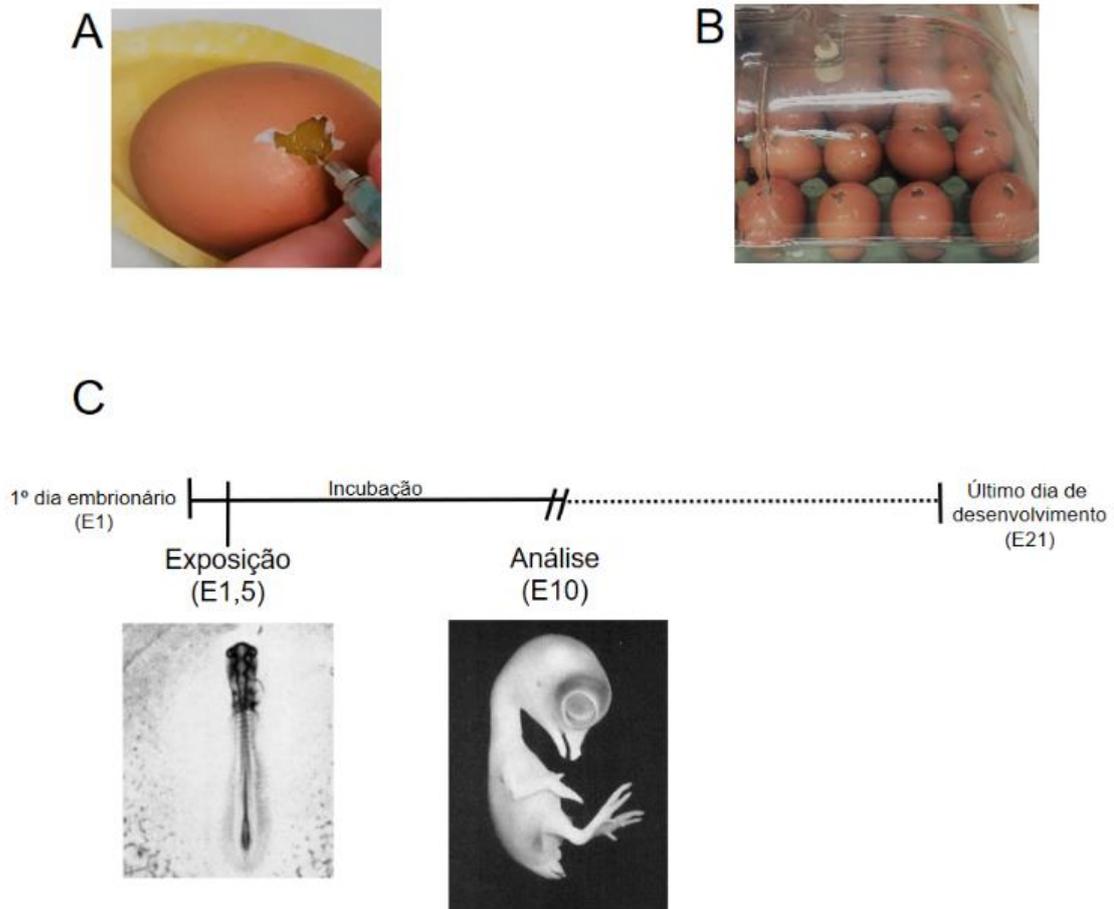
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ovos foram numerados aleatoriamente e distribuídos em grupo exposto ao MeHg e grupo controle (CNT). Os embriões em E1,5 foram expostos *in ovo* a dose única de 0.1 µg MeHg/50 µL de solução salina sobre o vaso vitelínico. Para o grupo CNT, embriões nessa mesma idade foram expostos exclusivamente a 50 µL de solução salina. As concentrações administradas foram embasadas no trabalho de CARVALHO et al. (2008). O fim do período de incubação foi definido como E10, idade em que foram realizadas as análises (n = 30 ovos/grupo em triplicata). A idade para exposição foi definida como E1,5, pois é um período inicial do desenvolvimento do fígado, quando as células hepáticas estão se diferenciando para a formação primórdio do broto hepático (BELLAIRS; OSMOND, 2005) O período de incubação foi interrompido em E10, pois nesse período o fígado produz células sanguíneas (CARLSON, 2014).

A realização da exposição contou inicialmente com uma pequena abertura na porção lateral da casca do ovo, em seguida foram pipetadas as devidas quantidades das soluções descritas anteriormente e a abertura feita na casca foi vedada com fita adesiva transparente

atóxica. Após esse período de exposição os ovos permaneceram na incubadora até atingirem E10 (Figura 2).

Figura 2 – Procedimentos para a exposição dos ovos de *Gallus domesticus* ao MeHg e representação do período de incubação nas idades previamente definidas para exposição e análise.



(A) Representa a abertura na casca do ovo. (B) Ovos sendo incubados. (C) Representa o tempo de desenvolvimento, destacando as características dos embriões em E1,5 (período de exposição ao MeHg) e E10 (período em que a incubação foi interrompida). // sinaliza o momento em que a incubação do embrião foi interrompida. Fonte: modificada de Hamburger e Hamilton (1951).

3.3 ACOMPANHAMENTO DOS EMBRIÕES

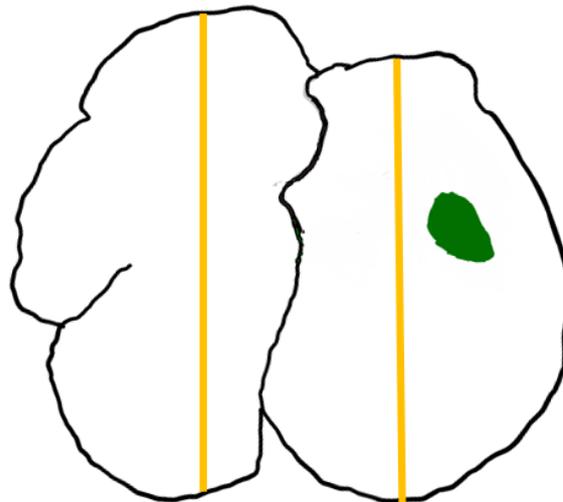
Diariamente os embriões foram monitorados e a avaliação da mortalidade foi realizada com o auxílio de uma lupa, possibilitando a visualização da condição de cada indivíduo. A morte foi confirmada com a falta da vascularização extraembrionária. Cada embrião morto foi

identificado de acordo com as características que apresentava no momento em que sua morte foi constatada, com isso foi possível registrar o período em que seu desenvolvimento foi interrompido, de acordo com o a descrição de HAMBURGER e HAMILTON (1951).

Os embriões sobreviventes permaneceram na incubadora, e tiveram o seu desenvolvimento interrompido em E10. Em seguida, foram dessensibilizados a 4°C por 15 min. Os embriões foram removidos dos envoltórios ovulares e lavados em solução salina. Imediatamente, cada embrião foi pesado em balança de precisão Ohaus (0,1 mg) e eutanasiado por decapitação (CCAC, 2010). A remoção do fígado foi realizada e o valor de MF do fígado foi obtido. Na sequência foi realizada a fotodocumentação dos fígados (n = 3 fígados/grupo experimental) com o auxílio de um estereomicroscópio Olympus SZC16 (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, LAMEB/UFSC).

O IHS foi calculado através da seguinte fórmula: MF do fígado (g) / MF total do embrião (g) x 100 (BROSANAN et al., 1977). Os lobos hepáticos dos fígados fotodocumentados foram medidos verticalmente (Figura 3) utilizando o software ImageJ e com mesa digitalizadora Wacom Intuos Pen & Touch Small CTH-480L.

Figura 3 – Representação das morfometrias realizadas no fígado não fixado de embrião de *Gallus domesticus* em E10.

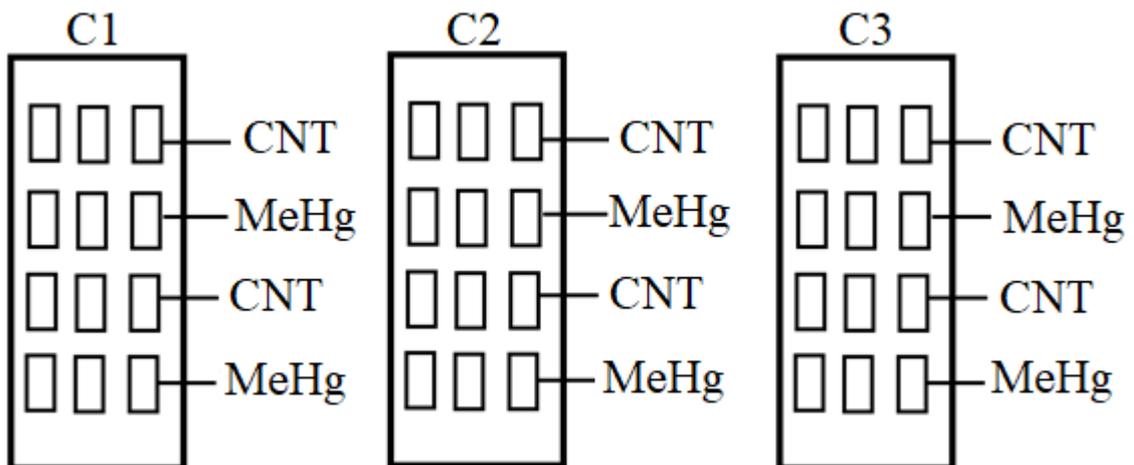


Linhas amarelas indicam a morfometria realizada em ambos os lobos do fígado. Área em verde representa a vesícula biliar. Fonte: da própria autora.

3.4 PREPARO HISTOLÓGICO

O fígado foi fixado em formaldeído a 4% por 24 h e mantido em etanol a 70%, até o processamento. Em seguida, foi realizada a desidratação em série de etanol 70% - 90% por 45 min cada e 100% por 1 h 30 min. A diafanização foi realizada com dois banhos de xilol (10 min cada ou até que a peça estivesse translúcida) e seguida por 3 banhos de parafina a 60°C, 1 h 10 min cada banho. Foram realizadas secções histológicas do lobo maior do fígado, em micrótomo rotativo Olympus CUT 2020^a, em uma espessura de 6 µm. As secções foram dispostas em lâminas histológicas gelatinizadas, de modo que cada lâmina fosse montada com 2 fígados CNT e 2 fígados expostos ao MeHg, com 3 secções de cada fígado, totalizando 12 secções por lâmina. Foram preparados 3 conjuntos de lâminas (n = 6 embriões/grupo) (Figura 4), destinadas à coloração Hematoxilina-Eosina (HE), e análise por imuno-histoquímica.

Figura 4 - Representação dos conjuntos de lâminas montados com fígados para a realização das análises histológicas.

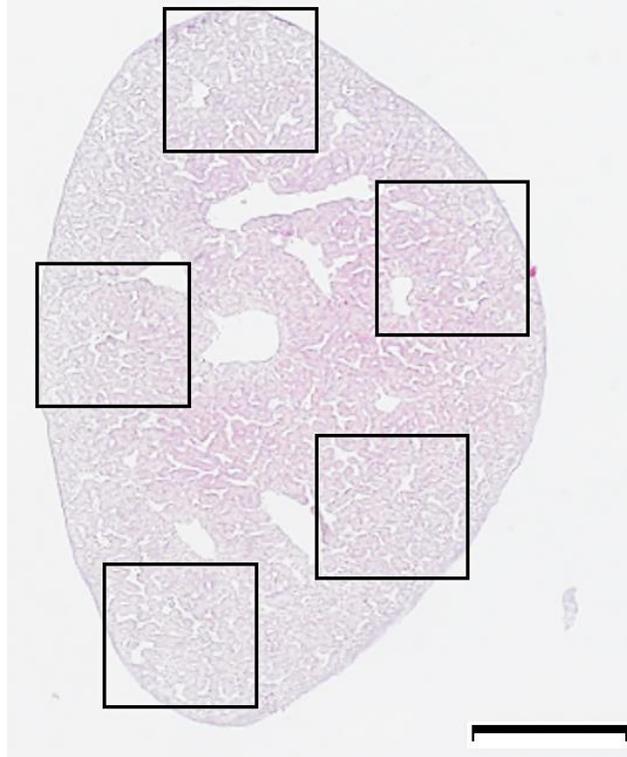


CNT = grupo controle, MeHg = grupo tratado, C1, C2, C3 – representam o conjunto de lâminas 1, 2 e 3, respectivamente montados com fígados. Fonte: da própria autora, de acordo com os procedimentos de rotina adotados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/ CCB/UFSC.

3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO TECIDO HEPÁTICO

Uma lâmina de cada um dos 3 conjuntos foi destinada à coloração com HE, para isso foi desparafinizada em dois banhos de xilol puro, 2 min cada, após, reidratadas em série decrescente de etanol (100% - 70%), por 4 min cada. As lâminas foram imersas em água corrente por 5 min, após, foram imersas em Hematoxilina por 30 seg, banhadas novamente em água corrente por 5 min, imersas em Eosina por 30 seg e lavadas em água destilada por 5 min. As secções foram desidratadas gradualmente em série crescente de etanol, por 2 min cada (70% - 90%) e 4 min para etanol 100%, diafanizadas em 2 banhos de xilol puro por 1 min cada e finalizadas com Entelan®. As lâminas foram coradas com HE para a análise comparativa entre os tecidos do fígado exposto ao MeHg e CNT. Características como a densidade do tecido, organização celular, quantidade de gordura nas células e coloração foram avaliadas e descritas. O diâmetro dos vasos foi obtido através da análise de micrografias com aumento de 4X, foram selecionados 5 vasos em secção transversal de cada corte (n = 15 vasos/fígado/grupo). A morfometria do diâmetro dos hepatócitos adjacentes aos vasos e não adjacentes aos vasos, foi realizada a partir de micrografias em um aumento de 40 X. Para a realização de análise tecidual e morfométrica foram selecionadas 5 áreas intercaladas ao longo das extremidades do fígado (n = 12 fígados/grupo, 3 secções cada fígado) (Figura 5). As lâminas foram fotodocumentadas utilizando um microscópio invertido Olympus IX83 (LAMEB) em aumentos de 4 X, 40 X e 100 X.

Figura 5 – Representação das áreas intercaladas no fígado de embriões de *Gallus domesticus* em E10, utilizadas para realização de análise tecidual e morfométrica.



Quadrados indicam as áreas em que o tecido hepático foi analisado. Barra de escala = 100 μm . Fonte: da própria autora.

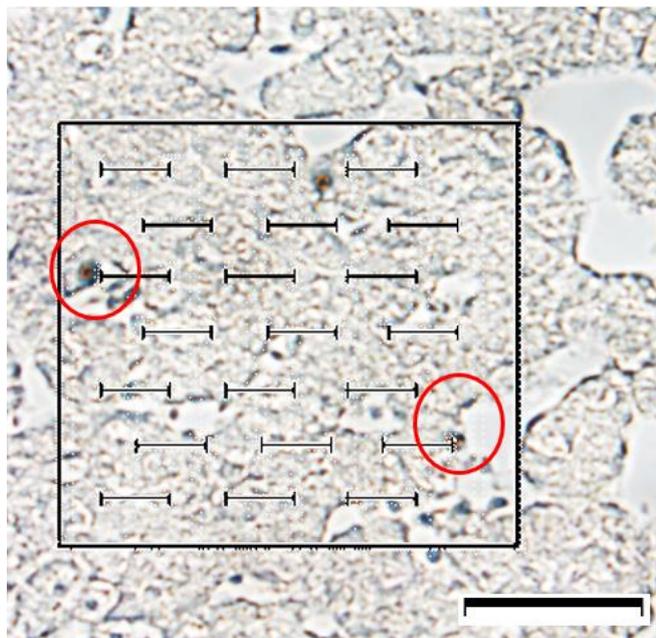
3.6 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

As secções foram desparafinizadas com dois banhos de xilol puro, por 2 min cada, seguidos de reidratação em série decrescente de banhos de etanol (100% - 70%), por 4 min cada. A inativação das peroxidases endógenas foi realizada com banhos em solução de peróxido de hidrogênio: metanol (1:2) por 10 min. Para a permeabilização das membranas celulares foi realizado banho de 5 min em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) a 0,1 M + Triton X-100 a 0,3%. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com soro fetal bovino a 5% durante um período de 40 min. Após esse período, foi realizada incubação com anticorpo primário anti-pHH3 IgG anti-coelho (diluição em PBS 1:300) por 12 h a 4°C. As lâminas receberam 3 banhos com PBS a 0,1 M + Triton X-100 a

0,3% por 5 min e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado à peroxidase (diluição em PBS 1:400) por 3 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizados 3 banhos com PBS a 0,1 M + Triton X-100 a 0,1% (5 min cada). As imunomarcações foram reveladas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) e as lâminas montadas com Entelan®.

Para realizar a contagem das células pHH3-positivas foi utilizado um microscópio de luz Olympus CBA (aumento 40 X) acoplado com uma gráticula de Weibel nº 2 – M42 (Figura 6). A quantificação de células foi realizada utilizando o método estereológico, para isso, foram utilizadas 5 áreas intercaladas nas regiões cortical e central do tecido hepático (MANDARIM-DELACERDA, 2003).

Figura 6: Representação da gráticula de Weibel sobre o tecido hepático para a contagem de células imunomarcadas.



Gráticula de Weibel sobre o tecido hepático no microscópio de luz. Círculo vermelho indica a extremidade das barras da gráticula. Apenas as células imunomarcadas que ficaram sobrepostas sobre às extremidades das barras foram contabilizadas. Barra de escala = 20 μm . Fonte: da própria autora

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad Prism 7.04, a normalidade dos dados foi testada previamente por meio do teste Shapiro-Wilk. Foi realizado Teste-t e análise de variância ANOVA de duas vias, para grupo CNT/exposto ao MeHg e hepatócitos adjacentes/não adjacentes a vasos, seguido do teste post-hoc de Tukey. As diferenças observadas foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$. A apresentação dos dados foi feita utilizando os valores de média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MORTALIDADE

Os embriões expostos ao MeHg tiveram taxa de mortalidade maior, quando comparados com o grupo CNT. Levando em consideração todos os ovos incubados, cerca de 59,55% dos embriões permaneceram vivos até E10, sendo que 31,46% dos embriões morreram até a idade de E4. Este resultado era esperado, uma vez que a toxicidade do MeHg e seus efeitos sobre a taxa de mortalidade já havia sido observada em outro estudo realizados com embriões de galinha e zebrafish (BIRGE e ROBERTS, 1976; GLAZER e BRENNAN, 2021).

Dentre os 45 embriões expostos ao MeHg, 46,66% não sobreviveram até E10, podemos inferir que E2 foi o período de maior vulnerabilidade, representando 22,22% das mortes (Tabela 1). Com relação aos 45 Embriões do grupo CNT, 15,55% não sobreviveram até E10, podemos inferir que E4 foi o período de maior vulnerabilidade, representando 6,67% das mortes (Tabela 1).

No presente estudo, o MeHg foi administrado sobre a artéria vitelínica do embrião, porém, desde o início do período de incubação, em ovos de galinha, é documentada a ocorrência da passagem de água do albúmen para a membrana vitelina (FREEMEN e VINCE, 1974). Considerando essa afirmativa, mesmo que o MeHg se encontre no albúmen, a ação da passagem de água poderia oferecer uma oportunidade para que o MeHg alcance o embrião com maior facilidade, desde o início de seu desenvolvimento, afetando a sua saúde (HOFFMAN E MOORE, 1979).

Tabela 1 - Porcentagem de mortalidade de embriões de *Gallus domesticus* expostos ao MeHg durante o desenvolvimento.

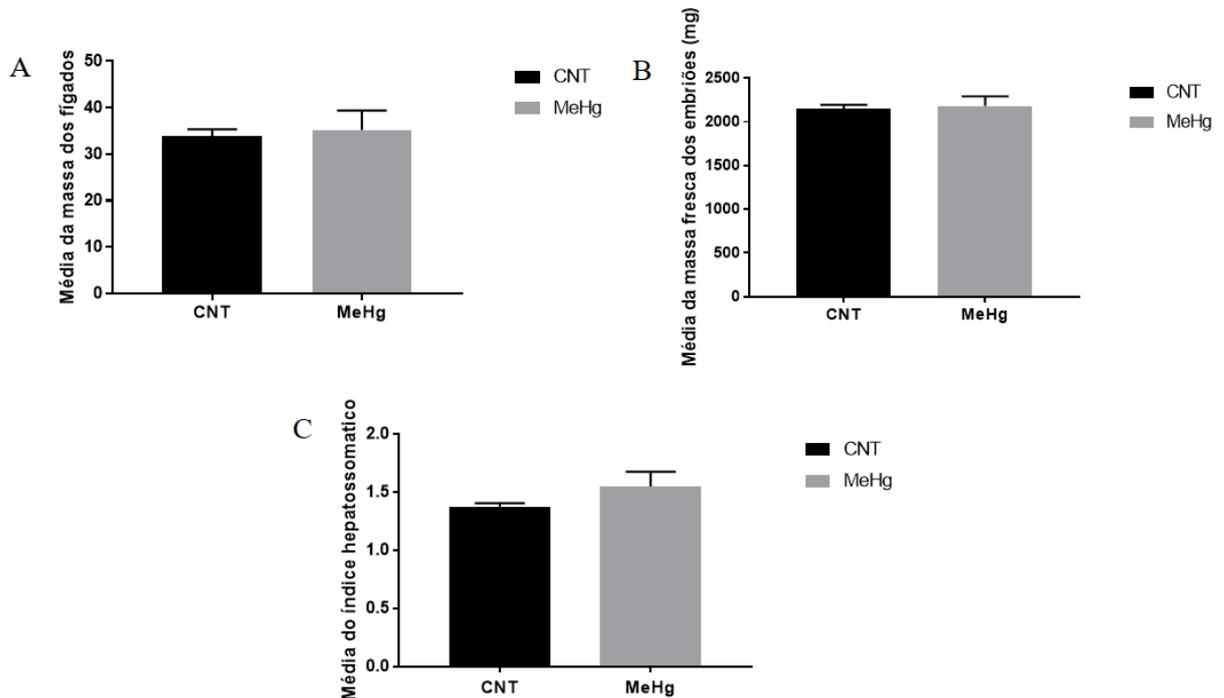
DIA EMBRIONÁRIO	CNT (%) (N = 45 embriões)	MeHg (%) (N = 45 embriões)
E1	2,22	2,22
E2	2,22	22,22
E3	4,44	4,44
E3,5	0	2,22
E4	6,67	15,56
TOTAL	15,55	46,66

Fonte: da própria autora

4.2 ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO

Ao analisar o IHS foi observado que os resultados entre embriões expostos ao MeHg e CNT não foram significativamente diferentes. Os embriões expostos ao MeHg apresentaram índice de 1,55 ($\pm 0,12$), enquanto o grupo CNT o IHS foi de 1,37 ($\pm 0,03$) (Figura 7C).

Figura 7 – Massa fresca do fígado, massa fresca total e índice hepatossomático de embriões de *Gallus domesticus* em E10 expostos ao MeHg.



(A) Massa fresca dos fígados de embriões de *Gallus domesticus* em E10 de grupos CNT e exposto ao MeHg. (B) Massa fresca total dos embriões de *Gallus domesticus* em E10 de grupos CNT e exposto ao MeHg. (C). Índice hepatossomático de embriões de *Gallus domesticus* em E10 de grupos CNT e expostos ao MeHg. Valores apresentados em média \pm erro padrão da média. Fonte: da própria autora.

Os valores correspondentes a MF do fígado (Figura 7A) e a MF dos embriões (Figura 7B) não foram significativamente diferentes entre os embriões do grupo exposto ao MeHg e CNT. Com relação a MF do fígado, o grupo exposto ao MeHg apresentou 35,23 mg (\pm 4,16), enquanto que o CNT apresentou 33,82 mg (\pm 1,53). Para a MF dos embriões, o grupo exposto ao MeHg apresentou 2182 mg (\pm 108,3), enquanto que o CNT apresentou 2148 mg (\pm 45,86).

O IHS é muito utilizado, pois é uma forma eficiente para obtenção de informações relacionadas com o crescimento do órgão e o desenvolvimento, baseado na idade e em outras características como os processos fisiológicos e físicoquímicos (VEGA; CAPITAN; LAMBIO, 2011). No presente trabalho, não foram encontrados resultados que afirmem que o MeHg é capaz de causar alterações no IHS de embriões e que alterações com relação a MF do fígado e do embrião também não são causadas.

Estudos realizados com outro metal tóxico, o Cádmio, mostrou diferenças significativas entre o IHS de grupos expostos e de grupos CNT, em peixes. Esses resultados destacam que

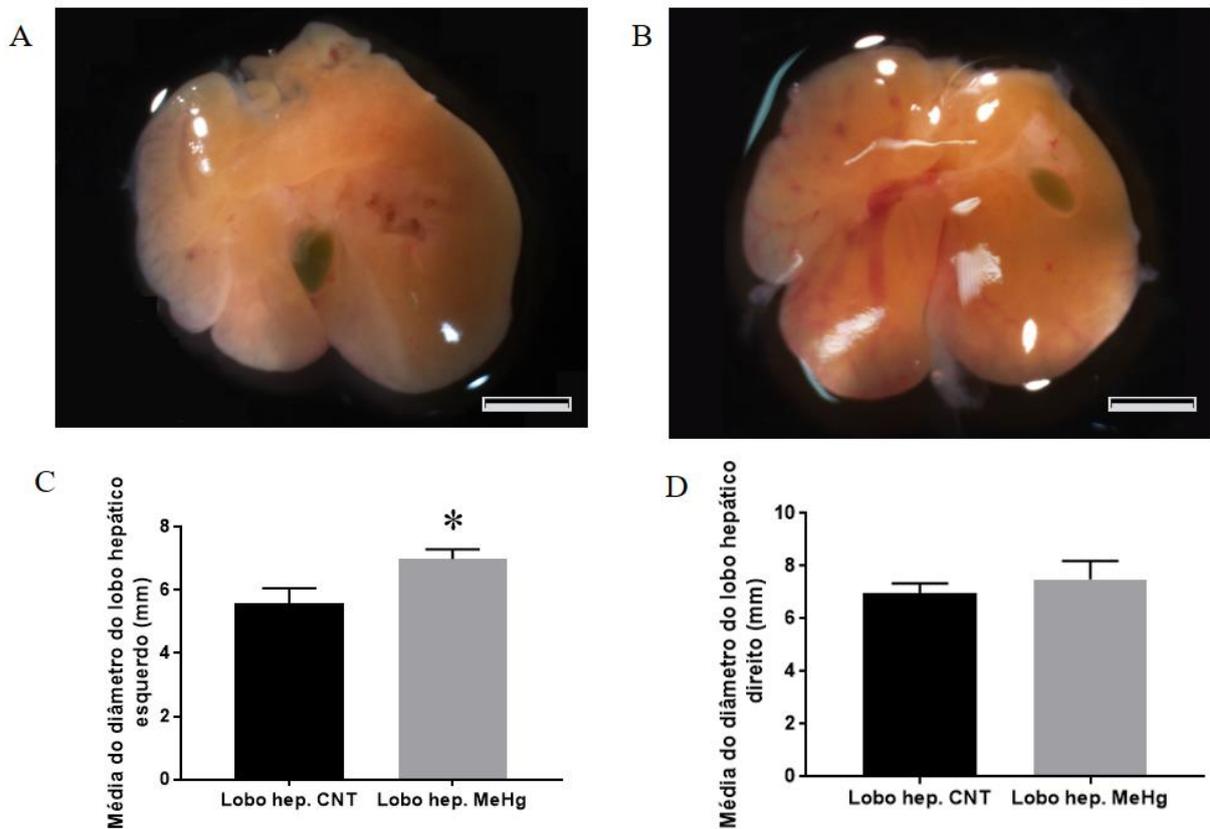
quanto maior a concentração de Cádmio no animal, maior é a redução do IHS dos indivíduos expostos (PEREIRA et al., 1993). Larose et al. (2008), analisaram fígados de peixes expostos a diferentes concentrações de MeHg e concluíram que os valores referentes à concentração de MeHg e ao IHS foram inversamente proporcionais, uma vez que os fígados expostos a maiores concentrações tiveram um menor IHS. Sendo assim, esse fato nos sugere que possivelmente se a quantidade de MeHg utilizada em nosso trabalho fosse maior, o IHS poderia ser reduzido também, porém optamos pela concentração de 0.1 µg MeHg/50 µL uma vez que essa é uma concentração considerada baixa e não letal para 50% das amostras, além de que seus efeitos no fígado de embriões não haviam sido analisados até o momento (CARVALHO et al., 2008).

A similaridade entre o IHS de organismos CNT e organismos expostos a um metal tóxico já foi observada como resultado anteriormente (TINKARE et al., 2013), porém nesse estudo, foram encontradas alterações significativas na MF do fígado e do embrião de ratos, destacando esses fatores como prejuízos causados devido a toxicidade do metal níquel. No entanto, essas alterações não foram observadas no presente estudo com o MeHg.

4.3 MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DO FÍGADO

Fígados expostos ao MeHg apresentaram regiões de vasos sanguíneos bem destacadas em vermelho (devido a coloração do sangue), caracterizadas por congestão vascular, predominantemente no lobo esquerdo, enquanto que nenhuma amostra do grupo CNT apresentou sinais de congestão vascular e destaques visíveis relacionados a vascularização e coloração. Apesar das diferenças com relação à vascularização, os fígados expostos ao MeHg e CNT apresentavam uma coloração alaranjada, semelhante entre um e outro (Figura 8A, B).

Figura 8 – Morfologia e morfometria de lobos hepáticos de embriões de *Gallus domesticus* em E10.



(A) Representa fígado CNT. (B) Representa fígado exposto ao MeHg. Em B é possível ver regiões caracterizadas por congestões vasculares, principalmente no lobo esquerdo. Barra de escala = 1 mm. Cabeça de seta amarela indica congestões vasculares. (C) Gráfico representa o diâmetro do lobo hepático esquerdo no grupo CNT (lobo hep. CNT) e no grupo exposto com MeHg (lobo hep. MeHg). (D) Gráfico representa o diâmetro do lobo hepático direito no grupo CNT (lobo hep. CNT) e no grupo exposto ao MeHg (lobo hep. MeHg). * indica $p < 0,05$. Valores apresentados em média \pm erro padrão da média. Fonte: da própria autora

O lobo esquerdo dos fígados expostos ao MeHg obteve um maior comprimento vertical quando comparado com o grupo CNT. O diâmetro médio dos fígados expostos ao MeHg foi de 6,99 mm ($\pm 0,17$), enquanto que o do grupo CNT foi de 5,59 mm ($\pm 0,26$; $p < 0,01$) (Figura 8C). Apesar de ter havido uma diferença significativa no comprimento do lobo esquerdo dos fígados, o mesmo não ocorreu entre o lobo direito dos dois grupos estudados, onde os resultados obtidos foram de 6,96 mm ($\pm 0,37$) para o grupo CNT e 7,49 mm ($\pm 0,70$) para os embriões expostos ao MeHg (Figura 8D). É possível que o aumento verificado no lobo esquerdo tenha

sido uma consequência do processo de congestão vascular observado nessa região, já que não foi encontrado aumento no lobo direito e nenhum processo de congestão vascular.

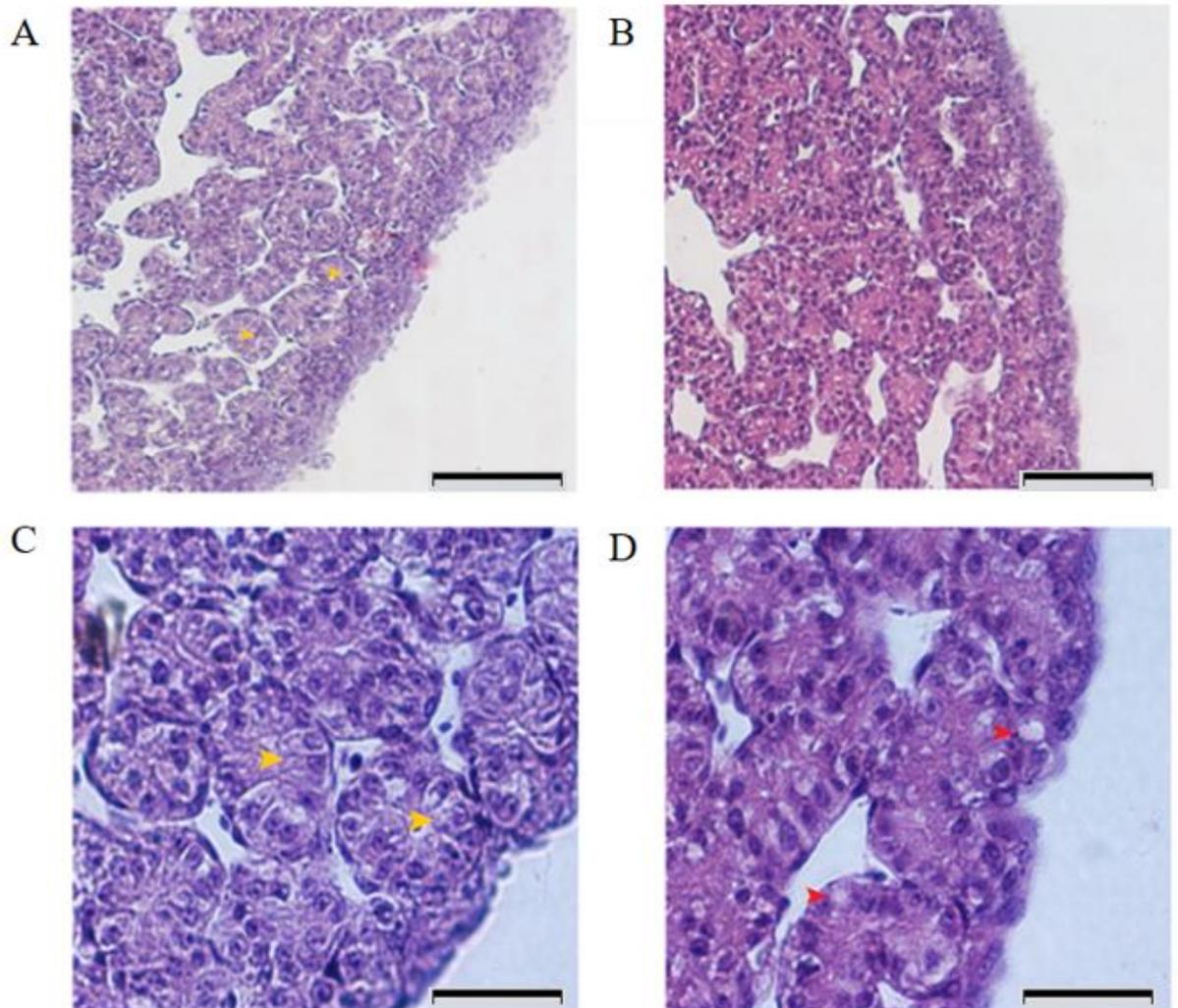
4.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO TECIDO HEPÁTICO

Diferenças foram observadas entre o grupo exposto ao MeHg e o grupo CNT. Os fígados expostos ao MeHg, apresentaram a composição tecidual menos densa, com poucos cordões hepáticos. Além disso, foi observado que a maior parte das células, especialmente próximas às regiões de vasos apresentaram uma elevada quantidade de gordura, identificada como espaços circulares no interior celular, caracterizando um quadro de esteatose hepática e conferindo às células formatos irregulares devido ao acúmulo de gordura na célula. No grupo CNT foi possível perceber que a organização tecidual estava bastante íntegra e densa, com formações de diversos cordões hepáticos, dando origem a estruturas circulares (Figura 9). Os formatos das células mantiveram um padrão regular, marcados pela ausência de características de esteatose hepática. Ung et al. (2010), em seu estudo utilizando cloreto de mercúrio (HgCl_2) também percebeu células irregulares e desorganizadas no fígado de indivíduos expostos ao HgCl_2 , enquanto que o grupo CNT manteve suas células homogêneas e bem delineadas. Não foi identificado processo de inflamação ou necrose nos grupos estudados.

Foram observadas alterações de coloração em secções de fígado exposto ao MeHg, quando comparado ao grupo CNT. Sabe-se que a hematoxilina é um corante básico e é responsável por corar em roxo as regiões ácidas, como o núcleo da célula e regiões de citoplasma com RNA, enquanto que a eosina é um corante rosa e com característica ácida, por isso, tende a corar regiões básicas da célula (McJUNKIN, 1915; SMITH et al., 2018).

A diferença observada nas colorações pode significar uma alteração celular nos fígados expostos ao MeHg, como uma alteração no pH do citoplasma celular. Essas diferenças foram encontradas em fígados de uma mesma lâmina histológica, o que significa que a coloração usada para o grupo CNT e para o grupo exposto ao MeHg foi a mesma, sendo assim, essa variação das cores não deve ter relação com o protocolo de coloração utilizado e sim, com a exposição ao MeHg.

Figura 9: Organização tecidual de fígado de embrião de *Gallus domesticus* em E10 corado com Hematoxilina e Eosina.



(A) Representa a organização de cordões hepáticos, no grupo CNT. (B) Representa a falta de cordões hepáticos no tecido exposto ao MeHg. (C) Representa a mesma região de A (CNT). (D) Representa a mesma região de B (exposto ao MeHg), destacando o acúmulo de gordura nos hepatócitos. Seta amarela representa cordões hepáticos formados. Seta vermelha representa o acúmulo de gordura nos hepatócitos. Barra de escala em A e B = 10 μ m. Barra de escala em C e D = 20 μ m. Fonte: da própria autora

Apesar de não terem ocorrido variações significativas no IHS e no valor total de MF, o que poderiam ser importantes indicativos de lesões hepáticas (TIKARE et al., 2013), ocorreram alterações marcantes na análise histológica do tecido. O acúmulo visível de lipídeos nos hepatócitos é um fator relevante em termos clínicos. Caso isso aconteça em indivíduos adultos o resultado pode ser o aparecimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (FOUGERAT et al., 2020). Arellano, Storch e Sarasquete (1999) já haviam observado a capacidade do MeHg de

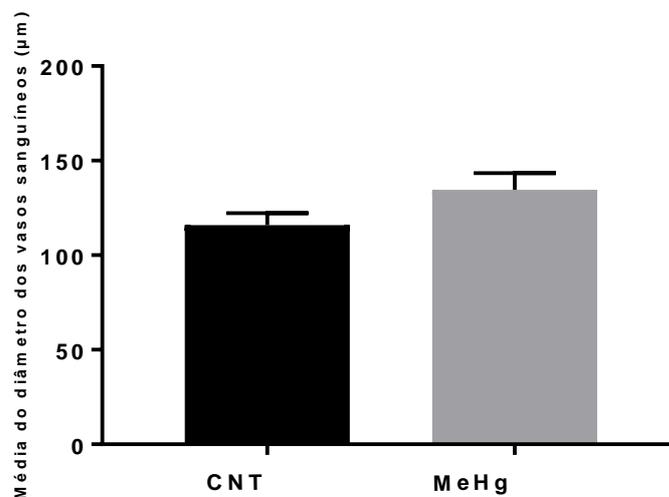
induzir as células a acumularem lipídeos e associaram esse processo como uma possível disfunção no metabolismo de lipídeos.

Apesar do fígado adulto ser um órgão com capacidade de regeneração, danos teciduais graves e recorrentes podem comprometer o processo de cura e gerar um tecido fibroso na região lesionada. A esteatose hepática pode ser considerada um grave problema, oferecendo riscos para a saúde do indivíduo, uma vez que, pode causar inflamações e necrose no tecido hepático, possibilitando o aparecimento de outros problemas metabólicos (YEH e BRUNT, 2014; FRANCQUE et al., 2021).

4.5 DIÂMETRO DOS VASOS SANGUÍNEOS

O diâmetro dos vasos sanguíneos não foi significativamente diferente entre o grupo exposto ao MeHg e CNT. A exposição ao MeHg não promoveu alterações no diâmetro médio dos vasos sanguíneos. Nos embriões expostos o diâmetro médio foi de 134,5 μm ($\pm 8,82$), enquanto que nos embriões do grupo CNT foi de 116 μm ($\pm 6,24$) (Figura 10).

Figura 10 – Diâmetro dos vasos sanguíneos do fígado de embriões de *Gallus domesticus* em E10 expostos ao MeHg.



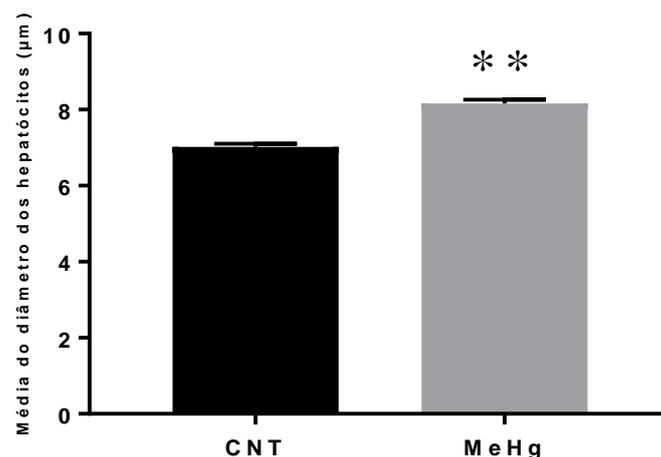
Valores apresentados em média \pm erro padrão da média. Fonte: da própria autora

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre o diâmetro dos vasos sanguíneos de embriões exposto ao MeHg em comparação com o grupo CNT, sabe-se que em adultos o MeHg é considerado um agente capaz de reduzir a formação de células endoteliais, diminuir os processos migratórios das mesmas e danificá-las (KISHIMOTO et al., 1995; DAO et al., 2016; WIGGERS et al., 2016). Conseqüentemente, esse composto é seriamente associado a problemas de saúde, como o desenvolvimento de arteriosclerose (KISHIMOTO et al., 1995; DAO et al., 2016; WIGGERS et al., 2016).

4.6 MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DOS HEPATÓCITOS

A exposição ao MeHg promoveu alterações no diâmetro dos hepatócitos adjacentes aos vasos. Nos embriões expostos o diâmetro médio foi de 8,161 μm ($\pm 0,09$), enquanto que nos embriões do grupo CNT foi de 7,01 μm ($\pm 0,08$; $p < 0,001$) (Figura 11).

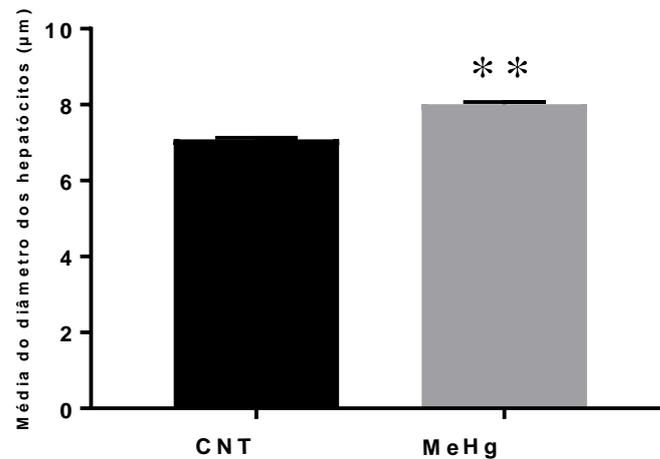
Figura 11 – Diâmetro dos hepatócitos adjacentes aos vasos sanguíneos de fígados de embriões de *Gallus domesticus* em E10 expostos ao MeHg.



Valores apresentados em média \pm erro padrão da média. *** indica $p < 0,001$. Fonte: da própria autora

A exposição ao MeHg promoveu alterações no diâmetro dos hepatócitos não adjacentes aos vasos sanguíneos. Nos embriões expostos o diâmetro médio foi de 8,01 μm ($\pm 0,05$) enquanto que nos embriões do grupo CNT foi de 7,09 μm ($\pm 0,03$; $p < 0,001$) (Figura 12).

Figura 12: Diâmetro de hepatócitos não adjacentes aos vasos de fígados de embriões de *Gallus domesticus* em E10 expostos ao MeHg.



Valores apresentados em média \pm erro padrão da média. *** indica $p < 0,001$. Fonte: da própria autora

O aumento no diâmetro dos hepatócitos é um fator observado em animais expostos a compostos tóxicos como o etanol e que apresentaram características de esteatose hepática, com grande acúmulo lipídico dentro das células. Esse acúmulo de lipídeos foi relacionado com a conformação diferente das células que o continham, uma vez que as células dos animais CNT apresentaram uma conformação normal e característica de um fígado saudável (LUCY et al., 2009; REIMERS et al., 2013). Assim como observado por March et al. (1982) e Lewis et al. (1993), os resultados do presente estudo representam a toxicidade do MeHg e sua alta capacidade de acumulação no fígado. Além disso, a exposição dos embriões de galinha a 0,1 μg MeHg/50 μL de solução salina em estágios iniciais do desenvolvimento promoveram alterações semelhantes em animais expostos ao etanol (LUCY et al., 2009; REIMERS et al., 2013).

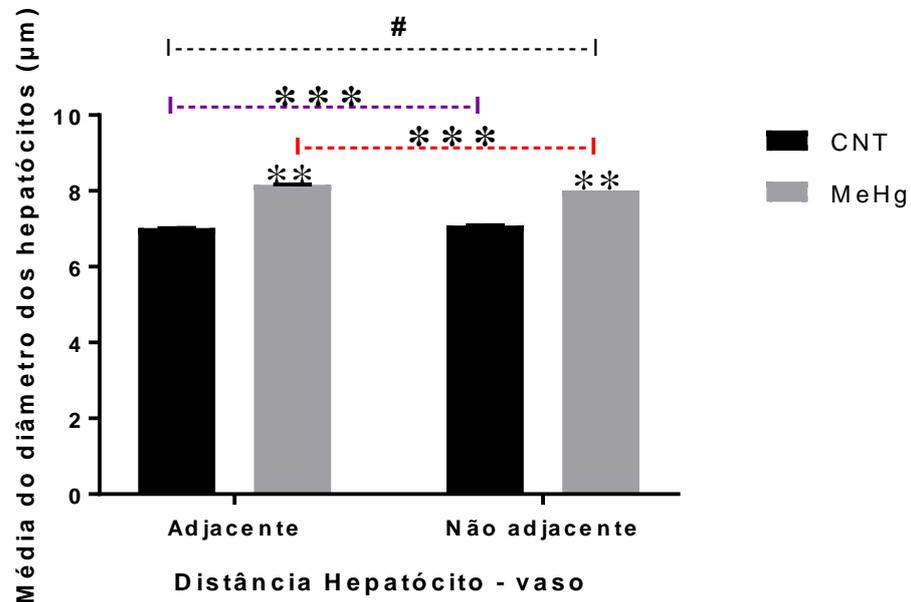
Os resultados referentes a esteatose e ao aumento do diâmetro dos hepatócitos configuram-se como dados relevantes, pois são características que podem ser associadas a um posterior desenvolvimento de necrose celular, apesar dessa condição não ter sido observada no presente estudo (REIMERS et al., 2013).

Os hepatócitos adjacentes e não adjacentes aos vasos, tanto para os expostos ao MeHg quanto para os CNT, possuem uma diferença significativa quando comparados entre si ($F = 91,62$; $p < 0,0001$), o que demonstra a interação da exposição ao MeHg com o hepatócito exposto (FIGURA 13). Os hepatócitos expostos ao MeHg adjacentes aos vasos apresentaram um diâmetro maior do que os hepatócitos não adjacentes aos vasos. Analisando os fígados expostos ao MeHg, foi visto que os hepatócitos adjacentes aos vasos apresentam maior acúmulo lipídico em comparação aos que estavam mais distantes. Levando em consideração o conceito de ácino hepático (RAPPAPORT et al., 1954), essa observação faz-se compreensível, uma vez que, os hepatócitos na periferia dos vasos são os primeiros a receberem o sangue e por isso podem ter recebido uma maior quantidade de MeHg quando comparado aos hepatócitos que localizam-se mais distantes dos vasos.

Esses resultados sugerem que as células adjacentes aos vasos foram mais danificadas (RAPPAPORT et al., 1954) e conseqüentemente, acumularam uma maior quantidade de gordura em seu interior, fazendo com que seu tamanho aumentasse, já as células não adjacentes aos vasos não foram tão comprometidas e por isso tiveram um menor acúmulo lipídico.

O aumento no diâmetro dos hepatócitos adjacentes aos vasos, associado à esteatose, sugerem que alterações em células endoteliais podem ter ocorrido, sendo responsáveis por danos fisiológicos e podendo também causar danos na funcionalidade do fígado, uma vez que, essas alterações podem interferir na troca de nutrientes e de processos como a sinalização celular (MELA et al. 2007).

Figura 13 – Comparação entre o diâmetro dos hepatócitos adjacentes aos vasos e não adjacentes aos vasos.

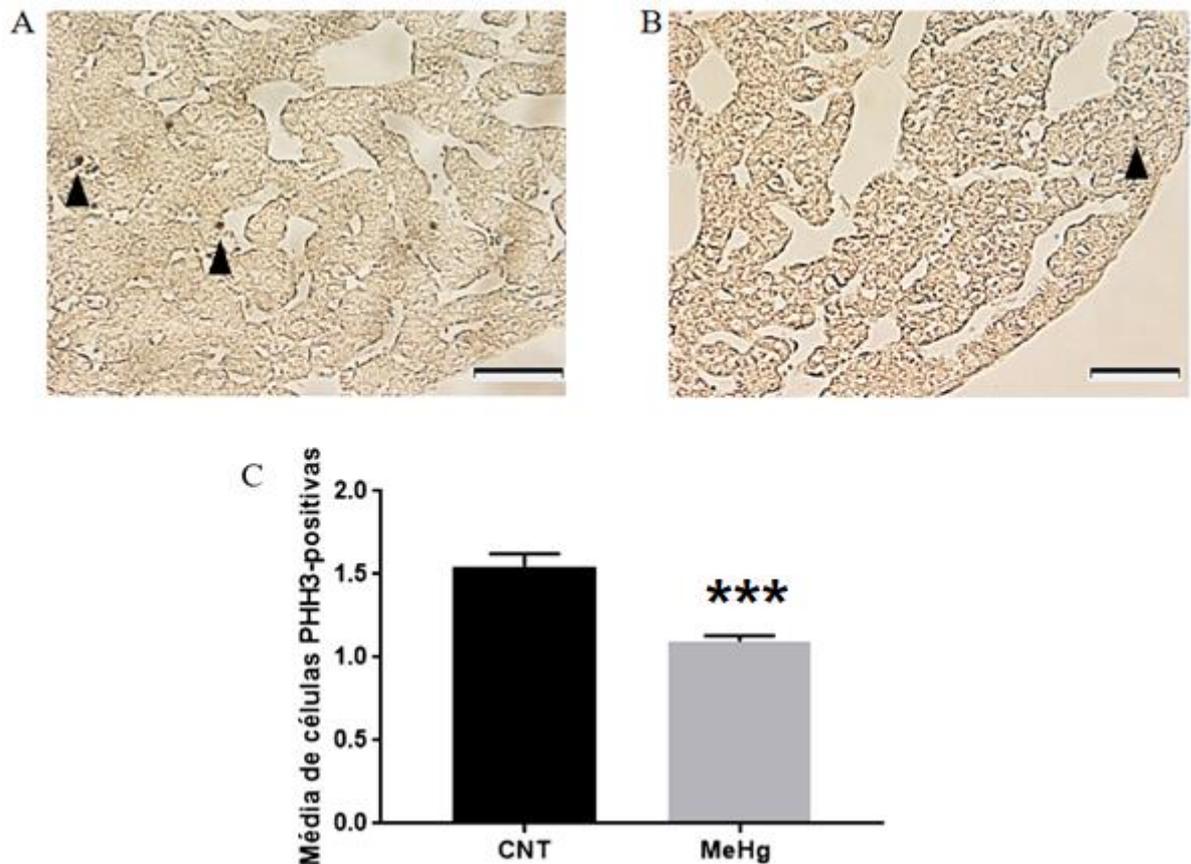


Diâmetro dos hepatócitos adjacentes aos vasos (Adjacente) e de hepatócitos não adjacente aos vasos (Não adjacente) do fígado de embriões de *Gallus domesticus* em E10 de grupos CNT e expostos ao MeHg. Linha pontilhada vermelha indica comparação entre grupos expostos ao MeHg. Linha pontilhada roxa indica comparação entre grupos CNT. Linha pontilhada preta indica a comparação entre todos os grupos. ** indica $p < 0,001$. *** indica $p < 0,0001$. # indica interação entre a exposição ao MeHg e o diâmetro dos hepatócitos. Valores apresentados em média \pm erro padrão da média. Fonte: da própria autora

4.7 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS HEPATÓCITOS

As análises revelaram uma redução nos processos de proliferação celular significativamente maior no grupo exposto ao MeHg. Embriões expostos ao MeHg apresentaram uma média de 1,09 hepatócitos PHH3-positivos ($\pm 0,03$) (Figura 14B), enquanto que no grupo CNT foram contabilizados 1,54 hepatócitos PHH3-positivos ($\pm 0,07$; $p < 0,0001$) (Figura 14A).

Figura 14 – Análise de proliferação celular por imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-PHH3



(A) Representa a Proliferação celular em fígado de embriões de *Gallus domesticus* em E10 em grupo CNT. (B) Apresenta a proliferação celular em grupo exposto ao MeHg. Setas indicam as marcações celulares. (C) Gráfico indica o número médio de células PHH3-positivas para grupo CNT e exposto ao MeHg. Barra de escala = 20 μ m. *** indica $p < 0,0001$. Valores apresentados em média \pm erro padrão da média. Fonte: da própria autora

A proteína PHH3 age no processo de remodelação da cromatina durante o período de condensação cromossômica na mitose, sendo assim, os resultados obtidos com as análises de imuno-histoquímica tiveram como objetivo mostrar as marcações celulares referentes a proliferação celular, no intuito de destacar possíveis prejuízos nesse processo devido à exposição ao MeHg (HENDZEL et al., 1997).

A redução da proliferação celular causada pela exposição ao MeHg foi observada por outros pesquisadores, os quais associaram o MeHg a prejuízos relacionados a proliferação celular em regiões como o sistema nervoso central e o coração (HUYCK et al., 2015; RONCONI-KRÜGER, 2019). O resultado observado no fígado pode estar associado a consequências como a desorganização tecidual e ao fato de que o tecido dos fígados expostos

ao MeHg estava menos denso quando comparado ao grupo CNT, uma vez que a proliferação celular é um processo importante para que novas células sejam geradas, contribuindo para o desenvolvimento adequado do órgão.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram que o MeHg impacta diretamente o fígado de embriões de *G. domesticus*. O MeHg está associado ao aumento no diâmetro de hepatócitos adjacentes aos vasos e não adjacentes aos vasos, bem como, a danos teciduais como esteatose hepática, conseqüentemente fazendo com que as células adquiram formatos irregulares. O MeHg está associado ao surgimento de congestão vascular no fígado de embriões, apesar do diâmetro médio dos vasos não ter sido alterado. Além disso, a exposição ao MeHg causou uma redução significativa nos processos de proliferação celular. Levando em consideração todas as alterações que foram observadas neste trabalho, as alterações no diâmetro dos hepatócitos associadas ao acúmulo de gordura intracelular foram consideradas como o dano hepatotóxico mais severo em embriões de *G. domesticus*, uma vez que, os hepatócitos são o principal tipo celular que compõe o fígado e o seu comprometimento pode ocasionar sérios problemas para o embrião, já que o fígado embrionário possui uma importante função hematopoiética (Figura 15).

Figura 15 - Resumo gráfico apresentando resultados analisados em fígado de *Gallus domesticus* exposto ao MeHg.

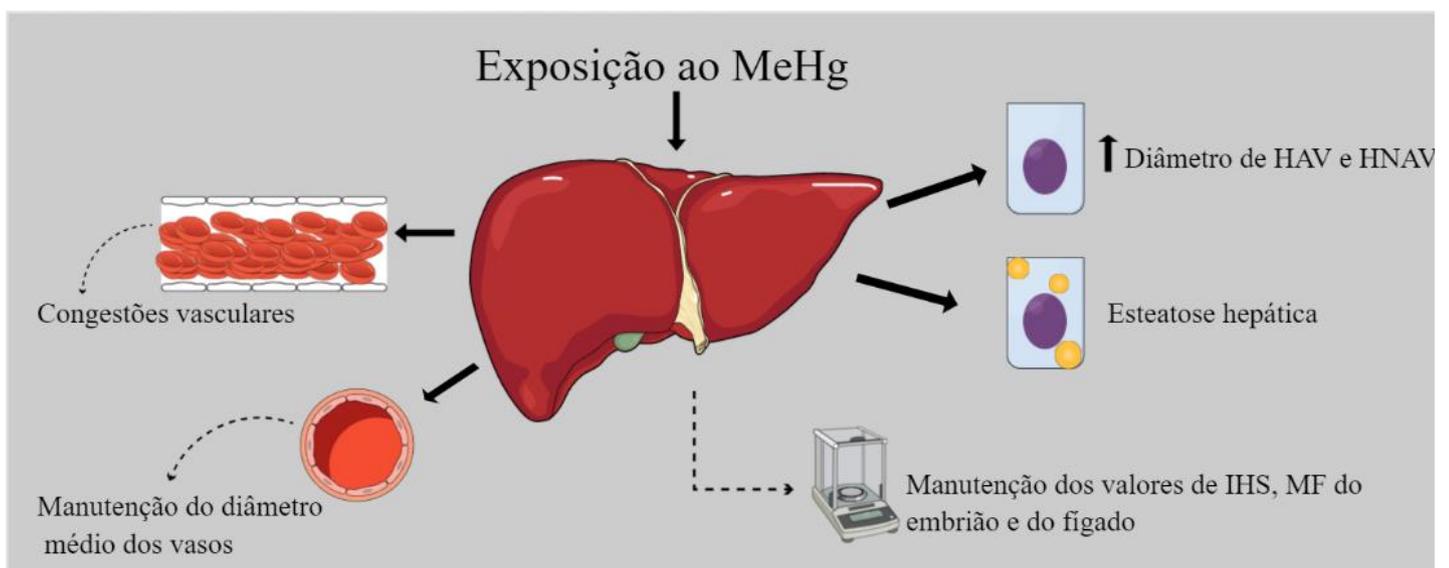


Figura representa o fígado de embrião de *Gallus domesticus* exposto ao MeHg. HAV (Hepatócitos adjacentes a vasos). HNAV (hepatócitos não adjacentes a vasos). Fonte: da própria autora, por meio da plataforma Mindthegraph.

6 REFERÊNCIAS

- ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the *Senegales Sole*, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44: 62-72.
- AZIZ, A.T.; FLETCHER, O.J. 2016. Hepatobiliary system. *In*: AZIZ, A.T. 2016. *Avian histopathology*. 4ª. Ed. American Association of Avian Pathologists, 663p.
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. 2005. *Atlas of Chick Development*. 2ª. Ed. Academic Press, 470p.
- BERTOSSI, M.; GIROLAMO, F.; ERREDE, M.; VIRGINTINO, D.; ELIA, G.; AMBROSI, L.; RONCALI, L. 2004. Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. *NeuroToxicology*, 25: 849-857.
- BIRGE, W.J.; ROBERTS, O.W. 1976. Toxicity of metals to chick embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 16: 319-324.
- BUZATO, C.B.C; ARANA, Sarah; CARVALHO, C.P.F. 2016. Histologia do fígado, vias biliares e pâncreas. *In*: *Sistema digestório: integração básico-clínica*. Blucher, 368p.
- BROSNAN, M.E.; SYMONDS, G.W.; HALL, D.E.; SYMONDS, D.L.1977. Polymine metabolism in liver of young rats. *Biochemistry Journal*, 174: 727-732.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. 2010. Guidelines on Euthanasia of Animals Used in Science. Disponível em:< <https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Euthanasia.pdf>>. Acesso em: 08 de Janeiro de 2022.
- CARLSON, B.M. 2014. *Human embryology and developmental biology*. 5ª. Ed. Saunders Elsevier, 506p.
- CARVALHO, C.M.; NAZARI, M.E.; FARINA, M.; MÜLLER, R.M.Y. 2008. Behavioral, morphological, and biochemical changes after *in ovo* exposure to methylmercury in chicks. *Toxicological Sciences*, 106: 180 – 185.
- DAO, C.V.; ISLAM, MD.Z.; SUDO, K.; SHIRAISHI, M.; MIYAMOTO, A. 2016. MARCKS is involved in methylmercury-induced decrease in cell viability and nitric oxide production in EA.hy926 cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78: 1569- 1576.
- DAVEY, M.G.; TICKLE, C. 2007. The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenetic and Genome Research*, 117: 231–239.
- DOI, R.; OHNO, H.; HARANDA, M. 1984. Mercury in feathers of wild birds from the mercury – polluted area along the shore of the Shiranui Sea, Japan. *Science of the Total Environment*, 40: 155-167.
- Environmental health criteria 101 – methylmercury. INCHEM, 1990. Disponível em: <<https://incchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm#SectionNumber:1.1>>. Acesso em: 27 de novembro de 2021.

- FOUGERAT, A.; MONTAGNER, A.; LOISEAU, N.; GUILLOU, H.; WAHLI, W. 2020. Peroxisome proliferator-activated receptors and their novel ligands as candidates for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Cells*, 9: 1638.
- FRANCQUE, S.M.; MARCHESINI, G.; KAUTZ, A.; WALMSLEY, M.; SORNER, R.; LAZARUS, J.V.; ZELBER-SAGI, S.; HALLSWORTH, K.; BUSETTO, L.; FRÜHBECK, G.; DICKER, D.; WOODWARD, E.; KORENJAK, M.; WILLEMSE, J.; KOEK, G.H.; VINKER, S.; UNGAN, M.; MENDIVE, J.M.; LIONIS, C. 2021. Non-alcoholic fatty liver disease: A patient guideline. *JHEP Reports*, 3: 100322
- FREEMAN, B., M.; VINCE, M.A. 1974. Development of the avian embryo: A behavioral and physiological study. 1^a. ED. Chapman and Hall. 362p.
- FUYUTA, M.; FUJIMOTO, T.; HIRATA, S. 1978. Embryotoxic effects of methylmercuric chloride administered to mice and rats during organogenesis. *Teratology*, 18: 353-365.
- GLAZER, L.; BRENNAN, C.H.; 2021. Developmental exposure to low concentrations of methylmercury causes increase in anxiety-related behaviour and locomotor impairments in zebrafish. *International Journal of Molecular Science*, 22: 10961
- GUEDES, P.T.; de OLIVEIRA, B.C.; MANSO, P.P.; CAPUTO, L. F.; COTTA-PEREIRA, G.; PELAJO-MACHADO, M. 2014. Histological analyses demonstrate the temporary contribution of yolk sac, liver, and bone marrow to hematopoiesis during chicken development. *Plos One*, 9: e90975.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, G.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88: 49-92.
- HARANDA, M. 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, 25: 1-24.
- HAZELWOOD, R.L. 1999. Pancreas. In: WHITTOW, G.C. 1999. *Sturkie's avian physiology*. 5^a. Ed. Academic Press, 704p.
- HENDZEL, M.J.; WEI, Y.; MANCINI, M.A.; VAN HOOSER, A.; RANALLI, T.; BRINKLEY, B.R.; ALLIS, C. D. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106: 348–360.
- HOFFMAN, D.J.; MOORE, J.M. 1979. Teratogenic effects of external egg applications of methyl mercury in the mallard, *Anas platyrhynchos*. *Teratology*, 20: 453-461.
- HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J. 2003. *Handbook of ecotoxicology*. 2^a. Ed. Lewis Publishers, 1290p.
- HONG, Y.S.; KIM, Y.M.; LEE, K.E. 2012. Methylmercury exposure and health effects. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 45: 353-363.
- HUYCK, R.W.; NAGARKAR, M.; OLSEN, N.; CLAMONS, S.E.; SAHA, M.S. 2015. Methylmercury exposure during early *Xenopus laevis* development affects cell proliferation and death but not neural progenitor specification. *Neurotoxicology and Teratology*, 47: 102-113.
- KIERNAN, F. 1833. The anatomy and physiology of the liver. *Phil Trans Roy Soc*, 123: 711-770.

- KIDD, K.; CLAYDEN, M.; JARDINE, T. 2011. Bioaccumulation and biomagnification of mercury through food webs. *In*: LIU, G.; CAI, Y.; O'DRISCOLL, N. (Eds.). Environmental chemistry and toxicology of mercury. Wiley-Blackwell, 453-499 pp.
- KISHIMOTO, T.; OGURI, T.; ABE, M.; KAJITANI, H.; TADA, M. 1995. Inhibitory effect of methylmercury on migration and tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Archives of Toxicology*, 69: 375-361.
- KMIEĆ, Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease, vol.161. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 154pp.
- LAROSE, C.; CANUEL, R.; LUCOTTE, M.; GIULIO, R.T.D. 2008. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147: 139-149.
- LATIF, M.A.; BODALY, R.A.; JOHNSTON, T.A.; FUDGE, R.J.P. 2001. Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of walleye (*Stizostedion vitreum*). *Environmental Pollution*, 111: 139-148.
- LEWIS, S.A.; BECKER, P.H.; FURNESS, R.W. 1993. Mercury levels in eggs, tissues and feathers of herring gulls *Larus argentatus* from the german Wadden Sea coast. *Environmental Pollution*, 80:293-299.
- LU, J.W.; MCMURTY, J.P.; COON, C.N. 2007. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. *Poultry Science*, 84: 673-683.
- LUCEY, M.R.; MATHURIN, P.; MORGAN, T.R. 2009. Alcoholic Hepatitis. *New England Journal of Medicine*, 360: 2758-2769.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. 2003. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75: 469-486.
- MARCH, B.E.; POON, R.; CHU, S. 1983. The dynamics of ingested methylmercury in growing and laying chickens. *Poultry Science*, 62: 1000-1009.
- MCENERNEY, L.; DUNCAN, K.; BANG, BR.; ELMASRY, S.; LI, M.; MIKI, T.; RAMAKRISHNAN, S.K.; SHAH, Y.M.; SAITO, T. Dual modulation of human hepatic zonation via canonical and non-canonical Wnt pathways. *Experimental and Molecular Medicine*, 49: e413.
- McJUNKIN, F.A. 1915. The local action of lead. *The Journal of Medical Research*, 32: 271-282.
- MELA, M.; M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 426-435.
- OLSON, F.C.; MASSARO, E.J.; 1977. Effects of methyl mercury on murine fetal amino acid uptake, protein synthesis and palate closure. *Teratology*, 16: 187-194.
- PEREIRA, J.J.; ALLEN, R.M.; KUROPAT, C.; LUEDKE, D.; SENNEFELDER, G. 1993. Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Archives of Environmental Contamination and toxicology*, 24: 427-431.

- RAPPAPORT, A.M. 1976. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beiträge zur Pathologie*, 157: 215-243.
- RAPPAPORT, A.M.; BOROWY, Z.J.; LOUGHEED, W.M.; LOTTO, W.N. 1954. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *The Anatomical Record*, 119: 11-33.
- REIMERS, E.G.; PRIETO, M.J.M.; PÉREZ, J.M.G.; CASTÉLLON, M.C.D.; MARTÍN, L.G.; GONZÁLES, P.A.; PÉREZ, M.J.S.; FERNÁNDEZ, F.S. 2013. Relative and combined effects of selenium, protein deficiency and ethanol on hepatocyte ballooning and liver steatosis. *Biological Trace Element Research*, 154: 218-287.
- RONCONI-KRÜGER, N. 2019. Toxicidade do metilmercúrio durante o desenvolvimento do coração: uma abordagem celular e tecidual utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo experimental. (Tese Mestrado em Biologia celular e do desenvolvimento) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p.66.
- ROSA-SILVA, H.T.; PANZENHAGEN, A.C.; SCHMIDT, V.; TEIXEIRA, A.A.; ESPITIA-PÉREZ, P.; FRANCO, A.O.; MINGORI, M.; TORRESÁVILA, J.F.; SCHNORR, C.E.; HERMANN, P.R.S.; MORAES, D.P.; ALMEIDA, R.F.; MOREIRA, J.C.F. 2020. Hepatic and neurobiological effects of foetal and breastfeeding and adulthood exposure to methylmercury in Wistar rats. *Chemosphere*, 244.
- SCHULZE, R.J.; SCHOTT, M.B.; CASSEY, C.A.; TUMA, P.L.; McNIVEN, M.A. 2019. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *Journal of Cell Biology*, 218: 2096-2112.
- SHIN, D.; MONGA, S.P. 2013. Cellular and molecular basis of liver development. *Comprehensive Physiology*, 3: 799-815.
- SMITH, S.A.; NEWMAN, S.J.; COLEMAN, M.P.; ALEX, C. 2018. Characterization of the histologic appearance of normal gill tissue using special staining techniques. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30: 688-698.
- STOPFORD, W.; GOLDWATER, L.J. 1975. Methylmercury in the environment: A review of current understanding. *Environmental Health Perspectives*, 12:115-118.
- TIKARE, S.N.; YENDIGERI, S.; GUPTA, A.D.; DHUNDASI, S.A.; DAS, K.K. 2013. Protective effect of α -tocopherol against hematotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by nickel sulfate in male albino rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 57: 280-292.
- UNG, C.Y.; LAM, S.H.; HLAING, M.M.; WINATA, C.L.; KORZH, S.; MATHAVAN, S.; GONG, Z. 2010. Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *BMC Genomics*, 11.
- VAREKAMP, J.C.; BUSECK, P.R. 1986. Global mercury flux from volcanic and geothermal sources. *Applied Geochemistry*, 1: 65–73.
- VEGA, R.S.A.; CAPITAN, S.S.; LAMBIO, A.L.; GARCIA, B.R.; RIVERO, H.I. 2011. Low levels of organochlorine residues in combination with cadmium in feed at peripubertal stage of domestic mallard (*Anas platyrhynchos linn*). *Journal of Environmental Science and Management*, 14: 21-27.

- WENTZ, D.A.; BRIGHAM, M.E.; CHASAR, L. C.; MICHELLE, A. L. KRABBENHOFT, D. P. 2014. Mercury in the nation's streams – levels, trends, and implications. U.S. Geological Survey Circular, 1395.
- WIGGERS, G.A.; FURIERI, L.B.; BRIONES, A.M.; AVENDAÑO, M.S.; PEÇANHA, F.M.; VASSALLO, D.V.; SALAICES, M.; ALONSO, M.J. 2016. Cerebrovascular endothelial dysfunction induced by mercury exposure at low concentrations. *Neuro Toxicology*, 53: 282-289.
- YEH, M.M.; BRUNT, E.M. 2014. Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology*, 147: 754-764.