



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

Nathália Ronconi Zilli Krüger

**A EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO ALTERA O DESENVOLVIMENTO DOS  
VASOS EXTRAEMBRIÓNICOS E INTRAEMBRIÓNICOS EM EMBRIÕES DE  
*Gallus domesticus***

Florianópolis

2024

Nathália Ronconi Zilli Krüger

**A EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO ALTERA O DESENVOLVIMENTO DOS  
VASOS EXTRAEMBRIÓNICOS E INTRAEMBRIÓNICOS EM EMBRIÕES DE  
*Gallus domesticus***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dra. Evelise Maria Nazari

Florianópolis

2024



Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Krüger, Nathália Ronconi Zilli  
A EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO ALTERA O DESENVOLVIMENTO  
DOS VASOS EXTRAEMBRIÓNICOS E INTRAEMBRIÓNICOS EM  
EMBRIÕES DE *Gallus domesticus* / Nathália Ronconi Zilli  
Krüger ; orientadora, Evelise Maria Nazari, 2024.  
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,  
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.  
Embriotoxicidade. 3. Disfunção vascular. 4. Contratilidade  
cardíaca . 5. Metabolismo hepático; 6. Maturação  
pulmonar.. I. Nazari, Evelise Maria. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Nathália Ronconi Zilli Krüger

**A EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO ALTERA O DESENVOLVIMENTO DOS  
VASOS DO CORAÇÃO, FÍGADO E PULMÃO EM EMBRIÕES DE *Gallus  
domesticus***

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 2 de agosto de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Viviane Glaser, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Profa. Jade de Oliveira, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Profa. Juliana Dal-Ri Lindenau, Dra.  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Profa. Evelise Maria Nazari, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2024.



Dedico este trabalho à minha mãe e meu esposo, meus maiores  
incentivadores e pontos de paz nos momentos difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho é fruto de muitos anos de estudo na Universidade Federal de Santa Catarina, na qual tive a oportunidade de me formar, obter o título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento e agora, chego ao fim do doutorado com muito orgulho da minha trajetória e gratidão aos anos de estudo nesta que é uma das melhores universidades do país.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina (FAPESC) pela bolsa de pesquisa concedida, incentivo e investimento. Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pela estrutura e apoio desde a graduação. A Fazenda Experimental da Ressacada, do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, obrigada pelo fornecimento dos ovos fertilizados que foram utilizados nesta pesquisa.

Com relação às pessoas que percorreram o caminho acadêmico comigo, agradeço primeiramente à minha Orientadora de uma vida acadêmica inteira, Profa. Dra. Evelise Maria Nazari. Obrigada por ter me moldado como pesquisadora, cientista, professora e pessoa. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos e irão me acompanhar por toda a vida. És exemplo de dedicação à pesquisa e resiliência.

Além da Profa. Dra. Evelise, agradeço à Profa. Dra Yara Rauh Müller por me aceitarem na equipe do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), onde tive grandes ensinamentos com essas duas grandes inspirações e muitos companheiros. Desde a época da iniciação científica, pessoas como Gillian, Manuela, Eliane, Luciane, Aline que me ensinaram de maneira sólida as boas práticas laboratoriais, bem como me deram de presente muitas manias. Depois vieram os colegas do mestrado e os sobreviventes do doutorado Giuliam e Maico, obrigada pela parceria nesses anos. E não posso deixar de ressaltar a importância do retorno do pós-doutorando do Laboratório, Madson que não pude acompanhar com tanta frequência durante o meu mestrado, mas que com certeza foi um apoiador durante a finalização deste doutorado. Por fim, e não menos importantes estão os mestrandos e ICs Mellanie, Nerveson, Jacqueline, Paulo e Maria Fernanda, vocês sempre foram o momento de descontração e o quentinho no coração da

continuação deste laboratório, mesmo que alguns tenham cruzado o oceano ou seguido outros rumos.

Aos técnicos do LAMEB, muito obrigada pelos credenciamentos, pelas conversas e momentos de apoio.

Neste espaço, irei agradecer a parte mais importante da minha vida, a minha família e amigos. À minha mãe, obrigada por ser minha luz nos dias difíceis, meu ponto de apoio e minha fortaleza de toda vida. Me perdoe as ausências mas você me ensinou a correr atrás dos sonhos e me falou, todas as vezes que seria possível chegar aqui. Aos meus irmãos, obrigada por estarem ao meu lado. Ao meu esposo, obrigada por ter segurado a minha mão, mesmo que suada pela ansiedade do dia-a-dia e ter dito que estaria ali para cada abraço caloroso enquanto lágrimas escorriam, daqui para frente outras preocupações virão e contigo elas são mais fáceis. Aos demais membros da família, sogros, cunhadas, tios (mesmo os que não estão mais aqui) e todos que ao longo de uma vida, viram que esse sonho seria possível, obrigada.

Aos amigos e amigas, agradeço a compreensão das mensagens não respondidas, dos eventos ou encontros cancelados... Obrigada Pâmela, Karoline, Gustavo e Annie. Aos amigos e amigas da vida acadêmica que com toda certeza do mundo estarão na minha vida ou em meus pensamentos, Maria Luísa (que também me ensinou muito enquanto éramos ICs no LRDA) e sua mãe Letícia. Scheila, Claudia, Nicole e Pâmela, obrigada pelos encontros que por muito tempo foram apenas nos corredores do CCB e que tem um pedaço do meu coração. Ao Vinicius, que da maneira mais surpreendente se tornou um amigo sincero. E mais no final desse ciclo, Ronnilda e Gustavo.

Aos que aqui não foram contemplados em nome, mas que com certeza, ao longo desses exatos 11 anos e 11 meses de UFSC fizeram parte dessa história, obrigada!

“Não siga uma carreira científica por fama ou dinheiro. Siga a carreira científica se nada mais lhe trazer satisfação, porque esse 'se nada mais' é provavelmente o que você vai receber. Sua recompensa é a ampliação do horizonte na medida em que você avança. E se você alcançar essa recompensa, não vai desejar nenhuma outra”.

(Cecília Payne-Gaposchkin)

## APRESENTAÇÃO DE TESE

A toxicidade do metilmercúrio (MeHg) ficou conhecida no contexto científico após acidentes no Japão e no Iraque, onde gestantes expostas tiveram recém-nascidos com danos no desenvolvimento do sistema nervoso central. Esses eventos destacaram a capacidade do MeHg de causar impactos durante o desenvolvimento embrionário. Esse histórico combinado aos estudos epidemiológicos com crianças e jovens com alterações de pressão arterial e na frequência cardíaca, provocaram o nosso interesse. Assim, durante o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PPGBCD), caracterizamos o impacto do MeHg no desenvolvimento do coração, especificamente relacionado à morfologia tecidual, utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo experimental. Diante disso, durante o doutorado, expandimos o foco da pesquisa para além do desenvolvimento cardíaco, abrangendo o estudo para o desenvolvimento vascular extraembrionário e intraembrionário frente à exposição ao MeHg. Assim, esta tese é organizada em uma introdução que enfoca o desenvolvimento vascular, do coração, do fígado, do pulmão e o tônus vascular. O objetivo deste trabalho é a investigação dos efeitos do MeHg no desenvolvimento da vasculatura extraembrionária e intraembrionária, com ênfase nos vasos e nas células do coração, fígado e pulmão de embriões de *G. domesticus*. Apresentamos ainda a seção de materiais e métodos utilizados e dois capítulos, que correspondem aos artigos científicos com os resultados do período do doutorado. O primeiro artigo já publicado, aborda impactos do MeHg na organização dos vasos extraembrionários e cardíacos e os efeitos na contratilidade cardíaca. O segundo artigo envolve as diferenças vasculares do fígado e do pulmão, órgãos de mesma origem embrionária, com diferentes organizações teciduais e as respostas específicas de cada um deles frente à toxicidade do MeHg. A sessão de discussão abrange os efeitos do MeHg durante o desenvolvimento da vasculatura extraembrionária, do coração, fígado e pulmão e suas células específicas, seguida da conclusão deste estudo.

## RESUMO

Estudos mostram que o metilmercúrio (MeHg) afeta o sistema cardiovascular em adultos e crianças, além de causar danos ao desenvolvimento embrionário devido à maior suscetibilidade dos indivíduos nas fases iniciais do ciclo de vida. Considerando a importância da formação vascular durante o desenvolvimento embrionário, este estudo investigou os efeitos do MeHg no desenvolvimento da vasculatura extraembrionária e intraembrionária, assim como nos cardiomiócitos, hepatócitos e células epiteliais (cúbicas e colunares) pulmonares, utilizando embriões de *Gallus domesticus*. Ovos fertilizados foram incubados a 37,5°C ( $\pm$  0,5) e 65% de umidade. Após um dia e meio de incubação (E1,5), os embriões foram expostos *in ovo* a 0,1  $\mu$ g MeHg/50  $\mu$ L de solução salina a 0,9%, e analisados no 10º dia de incubação (E10). Embriões controle receberam exclusivamente 50  $\mu$ L de solução salina (CEUA/UFSC/nº 5843231018). Após a retirada dos embriões das membranas do ovo, foi avaliada a concentração de NOx nos vasos extraembrionários e do coração, do fígado e do pulmão. Tais tecidos foram então fixados para as demais análises teciduais e celulares. Nos vasos extraembrionários, foi observado o aumento no diâmetro e no número dos vasos, redução no conteúdo de VEGF e aumento no conteúdo de VCAM, proteínas envolvidas na formação e integridade dos vasos. No coração, foi observado aumento no diâmetro das veias, reorganização das artérias coronárias e redução no conteúdo de VEGF e VCAM, e aumento no conteúdo de cTnI, proteína envolvida na contração cardíaca. No fígado, foi observado aumento no diâmetro e redução no número dos vasos sanguíneos, reorganização da distribuição vascular e os hepatócitos apresentaram acúmulo de lipídios. No pulmão, foi observado aumento no diâmetro dos vasos sanguíneos e redução do tamanho das células epiteliais cúbicas. Os resultados ressaltam os efeitos do MeHg no desenvolvimento embrionário, em que uma única exposição ao MeHg afetou a vasculatura extraembrionária, cardíaca, hepática e pulmonar, além de induzir alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas em células específicas dos órgãos avaliados, evidenciando sua toxicidade sistêmica durante a fase embrionária.

**Palavras-chave:** Embriotoxicidade; Disfunção vascular; Contratilidade cardíaca; Metabolismo hepático; Maturação pulmonar.



## ABSTRACT

Studies show that MeHg affects the cardiovascular system in adults and children, causing embryonic development injury due to a greater susceptibility in the early life cycle stages. Considering the importance of vascular formation during embryonic development, this study investigated the effects of MeHg on the development of extraembryonic and intraembryonic vasculature, as well as in cardiomyocytes, hepatocytes and pulmonary epithelial (cuboidal and columnar) cells, using *Gallus domesticus* embryos. The fertilized eggs were incubated at 37.5°C ( $\pm$  0.5) and 65% humidity. After one and a half day of incubation (E1.5), the embryos were exposed *in ovo* to 0.1  $\mu$ g MeHg/50  $\mu$ L in 0.9% saline solution, applied on the 10<sup>th</sup> day of incubation (E10). Control embryos received exclusively 50  $\mu$ L of saline solution and analyzed at E10 (CEUA/UFSC/no. 5843231018). After removing the embryos from the egg membranes, NOx concentrations in the extraembryonic vessels, heart, liver, and lungs vessels were evaluated. These tissues were subsequently prepared for further tissue and cellular analyses. In extraembryonic vessels, an increase in the diameter and number of vessels, a reduction in VEGF content and an increase in VCAM content, proteins involved in the formation and integrity of vessels, were observed. In the heart, an increase in the diameter of the veins, reorganization of the coronary arteries and a reduction in the content of VEGF and VCAM, and an increase in the content of cTnl, a protein involved in cardiac contraction, were observed. In the liver, an increase in diameter and reduction in the number of blood vessels were observed, reorganization of vascular distribution and hepatocytes found accumulation of lipids. In the lung, an increase in the diameter of blood vessels and a reduction in the size of cuboidal epithelial cells were observed. The results highlight the effects of MeHg on embryonic development, since a single exposure to MeHg affected the extraembryonic, cardiac, hepatic and pulmonary vasculature. Moreover, MeHg treatment induced morphological, physiological and metabolic changes in specific cells of the organs evaluated, demonstrating its systemic toxicity during the embryonic phase.

**Keywords:** Embryotoxicity; Vascular dysfunction; Cardiac contractility; Liver metabolic; Lung maturation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo do mercúrio nos ambientes naturais	18
Figura 2 - Modelos de vasculogênese e angiogênese na formação de vasos sanguíneos embrionários	21
Figura 3 - Desenvolvimento cardíaco de embriões: Da estrutura tubular às quatro cavidades e organização sarcomérica dos cardiomiócitos	22
Figura 4 - Organização da estrutura hepática de vertebrados com detalhe da vascularização	23
Figura 5 - Organização da estrutura pulmonar destacando os brônquios primário, secundário e parabônquio, além de células epiteliais colunares e cúbicas	26
Figura 6 - Desenho experimental de exposição <i>in ovo</i> ao metilmercúrio com o modelo embrionário de <i>Gallus domesticus</i>	32
Figura 7 - Graphical abstract do artigo “Exploring developmental MeHg impact on extraembryonic and cardiac vessels and its effect on cardiomyocyte contractility”	39
Figura 8 - Graphical abstract do artigo “Methylmercury toxicity in the liver and lungs during embryonic development”	42
Capítulo 2	
Figure 1. Hepatic vessels of <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	48
Figure 2. Immunolocalization in the liver of <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	49
Figure 3. Lung vessels of <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	50
Figure 4. Immunolocalization in the lung of <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	51
Figure 5. Hepatocytes from <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	52
Figure 6. Hepatocytes with lipid droplets from <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	53
Figure 7. Epithelial cells and bronchi of <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	56
Figure 8. Lung organization of <i>Gallus domesticus</i> embryos at E10	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cTnI	Troponina Cardíaca I, do inglês <i>cardiac troponin I</i>
DAB	3-3'Diaminobenzidina
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
E	Dia Embrionário
HE	Hematoxilina-Eosina
MeHg	Metilmercúrio
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
N	Tamanho Amostral
NOx	Óxidos de Nitrogênio, do inglês <i>Nitrogen Oxides</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VCAM	Molécula de Adesão de Células Vasculares, do inglês <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>

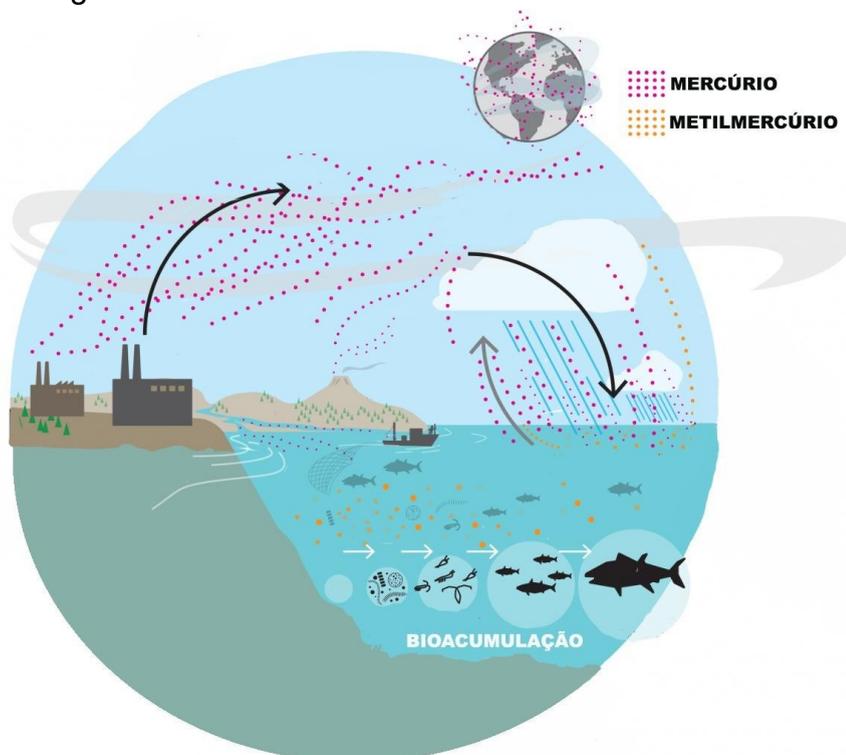
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
3.1 Material biológico	31
3.2 Delineamento dos grupos experimentais	31
3.3 Dosagem de nitrato e nitrito (NOx)	33
3.4 Morfometria dos vasos extraembrionários	33
3.5 Processamento histológico e coloração	33
3.6 Análise morfométrica dos vasos cardíacos, hepáticos, pulmonares, brônquios, células endoteliais, hepatócitos e células epiteliais pulmonares	34
3.6.1 Presença e disponibilidade de polissacarídeos ácidos no tecido hepático e no tecido pulmonar	35
3.6.2 Quantificação de lipídios no tecido hepático	35
3.7 Marcações celulares por imuno-histoquímica	36
3.8. Análise dos sarcômeros do coração	37
3.9. Análises estatísticas	37
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>38</b>
Exploring developmental MeHg impact on extraembryonic and cardiac vessels and its effect on cardiomyocyte contractility	40
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>41</b>
Methylmercury toxicity in the liver and lungs during embryonic development	43
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
4.1. Efeito do MeHg sobre os vasos extraembrionários	70
4.2. Efeito do MeHg sobre o desenvolvimento do coração	71
4.3. Efeito do MeHg sobre o desenvolvimento do fígado	74
4.4. Efeito do MeHg sobre o desenvolvimento do pulmão	76
4.5. Efeito sistêmico do MeHg no desenvolvimento do embrião	78
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>79</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE A.</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE B.</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O metilmercúrio (MeHg) é a forma orgânica mais tóxica do mercúrio (McElwee e Freedman, 2011; Syversen e Kaur, 2012; Ceccatelli et al., 2013). Devido à sua estabilidade molecular, essa forma de mercúrio representa uma maior ameaça à saúde e ao ambiente (Grandjean e Landrigan, 2006), pois sua biodisponibilidade, ou seja, a quantidade de uma substância prontamente disponível para interagir com organismos vivos após sua introdução em um sistema biológico, é maior quando comparada com as outras formas de mercúrio (Yang et al., 2020) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo do mercúrio nos ambientes naturais.



Fonte: modificado de Harvard Magazine  
(<https://www.harvardmagazine.com/2018/06/elsie-sunderland-harvard>).

No Brasil, a contaminação por metilmercúrio está intimamente ligada à mineração de ouro, uma atividade que libera mercúrio no ambiente (Passos & Mergler, 2008). Em comunidades ribeirinhas na Amazônia, onde a dieta é predominantemente baseada em peixes, os indivíduos apresentam níveis

elevados de MeHg no sangue, colocando a saúde dessas populações em risco, especialmente em mulheres grávidas e crianças (Passos & Mergler, 2008).

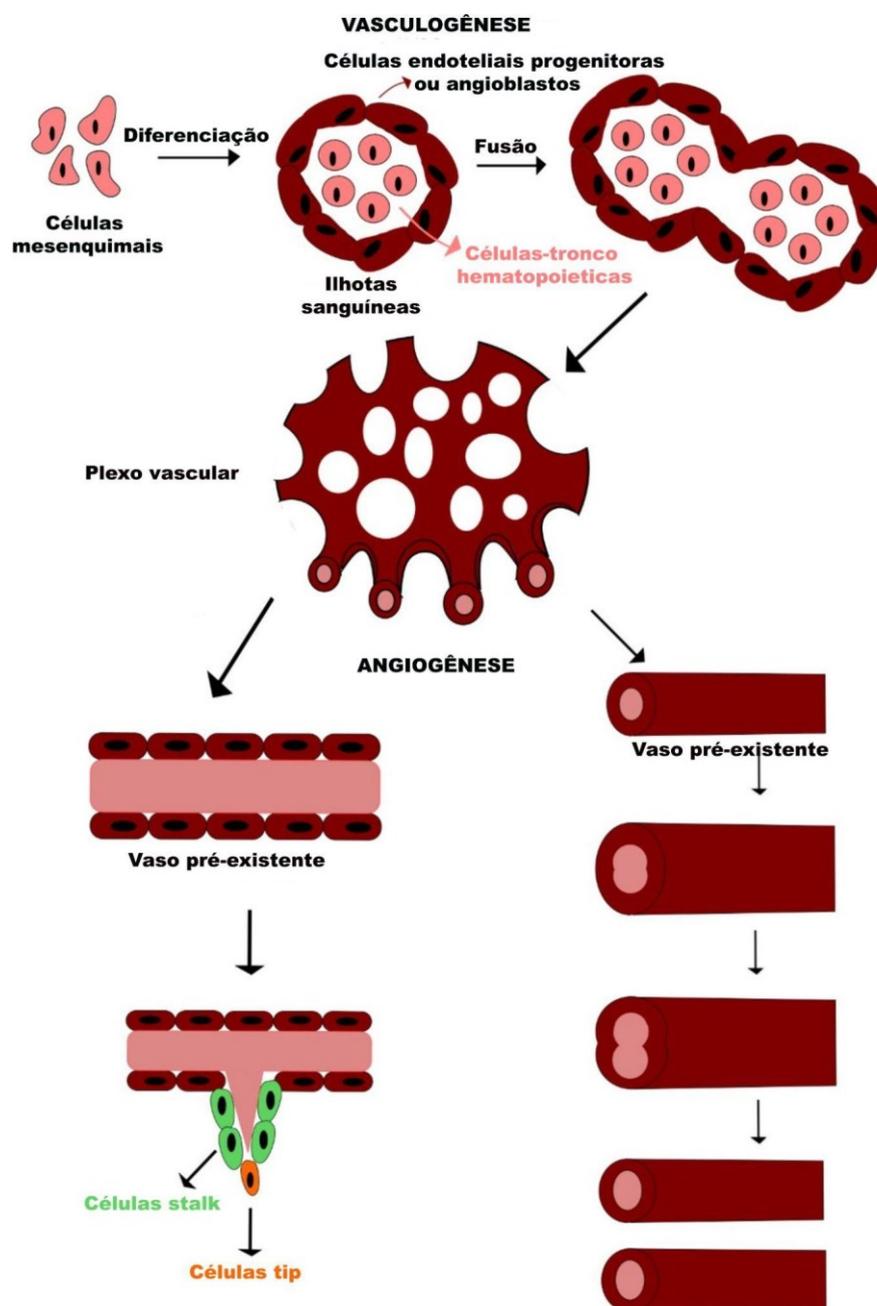
Globalmente, a exposição ao MeHg ocorre principalmente através do consumo de peixes e frutos do mar contaminados (Driscoll et al., 2013), sendo que pelo menos 70% do mercúrio total encontrado no sangue humano está na forma de MeHg (Mortensen et al., 2014). Além disso, estimativas relacionam os níveis de mercúrio no sangue ao aumento do risco de efeitos adversos à saúde de bebês recém-nascidos e em crianças de até 14 anos (Sørensen et al., 1999; Grandjean et al., 2004; Hightower et al., 2006; Yorifuji et al., 2010; Bellanger et al., 2013; Gribble et al., 2015). Isso porque, uma vez na corrente sanguínea a maior parte do MeHg interage com os glóbulos vermelhos e faz ligações com resíduos de cisteínas das cadeias da hemoglobina, sendo então essa a forma sistêmica de transporte do MeHg (Pedrero Zayas et al., 2014; Bridges e Zalups, 2017). Dentre os riscos cardiovasculares em crianças, destacam-se as alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca (Sørensen et al., 1999; Grandjean et al., 2004; Yorifuji et al., 2010; Gribble et al., 2015).

Além da presença de MeHg na corrente sanguínea de recém-nascidos e os efeitos relacionados à pressão sanguínea em crianças, estudos demonstram efeitos da exposição ao MeHg no desenvolvimento embrionário. Estes estudos têm investigado uma série de alterações induzidas pelo MeHg em embriões de diferentes espécies. Em invertebrados, os efeitos do MeHg foram relacionados ao dano ao crescimento e segmentação do corpo, atraso do desenvolvimento e na maturação de células nervosas e morte do embrião (Martin et al., 1981; Kraus et al., 1988; Itow et al., 1998; Botton, 2000; Rand et al., 2009; McElwee e Freedman, 2011). Em vertebrados, a exposição ao MeHg está associada a alterações nos anexos embrionários, atraso no desenvolvimento, redução de índices somáticos, alteração em proteínas relacionadas ao ciclo celular, alterações hematológicas, edemas corporais, alterações na capacidade do volume cardíaco, no batimento cardíaco, os quais podem contribuir para a morte embrionária (Samson e Shenker, 2000; Díaz et al., 2004; Yu et al., 2016; DeBofsky et al., 2018; Qiu et al., 2022; Ronconi-Krüger et al., 2022).

Diante da variedade de estudos mencionados, é fundamental considerar a complexibilidade da embriogênese vascular inicial e a formação dos vasos sanguíneos em embriões. Nesse contexto, o desenvolvimento dos vasos extraembrionários, é necessário para a nutrição e oxigenação inicial do embrião. A formação dos vasos cardíacos é essencial para a correta vascularização do coração e para o suporte do volume e batimento cardíaco. O desenvolvimento do fígado é necessário para a hematopoiese, enquanto o desenvolvimento dos vasos pulmonares é importante para a futura capacidade de troca gasosa após o nascimento. Alterações significativas nesse sistema durante o desenvolvimento embrionário, como as induzidas pelo MeHg, podem resultar em disfunções graves e potencialmente levar à morte embrionária devido à falha na circulação sanguínea e oxigenação adequada dos tecidos. De tal modo, é importante compreender que o sistema vascular dos vertebrados é composto por uma rede altamente organizada e ramificada, composta por artérias, veias e capilares, que permite a troca de nutrientes e oxigênio os quais são bombeados pelo coração na corrente sanguínea (Folkman, 1995).

A formação dos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário envolve dois processos sucessivos, a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese é o processo envolvido na formação dos vasos e na especificação do endotélio por células precursoras do mesoderma (Risau e Flamme, 1995; Drake e Fleming, 2000). A vascularização é estabelecida antes do batimento cardíaco e recebe o primeiro débito circulatório. Após, ocorre a expansão da rede vascular através da angiogênese, com brotamento de vasos a partir de vasos pré-existentes. Esse processo leva ao remodelamento do sistema vascular primário em um sistema vascular mais complexo (Carmeliet, 2000; Herbert e Stainier, 2011; Potente e Carmeliet, 2017) (Figura 2).

Figura 2 - Modelos de vasculogênese e angiogênese na formação de vasos sanguíneos embrionários.



Fonte: modificado de Negri et al., 2020.

A formação de vasos é um processo mediado por moléculas sinalizadoras que incluem fatores de crescimento e proteínas de adesão celular. Essas moléculas coordenam a proliferação, migração e diferenciação de células

endoteliais durante todo o processo e permitem a interação das células endoteliais com as células circundantes (Adams e Alitalo, 2007; Herbert e Stainier, 2011).

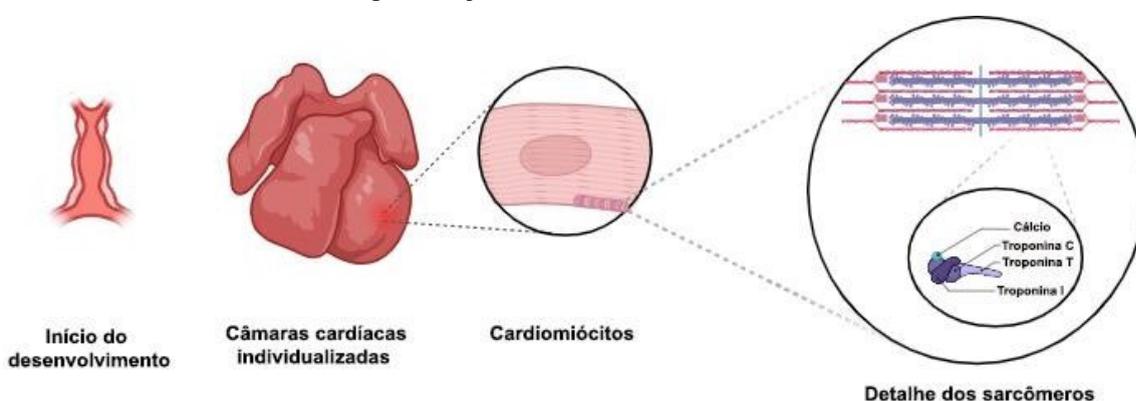
Assim, são formados os vasos extraembrionários e intraembrionários, os quais diferem com relação ao local de formação e função. Os vasos extraembrionários se desenvolvem nos anexos embrionários, tendo a função de fornecer e transportar nutrientes e oxigênio ao embrião, além de remover resíduos do metabolismo embrionário. Enquanto que, os vasos intraembrionários fazem parte do embrião e permitem a irrigação adequada dos órgãos em formação, além de fornecer e transportar nutrientes e oxigênio, possibilitando o crescimento e diferenciação entre os vasos (Drake e Fleming, 2000; Iruela-Arispe e Davis, 2009). Logo, a morfogênese dessas duas redes vasculares é essencial para o estabelecimento de sistemas funcionais durante o desenvolvimento embrionário (Cleaver e Melton, 2003; Iruela-Arispe e Davis, 2009). No decorrer do processo de formação do embrião, a rede vascular extraembrionária e a rede vascular intraembrionária, auxiliam no desenvolvimento e na funcionalidade de órgãos vitais como coração, fígado e pulmão.

O coração, principal órgão do sistema cardiovascular e primeiro órgão funcional no embrião, é formado a partir de um tubo de câmara única de origem mesodérmica, que se organiza em órgão com quatro câmaras em aves e mamíferos. Essa organização ocorre através da migração das células precursoras do coração para a região da placa lateral mesodérmica, que logo se organiza em um campo cardíaco primitivo. Este campo formará um tubo endotelial simples que começa a pulsar de maneira rítmica. À medida que o desenvolvimento prossegue, esse tubo passa por diferentes dobramentos e septações, dando origem às quatro câmaras cardíacas (Yutzey et al., 1995; Buckingham et al., 2005). Essa septação é fundamental para um sistema cardiovascular eficiente, permitindo a separação da circulação pulmonar e sistêmica (Al Naieb et al., 2013). Assim, com a formação das quatro câmaras, o coração começa a bombear o sangue de maneira mais organizada, impulsionando o sangue oxigenado para a circulação sistêmica e o sangue desoxigenado para a circulação pulmonar através dos vasos sanguíneos (Lindsey et al., 2014).

Ao mesmo tempo, os cardiomiócitos, que são as células que constituem a musculatura cardíaca, desempenham a função contrátil. Essas células são diferenciadas a partir das células progenitoras cardíacas que começam a expressar proteínas específicas da contração, como actina, miosina e troponinas. O aparato contrátil dos cardiomiócitos é composto por sarcômeros, que são unidades repetitivas organizadas de actina e miosina. As troponinas, em particular, são essenciais para a regulação da contração muscular. Elas incluem a troponina C, que se liga ao cálcio; a troponina I, que inibe a interação entre actina e miosina na ausência de cálcio; e a troponina T, que liga o complexo de troponina à tropomiosina, ajudando a posicioná-lo corretamente no filamento de actina (Solaro e Rarick, 1998; Gordon et al. 2000).

Ainda, os cardiomiócitos não apenas permitem a contração e o bombeamento sanguíneo, mas interagem com as células endoteliais (Figura 3). As células endoteliais no coração, além de formarem a camada interna dos vasos sanguíneos, também participam da formação das válvulas cardíacas. A interação entre os cardiomiócitos e as células endoteliais, está envolvida na coordenação da contração e da vascularização (Cleaver e Melton, 2003). Primeiramente, as células endoteliais liberam fatores parácrinos, como óxido nítrico (NO), que ajudam a regular o tônus vascular e a perfusão sanguínea no tecido cardíaco (Sandoo et al. 2010). Ainda, a sinalização mediada por fatores de crescimento permitem a diferenciação celular necessária para o desenvolvimento do coração funcional (Iruela-Arispe e Davis, 2009; Red-Horse et al., 2010).

Figura 3 - Desenvolvimento cardíaco de embriões: Da estrutura tubular às quatro cavidades e organização sarcomérica dos cardiomiócitos.

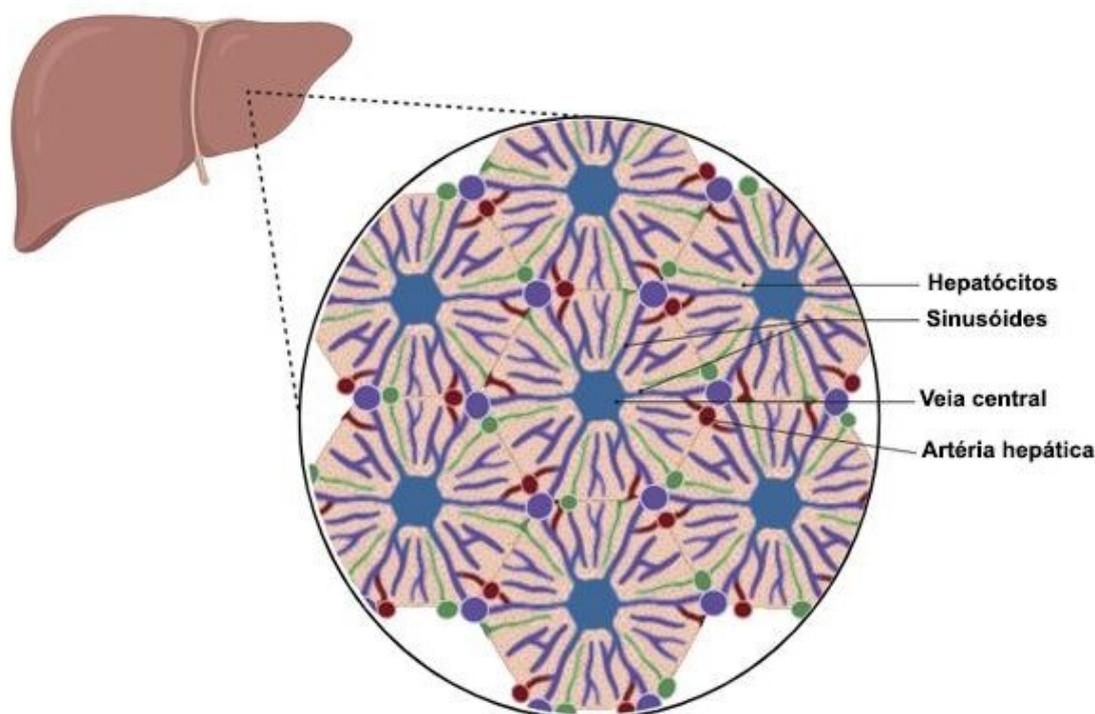


Fonte: elaborado pela autora.

O fígado, embora não esteja diretamente envolvido na circulação sanguínea, desempenha função hematopoiética inicial e posterior regulação metabólica nos embriões. Este órgão desenvolve-se a partir da endoderme do intestino anterior, com a formação da placa hepática em resposta a sinais provenientes do mesoderma, mais especificamente do septo transversal e do mesoderma cardíaco. À medida que essas células endodérmicas se proliferam, se organizam para formar a placa hepática, que posteriormente se invagina para dentro do septo transversal, uma estrutura mesodérmica. A interação entre as células endodérmicas e as células mesenquimais é fundamental para a formação adequada do fígado com sua morfologia formada por diferentes tipos celulares e com estrutura tecidual densa e organizada em cordões. Assim, inicia-se a diferenciação de células endodérmicas em células hepáticas precursoras, como hepatoblastos e colangioblastos (Gualdi et al., 1996; Zorn, 2008; Pulikanti et al., 2010; Golub e Cumano, 2013; Gordillo et al., 2015).

As células hepáticas formam cordões celulares organizados, conhecidos como cordões hepáticos, que se dispõem em torno dos sinusóides hepáticos. Esses sinusóides hepáticos, são formados pelas células endoteliais que começam a migrar para o fígado em desenvolvimento e são capilares especializados com grandes poros ou fenestrações nas células endoteliais, que permitem a passagem fácil de moléculas, proteínas e outras substâncias entre o sangue e os hepatócitos. Essas fenestrações são maiores do que aquelas encontradas em outros tipos de capilares, facilitando uma troca mais eficiente de substâncias (Jungermann e Katz, 1982) (Figura 4).

Figura 4 - Organização da estrutura hepática de vertebrados com detalhe da vascularização.



Fonte: elaborado pela autora.

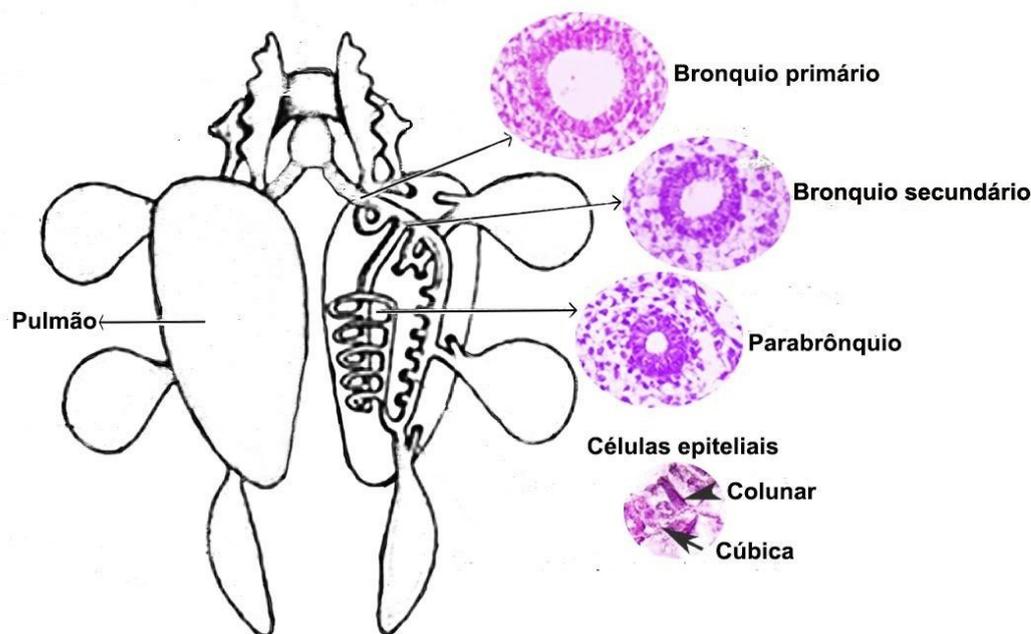
Além disso, as células endoteliais hepáticas produzem sinais que influenciam a proliferação, diferenciação e função dos hepatócitos. Os hepatócitos desempenham múltiplas funções essenciais, incluindo a síntese de proteínas, a detoxificação e a regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios. Esse ambiente vascularizado permite ao fígado desempenhar suas funções metabólicas e hematopoiéticas desde os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Pulikanti et al., 2010; Golub e Cumano, 2013; Gordillo et al., 2015).

O pulmão é um órgão que também tem origem no endoderma do intestino primitivo anterior, a partir do broto pulmonar que se forma no assoalho faríngeo. O broto cresce e se bifurca para formar os brônquios primários, que darão origem aos pulmões direito e esquerdo. Posteriormente, os brônquios se ramificam ainda mais para formar as estruturas da árvore brônquica. Durante esse processo, o mesênquima esplâncnico forma o parênquima pulmonar e os vasos sanguíneos pulmonares (Gilbert, 2020). Nos mamíferos, os brônquios terminam em bronquíolos

terminais e sacos terminais (ou alvéolos), enquanto nas aves, eles se conectam aos brônquios terciários (parabrônquios) (Stabellini et al., 2001; Silverthorn, 2017) (Figura 5). As trocas gasosas em ambos os grupos são possibilitadas pela diferenciação do epitélio respiratório. Nos mamíferos, essa diferenciação forma ductos alveolares e, posteriormente, alvéolos, cuja estrutura frouxa e rica em pequenos vasos torna-se funcional após o nascimento, permitindo as trocas gasosas necessárias para a sobrevivência (Costa et al., 2001; Cardoso e Lü, 2006; Jia et al., 2017).

Nesse período, é que a vascularização aumenta significativamente, preparando o tecido para a função principal dos pulmões e surgem então, as células epiteliais cúbicas precursoras dos pneumócitos tipo I e tipo II. Os sacos alveolares começam a ser revestidos por pneumócitos tipo I e tipo II, sendo que os pneumócitos tipo II iniciam a produção de surfactante, essencial para redução da tensão superficial nos alvéolos. Já os pneumócitos tipo I são células responsáveis pelas trocas gasosas devido à sua espessura fina, facilitando a difusão de gases entre os alvéolos e os capilares sanguíneos, formando uma relação alvéolo-capilar entre pneumócitos tipo I e células endoteliais dos capilares, que permitirá a troca eficiente de oxigênio e dióxido de carbono entre o ar nos alvéolos e o sangue nos capilares. No entanto, é importante destacar aqui, que o desenvolvimento do pulmão não termina até o nascimento. O desenvolvimento do pulmão e o amadurecimento dos alvéolos continua após o nascimento, prosseguindo até aproximadamente os oito anos de idade em humanos, estabelecendo uma rede completa de capilares que envolvem os alvéolos. A coordenação entre a diferenciação celular, a formação de estruturas anatômicas e o estabelecimento de mecanismos como a produção de surfactante garantem que o recém-nascido possa respirar de maneira eficiente ao nascer (Kotton & Morrisey, 2014; Whitsett e Alenghat, 2015; Zacharias et al., 2018).

Figura 5 - Organização da estrutura pulmonar destacando os brônquios primário, secundário e parabrônquio, além de células epiteliais colunares e cúbicas.



Fonte: elaborado pela autora.

A cinética que envolve o fluxo sanguíneo extraembrionário e intraembrionário está relacionada ao aporte hematopoiético, ao bombeamento sanguíneo e à posterior troca gasosa. Esses processos constituem as principais adaptações cardiovasculares iniciadas no desenvolvimento embrionário, permitindo o adequado funcionamento na infância e na vida adulta (Jaddoe et al., 2014; Burton e Jauniaux, 2018). O tônus vascular tem papel fundamental no controle da pressão sanguínea, sendo as células endoteliais responsáveis pelo revestimento da parede interna dos vasos, incluindo a regulação do diâmetro dos vasos através de compostos como o óxido nítrico (Furchgott e Zawadzki, 1980; Cines et al., 1998; Pober e Sessa, 2007; Förstermann e Sessa, 2012). Ainda o tônus vascular auxilia no ajuste da resistência vascular periférica, que influencia na pressão arterial sistêmica, permitindo a regulação adequada e o fluxo sanguíneo constante para todos os tecidos em crescimento no embrião (Jaddoe et al., 2014; Burton e Jauniaux, 2018). Além disso, os cardiomiócitos e hepatócitos contribuem indiretamente para o controle do tônus vascular por meio de sinais parácrinos e

endócrinos que afetam a função das células endoteliais e a homeostase vascular (Rui, 2014; Tabas et al., 2015; Morales-Ruiz et al., 2017; Pi et al., 2018). O tônus vascular garante que coração, fígado e pulmões recebam o suprimento sanguíneo rico em nutrientes e oxigênio, além de contribuir para a remoção de resíduos do metabolismo (Cines et al., 1998; Förstermann e Sessa, 2012).

Esse tônus, quando bem regulado, é essencial não apenas para o desenvolvimento normal, mas também para a resposta a situações de estresse durante o desenvolvimento embrionário. Em condições de estresse, como a hipóxia, o tônus vascular pode ser ajustado para assegurar a manutenção do fluxo sanguíneo adequado e a oxigenação dos tecidos. A hipóxia, por exemplo, desencadeia a produção de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) e NO, que promovem a angiogênese e a vasodilatação, ajudando a aumentar o fornecimento de oxigênio aos tecidos comprometidos (Giordano, 2005; Semenza, 2012). A resposta adaptativa ao estresse também envolve a ativação de vias de sinalização celular que promovem a sobrevivência e a proteção das células vasculares. Assim como, na ativação de proteínas quinases e a regulação de genes de resposta ao estresse, as quais contribuem para a resistência das células endoteliais a danos e a manutenção da integridade vascular (Sitia et al., 2010). Essas respostas são críticas para evitar a disfunção cardiovascular e garantir o desenvolvimento normal do embrião.

Nesse sentido, considerando os efeitos do MeHg sobre crianças e a escassez de estudos que abordem a toxicidade do MeHg no desenvolvimento da vasculatura extraembrionária e intraembrionária, com foco em órgãos de diferentes origens embrionárias como coração, fígado e pulmão. Propomos aqui as seguintes hipóteses:

- A exposição ao MeHg durante o desenvolvimento embrionário leva a alterações morfológicas nos vasos sanguíneos extraembrionários e intraembrionários, especialmente nos vasos do coração, fígado e pulmão de embriões.
- O MeHg interfere na integridade das células endoteliais, alterando o conteúdo de moléculas como VEGF e VCAM, dos vasos extraembrionários,

coração, fígado e pulmão, levando a disfunções vasculares durante o desenvolvimento embrionário.

- O MeHg induz alterações na morfologia dos cardiomiócitos, hepatócitos e células epiteliais pulmonares, comprometendo a função dessas células nos órgãos em desenvolvimento.
- O MeHg induz a redução da massa corporal e dos órgãos (coração, fígado e pulmão) em embriões, refletindo o efeito sistêmico da toxicidade do MeHg no embrião.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do metilmercúrio (MeHg) no desenvolvimento dos vasos sanguíneos extraembrionários e intraembrionários, assim como nos cardiomiócitos, hepatócitos e células epiteliais pulmonares de embriões de *Gallus domesticus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar os efeitos do MeHg na morfologia dos vasos sanguíneos extraembrionários e dos órgãos coração, fígado e pulmão;
- II. Investigar o conteúdo de VEGF, VCAM moléculas relacionadas à integridade e a estabilidade dos vasos extraembrionários, do coração, fígado e pulmão;
- III. Correlacionar as alterações no conteúdo de moléculas VEGF, VCAM e cTnI com as mudanças na morfologia e função vascular dos vasos extraembrionários, coração, fígado e pulmão;
- IV. Investigar as alterações induzidas pelo MeHg na morfologia e nos componentes celulares dos cardiomiócitos, hepatócitos e células epiteliais pulmonares.
- V. Investigar o conteúdo de cTnI, molécula relacionada à contratilidade cardíaca e a organização dos sarcômeros;
- VI. Avaliar a presença e disponibilidade de polissacarídeos ácidos nos hepatócitos e células epiteliais pulmonares;
- VII. Avaliar o efeito sistêmico do MeHg sobre a massa corporal e dos órgãos coração, fígado e pulmão.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

Neste trabalho foram utilizados embriões *G. domesticus* (linhagem Hy-Line Brown) como modelo de estudo, provenientes de ovos fertilizados doados pela Fazenda Experimental da Ressacada, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC). Os ovos foram transportados ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA/UFSC) e neste laboratório, os ovos foram mantidos em repouso por 24 horas a temperatura de 20°C e posteriormente incubados a 37,5°C ( $\pm 0,5$ ) e 65% de umidade do ar em incubadora Golden. Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC – protocolo nº 5843231018.

#### 3.2 Delineamento dos grupos experimentais

Foram propostos os seguintes grupos experimentais:

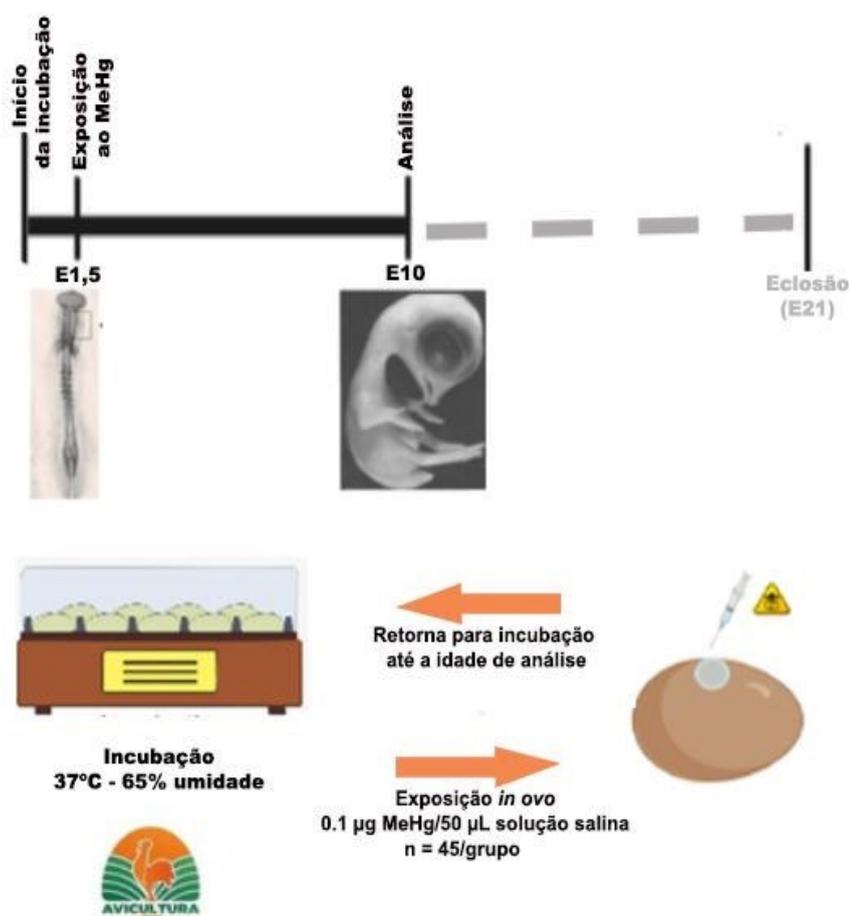
- Grupo exposto ao MeHg (n = 45 embriões, em 3 repetições experimentais independentes, com 15 embriões cada): embriões com um dia e meio de incubação (E1,5) receberam 0,1  $\mu\text{g}$  MeHg/50  $\mu\text{L}$  de solução salina a 0,9% administrado junto à vascularização extraembrionária, menor dose que induz sinais de toxicidade, conforme Carvalho et al., (2008).

- Grupo controle (n = 45 embriões, em 3 repetições experimentais independentes, com 15 embriões cada): embriões em E1,5 receberam 50  $\mu\text{L}$  de solução salina a 0,9%, administrado junto à vascularização extraembrionária.

Diariamente, os embriões foram monitorados através da abertura da casca, para controle da sobrevivência pela análise do aspecto do embrião e da vascularização embrionária. Em E10, os embriões foram retirados da incubadora e dessensibilizados a 4°C por 15 minutos para interromper seu desenvolvimento (Leland et al., 2019). Os vasos extraembrionários foram coletados com o auxílio de um papel filtro, e os embriões foram removidos das membranas dos ovos. Após a remoção, os embriões foram pesados e eutanasiados por decapitação (Leland et al., 2019) (Figura 6).

Coração, fígado e pulmão foram dissecados e a massa fresca dos órgãos foi obtida para cálculo do índice somático (IS) e submetidos aos procedimentos de preparo para as técnicas de dosagem de nitrato e nitrito (NOx), análises teciduais, imuno-histoquímica e para o coração, amostras foram destinadas à microscopia eletrônica. As idades de tratamento e análise escolhidas para este trabalho se justificam pelo fato de que em E1,5 (idade de tratamento), o coração, o fígado e os pulmões estão em processo inicial de formação. Em E10 (idade de análise), o coração apresenta os ventrículos cardíacos individualizados e com trabéculas nas suas paredes internas; o fígado apresenta lóbulos e cordões hepáticos formados e o pulmão apresenta brônquios organizados cuja células estão em diferenciação (Kingsbury et al., 1956; Al Naieb et al., 2013; Mellouk et al., 2018).

Figura 6 - Desenho experimental de exposição *in ovo* ao metilmercúrio com o modelo embrionário de *Gallus domesticus*



Fonte: elaborado pela autora.

### 3.3 Dosagem de nitrato e nitrito (NOx)

Os níveis de NOx foram avaliados através da quantificação da concentração de nitrito e nitrato (n = 9 embriões/grupo). Primeiramente, as amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de sacarose com 50 mM de Tris-HCl + 1 mM de ditioneitol + 10 µg/mL de inibidor de tripsina de soja + 10 mg/mL de fenilmetilsulfonilfluoreto (pH 7,2) e centrifugados a 30.000 × g a 4°C. As amostras foram desproteinizadas com sulfato de zinco e submetidas à enzima redutase de nitrato (obtida a partir de *Escherichia coli*) a 37°C para converter o nitrato em nitrito. As amostras foram centrifugadas a 30.000 × g a 4°C, o sobrenadante foi coletado e adicionado ao reagente de Griess (Granger et al., 1990). A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão de nitritos foi feita simultaneamente para correlação da concentração obtida nas amostras. Os resultados foram expressos em µM NOx, conforme descrito por Duma et al. (2011).

### 3.4 Morfometria dos vasos extraembrionários

Os vasos extraembrionários foram analisados *in ovo* utilizando micrografias obtidas em estereoscópico (Olympus SHZ10) em E10, para determinar o número e diâmetro dos vasos extraembrionários foi utilizado o software ImageJ (NIH) (n = 10 embriões/grupo). O número de vasos foi obtido por contagem direta/visual das imagens registradas. Foram realizadas três medições de diâmetro de cada vaso. Assim, considerando essas medidas, foram determinadas classes de calibre dos vasos (Apêndice A).

### 3.5 Processamento histológico e coloração

Os vasos extraembrionários, o coração, o fígado e o pulmão foram fixados em formaldeído a 4% por 24 h e mantidos em etanol a 70%, para inclusão em parafina. A desidratação foi realizada em série crescente de etanol (70% - 100%) por 1 h cada, a diafanização em dois banhos de xilol por 5 min cada, ou até que o tecido estivesse translúcido. Após, foram realizados três banhos em parafina por 1 h cada a 57°C, exceto para os vasos extraembrionários que passaram por 20 min em cada parafina. As amostras foram orientadas para realização de secções a 6

µm de espessura em micrótomo rotativo (Olympus CUT 2020A). As secções foram dispostas em lâminas histológicas de modo que em cada lâmina tivessem secções dos grupos controle e exposto ao MeHg.

Para caracterização da micromorfologia de vasos extraembrionários, do coração, fígado e pulmão, as secções foram desparafinizadas com dois banhos de xilol por 5 min cada, seguidos da reidratação em série decrescente de etanol (100% - 70%) por 10 min cada. Em seguida, as lâminas foram mantidas em água corrente por 10 min, as secções foram coradas com Hematoxilina de Harris por 25 seg, passagem por água corrente por 10 min, seguida de Eosina aquosa a 1% por 20 seg. O excesso dos corantes foi removido com um banho de água destilada por 5 min. As secções foram desidratadas em série de etanol crescente (70% - 100%) por 5 min, diafanizadas em xilol por 5 min e montadas com Entellan.

As secções foram destinadas às análises de morfologia dos tecidos e morfometria dos vasos, histoquímica com azul de toluidina (fígado e pulmão) e imuno-histoquímica.

### **3.6 Análise morfométrica dos vasos cardíacos, hepáticos, pulmonares, brônquios, células endoteliais, hepatócitos e células epiteliais pulmonares**

O diâmetro e o número dos vasos cardíacos, hepáticos e pulmonares foram determinados apenas quando os vasos apresentavam-se em perfis transversais, utilizando microscópio (Olympus CBA) com ocular micrométrica acoplada (aumento 40x) e por contagem direta (aumento 4x) (n = 10 embriões/grupo). Considerando o diâmetro e a morfologia dos vasos do coração, foram estabelecidas classes de artérias e de veias de acordo com os seus calibres. Para o fígado e pulmão, a morfologia dos vasos não permitia a diferenciação do tipo vascular (veia ou artéria), o número e o diâmetro dos vasos foram determinados através dos vasos circulares visíveis em um mesmo corte histológico (n = 11 embriões/grupo). Considerando o diâmetro dos vasos hepáticos e pulmonares, foram estabelecidas classes. Ainda, considerando a organização do pulmão em brônquios, o diâmetro dos brônquios foi obtido e foram determinadas classes (Apêndice A).

O diâmetro das células endoteliais, hepatócitos e das células epiteliais pulmonares foi determinado nas secções frontais do fígado e do pulmão utilizando

microscópio (Olympus CBA) com ocular micrométrica acoplada (aumento 100x). Para cada célula, foram obtidos o maior e o menor diâmetro.

### **3.6.1 Presença e disponibilidade de polissacarídeos ácidos no tecido hepático e no tecido pulmonar**

Para caracterização da presença de polissacarídeos ácidos, no fígado e no pulmão, foram realizadas a coloração das lâminas com azul de toluidina 3,5%. As secções foram desparafinizadas com dois banhos de xilol por 2 min cada, seguidos da re-hidratação em série decrescente de etanol (100% - 70%) por 4 min cada. A seguir, as lâminas foram imersas em azul de toluidina 0,5% por 5 seg, lavadas com água corrente por 10 min. As secções foram desidratadas em série de etanol crescente (70% - 100%) por 5 min, diafanizadas em xilol por 2 min e montadas com Entellan. Após, a análise de polissacarídeos ácidos no tecido hepático e pulmonar foi realizada utilizando micrografias obtidas em microscópio (Nikon 80i) e avaliada através da área ocupada em pixels/ $\mu\text{m}$  usando o software ImageJ (n = 11 embriões/grupo ; 15 micrografias/embrião). Para o tecido hepático, a área estabelecida foi de  $5,27 \times 5,27$ , justificada pelo preenchimento completo da área por um lóbulo hepático, assim como pelos hepatócitos adjacentes aos vasos. Para o tecido pulmonar, a área estabelecida foi de  $2,64 \times 2,64$ , metade da área usada no tecido hepático e suficiente para ser preenchida pela parede dos brônquios, assim como pelas células do parênquima no pulmão.

### **3.6.2 Quantificação de lipídios no tecido hepático**

A análise do perfil lipídico no tecido hepático foi realizada utilizando micrografias obtidas em microscópio óptico (Nikon 80i) com coloração de HE (n = 11 embriões/grupo; 15 micrografias/embrião). Os perfis lipídicos foram observados através dos espaços ocupados por gotículas lipídicas, que foram removidas pelo xilol. Com o número de gotículas e tamanho observados, foi utilizado o método de Braun et al. (2001) adaptado. Para isso, foi gerada a média entre a massa fresca do fígado dos embriões controle e expostos ao MeHg. Em seguida, a porcentagem de gotículas foi determinada pela equação: (número de gotículas/massa fresca do fígado)  $\times$  100. O número de gotículas e o tamanho médio, foi determinado usando

escores de 1 a 3, sendo 1 determinado para gotículas pequenas e 3 para gotículas grandes. Para determinar a intensidade do dano gerado pelo número de gotículas por fígado, utilizou-se uma equação que pondera a pontuação do número de gotículas em diferentes categorias, multiplicando cada pontuação pelo respectivo peso das gotículas, somando esses valores, dividindo pela massa fresca do fígado e multiplicando o resultado por 100.

### 3.7 Marcações celulares por imuno-histoquímica

Para verificar a formação e integridade vascular foi quantificado o conteúdo de VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) e VCAM (do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule*) em vasos extraembrionários, coração, fígado e pulmão (n = 10 embriões/grupo para vasos extraembrionários e coração e n = 11 embriões/grupo para fígado e pulmão). E para verificar a contratilidade cardíaca foi quantificado o conteúdo de cTnI (do inglês, *Cardiac Troponin I*). As secções foram desparafinadas com dois banhos de xilol por 5 min cada, seguidos da reidratação em série decrescente de etanol (100% - 70%) por 10 min cada. O bloqueio de peroxidases endógenas foi feito com banho de peróxido de hidrogênio:metanol (1:2), seguido da inativação dos sítios inespecíficos, com soro fetal bovino (BSF, do inglês *Bovine Fetal Serum*) a 5% com tampão PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) + Triton X-100 a 0,1% por 40 min. Em seguida, foi realizada a incubação com os anticorpos primários anti-VEGF IgG (1:100), anti-VCAM IgG (1:100), anti-cTnI IgG (1:100) a 4°C por 12 h em câmara úmida. As secções foram lavadas três vezes em tampão PBS + Triton X100 a 0,1% por 10 min e incubadas com os anticorpos secundários IgG anti-rabbit conjugado com peroxidase (1: 200), IgG anti-mouse conjugada com peroxidase (1: 200), IgG anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1: 200), correspondentes aos anticorpos primários respectivamente, por 3 hs à temperatura ambiente. As marcações foram evidenciadas com solução de 3-3' diaminobenzidina (DAB) diluído em PBS com peróxido de hidrogênio a 10% e montadas com meio de montagem Entellan, para quantificação. No caso das lâminas de cTnI + Alexa Fluor 488, os núcleos foram evidenciados com solução de 4',6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) diluído em PBS e foram montadas com meio de

montagem GelMount. A quantificação das imunomarcações foi realizada em microscópio de luz, com auxílio da gráticula de Weibel nº 2 – M42.

### **3.8. Análise dos sarcômeros do coração**

Para a observação dos sarcômeros cardíacos, fragmentos dos ventrículos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% + paraformaldeído a 4% + sacarose a 2% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), durante 12 h à 4°C. Em seguida, foram realizadas lavagens com o tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), por 2 h a temperatura ambiente. Após, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de acetona (30% - 100%) por 15 min cada. Logo, as amostras foram infiltradas com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr (3:1 - 1:3) por 12 h cada, seguidas de duas infiltrações em resina pura por 12 h e polimerizadas em estufa a 70°C por 24 h. As secções ultrafinas foram realizadas com navalha de diamante em ultramicrótomo e, posteriormente, foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 1%. As secções foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão (MET), modelo JEM-1011 TEM (TEM 80 kV) (LCME/UFSC). Foi realizada a contagem direta dos sarcômeros (n = 3 embriões/grupo; 10 micrografias/embrião), e a morfometria realizada através do software ImageJ.

### **3.9. Análises estatísticas**

Os tamanhos das amostras foram determinados pela fórmula  $n = (1.96.S/L)^2$ , onde S = desvio padrão das médias preliminares de cinco embriões e L = 10% da média preliminar (Miot, 2011). Os dados morfométricos e quantitativos foram analisados no programa GraphPad, sendo a normalidade dos dados testada previamente. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student ou teste ANOVA unidirecional, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Diferenças significativas foram consideradas, quando  $p \leq 0,05$ . Os dados foram apresentados em valores de média  $\pm$  erro padrão da média.

## CAPÍTULO 1

Este capítulo contempla artigo publicado na revista *Journal of Applied Toxicology* (2024), ISSN 1099-1263, Impact Factor 3.3/2022, Qualis/CAPES A2. Doi: <https://doi.org/10.1002/jat.4661>

A hipótese central estabelecida para o artigo foi de que exposição ao MeHg durante o desenvolvimento embrionário induz danos na formação de vasos sanguíneos na área extraembrionária e no coração, comprometendo a função contrátil do coração.

Foram parcialmente contemplados os objetivos específicos da tese:

- I. Avaliar os efeitos do MeHg na morfologia dos vasos sanguíneos extraembrionários e dos órgãos coração, fígado e pulmão;
- II. Investigar o conteúdo de VEGF, VCAM moléculas relacionadas à integridade e a estabilidade dos vasos extraembrionários, do coração, fígado e pulmão;
- III. Correlacionar as alterações no conteúdo de moléculas VEGF, VCAM e cTnI com as mudanças na morfologia e função vascular dos vasos extraembrionários, coração, fígado e pulmão;
- IV. Investigar as alterações induzidas pelo MeHg na morfologia e nos componentes celulares dos cardiomiócitos, hepatócitos e células epiteliais pulmonares.
- V. Investigar o conteúdo de cTnI, molécula relacionada à contratilidade cardíaca e a organização dos sarcômeros;
- VI. Avaliar o efeito sistêmico do MeHg sobre a massa corporal e dos órgãos coração, fígado e pulmão.

As metodologias apresentadas na tese e contempladas no artigo foram:

3.3 - Dosagem de nitrito e nitrato (NOx)

3.4 - Morfometria dos vasos extraembrionários

3.5 - Processamento histológico e coloração

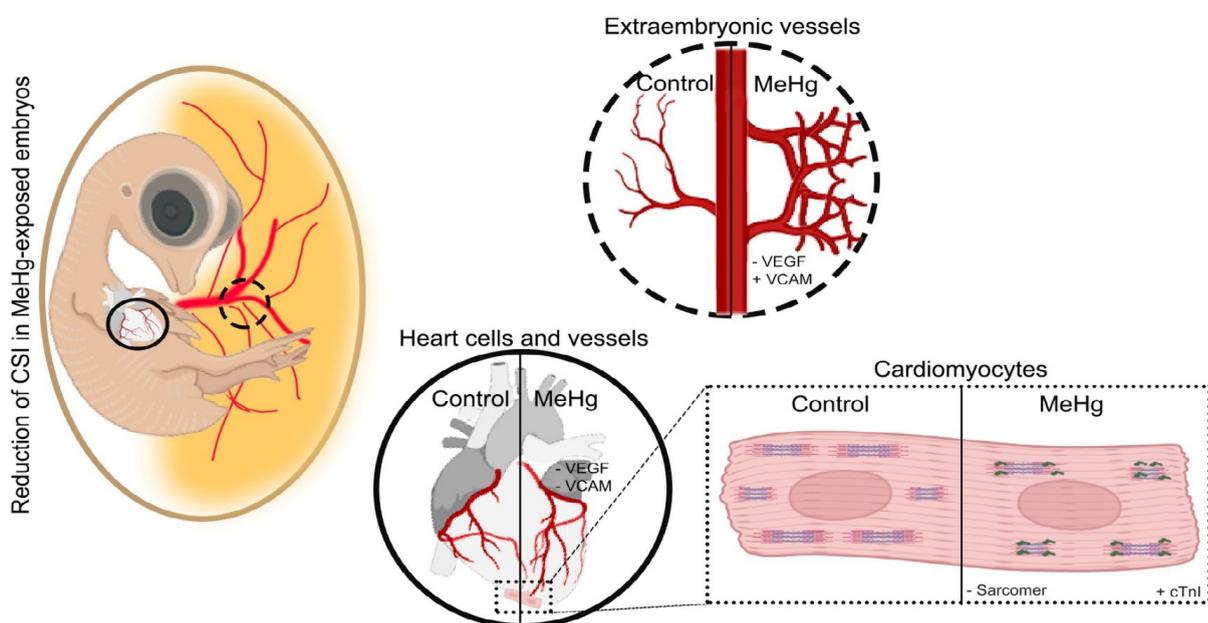
3.6 - Análise morfométrica dos vasos cardíacos, hepáticos e pulmonares, brônquios, e células endoteliais, hepatócitos e células epiteliais pulmonares

3.7 - Marcações celulares por imuno-histoquímica

3.8 - Análise dos sarcômeros do coração

3.9 - Análises estatísticas

Figura 7 - Graphical abstract do artigo “*Exploring developmental MeHg impact on extraembryonic and cardiac vessels and its effect on cardiomyocyte contractility*”.



Fonte: elaborado pela autora.

# Exploring developmental MeHg impact on extraembryonic and cardiac vessels and its effect on cardiomyocyte contractility



Received: 8 March 2024 | Revised: 6 June 2024 | Accepted: 10 June 2024

DOI: 10.1002/jat.4661

## RESEARCH ARTICLE

Journal of  
**Applied Toxicology** WILEY

# Exploring developmental MeHg impact on extraembryonic and cardiac vessels and its effect on cardiomyocyte contractility

Nathália Ronconi-Krüger | Yara Maria Rauh Müller | Evelise Maria Nazari

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

### Correspondence

Evelise Maria Nazari, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.  
Email: [evelise.nazari@ufsc.br](mailto:evelise.nazari@ufsc.br)

### Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina/FAPESC, Brazil, Grant/Award Number: 021/2021; Coordenação de Aproveitamento de Pessoal de Nível Superior/CAPEs, Brazil, Grant/Award Number: 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, Brazil, Grant/Award Number: 311570/2020-8

### Abstract

The toxicity of methylmercury (MeHg) during embryonic development is a relevant issue that remains unclear and deserves investigation. In this sense, there is evidence that links the intake of contaminated food with cardiovascular pathologies in human adults and children. Thus, this study aimed to verify the impact of MeHg on the structure and integrity of extraembryonic and cardiac blood vessels and the contractile function of cardiomyocytes, also evaluating embryonic weight and the cardiostatic index (CSI). Thus, chicken embryos, used as an experimental model, were exposed to a single dose of 0.1 µg MeHg/50 µl saline at E1.5 and analyzed at E10. After exposure, an increase in the number of extraembryonic blood vessels and the veins of the cardiac tissue was observed. These increases were accompanied by a reduction in the content of VEGF and VCAM proteins related to vessel growth and adhesiveness. Together, these results were related to reduced nitrite (NOx) levels. Furthermore, MeHg reduces the number of sarcomeres and increases the content of cardiac troponin I (cTnI), a protein that regulates contraction. In general, exposure to MeHg affected the integrity of extraembryonic and cardiac vessels and the contractile function of cardiomyocytes, which had a systemic impact evidenced by the reduction in embryonic weight gain and CSI.

### KEYWORDS

cardiotoxicity, embryo, cardiac troponin, VEGF/VCAM proteins, vessel diameter category

## 1 | INTRODUCTION

Human exposure to mercury is associated with the consumption of contaminated food, such as fish, and there is evidence linking this intake to cardiovascular pathologies in adults and children, as demonstrated in human tissue and model organism studies (Afridi et al., 2014; Bridges & Zalups, 2017; Fillion et al., 2006; Grotto et al., 2009; Inskip & Piotrowski, 1985; Kostyniak, 1983; Peppriell et al., 2020; Santos Ruybal et al., 2020; Stern, 2005; Valera et al., 2011; Valera et al., 2014; Wildemann et al., 2015). These studies have shown that varying concentrations of mercury can cause impairments to organisms, with values ranging from 1.3 ng/g to 1,607 µg/kg of body weight. However, the effects of mercury on cardiovascular development in embryos and fetuses remain unclear. In this context,

different model organisms are used to investigate the most toxic form of mercury, methylmercury (MeHg), in the cardiovascular system during the earlier life stages (Duan et al., 2016; Ronconi-Krüger et al., 2022; Takahashi & Shimohata, 2019).

For embryos/fetuses, the proper functioning of the cardiovascular system and an adequate heartbeat help keep the metabolism balanced (Maltepe & Celeste Simon, 1998) and the development and growth of other organs and systems. The first microenvironment that comes into contact with contamination by MeHg is the extraembryonic vessels, organized in a network of blood vessels of large and small caliber (Moyon et al., 2001).

Extraembryonic and intraembryonic vascular networks are established by processes of vasculogenesis and angiogenesis (Coffin & Poole, 1988; Poole & Coffin, 1989; Riley & Smart, 2011; Risau &

## CAPÍTULO 2

Este capítulo contempla artigo a ser submetido na revista *Toxicological Research*, ISSN 1976-8257, Impact Factor 2.3/2022, Qualis/CAPES A2

A hipótese central estabelecida para o artigo foi de que a exposição ao MeHg altera o tamanho dos vasos sanguíneos do fígado e do pulmão, bem como a morfologia dos hepatócitos e células epiteliais pulmonares.

Foram parcialmente contemplados os objetivos específicos da tese:

- I. Avaliar os efeitos do MeHg na morfologia dos vasos sanguíneos extraembrionários e dos órgãos coração, fígado e pulmão;
- II. Investigar o conteúdo de VEGF, VCAM moléculas relacionadas à integridade e a estabilidade dos vasos extraembrionários, do coração, fígado e pulmão;
- III. Correlacionar as alterações no conteúdo de moléculas VEGF, VCAM e cTnI com as mudanças na morfologia e função vascular dos vasos extraembrionários, coração, fígado e pulmão;
- IV. Investigar as alterações induzidas pelo MeHg na morfologia e nos componentes celulares dos cardiomiócitos, hepatócitos e células epiteliais pulmonares.
- V. Avaliar a presença e disponibilidade de polissacarídeos ácidos nos hepatócitos e células epiteliais pulmonares;
- VI. Avaliar o efeito sistêmico do MeHg sobre a massa corporal e dos órgãos coração, fígado e pulmão.

As metodologias apresentadas na tese e contempladas no artigo foram:

3.3 - Dosagem de nitrito e nitrato (NOx)

3.5 - Processamento histológico e coloração

3.6 - Análise morfométrica dos vasos cardíacos, hepáticos e pulmonares, brônquios, e células endoteliais, hepatócitos e células epiteliais pulmonares

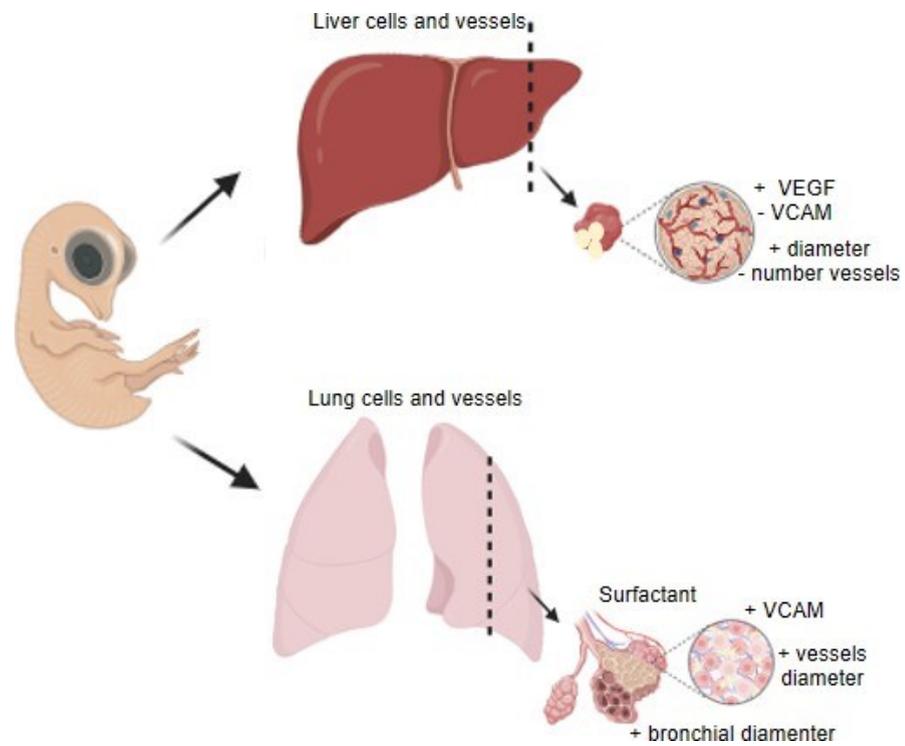
3.6.1 - Análise da presença e disponibilidade de polissacarídeos ácidos nos hepatócitos e células epiteliais pulmonares

3.6.2 - Quantificação de lipídios no tecido hepático

3.7 - Marcações celulares por imuno-histoquímica e

3.9 - Análises estatísticas.

Figura 8 - Graphical abstract do artigo “Methylmercury toxicity in the liver and lungs during embryonic development”.



Fonte: elaborado pela autora.

## **Methylmercury toxicity in the liver and lungs during embryonic development**

*(Prepared to submit to the Toxicological Research, ISSN 1976-8257, Impact Factor 2.3/2022, Qualis/CAPES A2)*

### **ABSTRACT**

Methylmercury (MeHg) is the most toxic organic mercury compound, affecting environments and organisms, including human populations. Prenatal exposure to MeHg is worrying, causing adverse effects on the central nervous and cardiovascular systems, damaging the development of the heart and blood vessels, according to in vitro and in vivo studies. Thus, vascularized tissues are potential targets of MeHg exposure, even at low doses. This study investigated the impact of a single exposure to MeHg on the development of the liver and lung in *Gallus domesticus*, as well as the organization of hepatocytes and pulmonary epithelial cells. Embryos were exposed to a single dose of 0.1 µg MeHg/50 µL saline at E1.5 and analyzed at E10 by measuring fresh mass, NOx concentration and performing optical microscopy techniques. Exposure to MeHg resulted in changes in vascular diameter and the size of endothelial cells in both organs, as well as changes in the content of proteins related to vascular formation and integrity VEGF and VCAM. Furthermore, the liver exposed to MeHg showed an increase in lipid droplets in hepatocytes and an increase in NOx concentration, a parameter related to inflammation. While the lung showed changes in cuboidal epithelial cells and expression of surfactant precursor molecules. These results demonstrate specific liver and lung responses to MeHg toxicity during embryonic development and demonstrate the importance of understanding the underlying mechanisms and potential health implications.

**Keywords:** Vessel diameter category; Endothelial cells; VEGF/VCAM proteins; Hepatocytes; Pulmonary epithelial cells

## Introduction

Methylmercury (MeHg) is the most toxic organic mercury that can affect environments and organisms, including impacting human populations (Grotto et al., 2010; Wildemann et al., 2015; Peppriell et al., 2020; Rosa-Silva et al., 2020). Prenatal exposure to MeHg is also an important issue, whose effects have been well explored mainly in the central nervous system and cardiovascular system, according to studies in in vitro and in vivo models (Huang et al., 2011; Robinson et al., 2011; Ferreira et al., 2018; Bjørklund et al., 2022; Ronconi-Krüger et al., 2022). Regarding cardiovascular impacts, it is known that this metal causes damage to the development of the heart and cardiac blood vessels (Ronconi-Krüger et al., 2024). However, all vascularized tissues are potentially targets for MeHg exposure, even at low exposure doses.

Considering the highly vascularized characteristic of the liver and lungs, MeHg can cause cellular damage in hepatocytes, pulmonary epithelial cells (cuboidal and columnar) and endothelial cells, thus impacting organogenesis. Consequently, changes in the cellular and tissue organization and function of these cells can significantly disrupt embryonic and fetal development, negatively affecting postnatal life (Warburton et al., 2010; HERRIGES and MORRISEY, 2014 ; JIA et al., 2017).

As development progresses, the liver assumes a hematopoietic function and, from the intermediate stages of development, begins its metabolic function by assimilating fatty acids and undergoing oxidation in the liver tissue (Golub and Cumano, 2013; Pulikanti et al., 2010). Moreover, during development, the lung does not perform the gas exchange function. Instead, its morphogenesis branches to the formation of the bronchial tree and, mainly, to the subsequent integration of the terminal alveolar region with the endothelial capillary bed. This integration will facilitate efficient gas exchange with the circulatory system after birth (Costa et al., 2001).

In this context, studies demonstrated that MeHg can alter organs of ectodermal origin, as the brain, cerebellum, neural tube (Carvalho et al., 2008; Hassan et al., 2012; Perkins et al., 2017; Abbott and Nigussie, 2021). Likewise,

studies with organs of mesodermal origin are also targets, as the heart and vessels (Hirooka and Kaji, 2012; Ronconi-Krüger et al., 2022; Ronconi-Krüger et al., 2024). However, there is still a gap in studies on the development of organs of endodermal origin in embryos exposed to MeHg, especially in highly vascularized structures with distinct tissue organizations, such as the liver and lungs. Thus, the objective of this study was to evaluate how a single exposure to MeHg in *Gallus domesticus* embryos can affect the tissue development of organs of the same embryonic origin, such as the liver and lung, focusing on the development of vessels and cells adjacent to them, such as embryonic hepatocytes and pulmonary epithelial cells.

## **Material and methods**

### **Exposure to MeHg**

Fertilized eggs of *Gallus domesticus* (Hy-Line Brown strain) obtained from the Laboratory of Poultry Science of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) were incubated at 37.5°C and 65.0% humidity. Completing E1.5, the embryos were exposed to a single dose of 0.1 µg of methylmercury II chloride diluted in 50 µL of saline solution, administered into the yolk sac, close to the vitelline vessels. Control group received exclusively 50 µL of saline solution. Embryos were monitored daily *in ovo* until E10, anesthetized by cooling for 15 min at 4°C, removed from egg membranes, euthanized by decapitation and masses were measured to determine the somatic index (SI) (Leland et al., 2019). At E1.5, the liver and lungs are in the initial process of formation, which justifies the age of exposure (Kingsbury et al., 1956). Furthermore, the analysis was performed at E10, the liver is made up of lobes and hepatic cords and the lungs are organized into branching bronchi and undifferentiated mesenchymal cells (Kingsbury et al., 1956; Mellouk et al., 2018). All animal experiments were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Santa Catarina (protocol no. 5843231018), which follows the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011). Additionally, the procedures were performed in accordance with the Planning Research and Experimental Procedures

on Animals: Recommendations for Excellence (PREPARE) and Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines.

### **Nitrite (NO<sub>x</sub>) dosage**

Liver and lung (n = 9 embryos/group) were sampled separately, homogenized in cold buffer (320 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl, 1 mM dithiothreitol, 10 µg/mL soy trypsin inhibitor, 10 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.2) and centrifuged at 30,000 × g for 30 min at 4°C. The samples were deproteinized with zinc sulfate and submitted to the enzyme nitrate reductase (obtained from *Escherichia coli*) for 3 h at 37°C to convert nitrate into nitrite. The samples were centrifuged at 30,000 × g, the supernatant was collected and added to Griess reagent (Granger et al., 1990). The colorimetric reaction of samples and the standard curve was read at 540 nm and results were expressed in µM NO<sub>x</sub> according to Duma et al. (2011).

### **Morphological analysis of liver and lungs**

Livers and lungs (n = 11 embryos/group) were fixed in 4% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 6 µm and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological routine. The diameter of vessels were determined in transverse sections of the liver and lung when the vessels had circular profiles. The diameters of the endothelial cells of the liver and lung, as well as adjacent and non-adjacent hepatocytes, columnar and cuboidal epithelial cells, were measured. Afterwards, averages were taken between the axes of each cell type (cell size). To identify the presence of acid polysaccharides, toluidine blue (TB) reaction was performed. The analysis was performed using ImageJ on 5 micrographs/section/embryo/group.

Lipid profiles in liver tissue were evaluated using sections stained with HE. Lipid droplets in the hepatocyte cytoplasm were quantified, and their occupied space was evaluated using intensity scores. Scores of 1, 2, and 3 were assigned to cells with lipid droplets occupying 10%, 20%, and 50% of the cellular space, respectively. Additionally, the damage caused by lipid accumulation was assessed according to Braun et al. (2001). This was measured using the formulas (number of

droplets/liver weight)  $\times$  100 and (number of droplets score 1  $\times$  1 + number of droplets score 2  $\times$  2 + number of droplets score 3  $\times$  3/liver weight)  $\times$  100.

The presence of acidic polysaccharides was evaluated using an area of  $5.27 \times 5.27$  (pixels/ $\mu\text{m}$ ) for liver tissue and  $2.64 \times 2.64$  (pixels/ $\mu\text{m}$ ) for lung tissue in revealed micrographs with the TB reaction, considering the intensity of pixels/ $\mu\text{m}$  using the optical density tool available in the ImageJ software.

### **Immunohistochemistry**

Liver and lung sections (n = 11 embryos/group) were dewaxed, washed with 3.0% hydrogen peroxide in methanol and washed with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) + 0.3% Triton X-100 + 5.0% fetal bovine serum (FBS). Sections were incubated at 4°C with rabbit anti-vascular endothelial growth factor IgG (anti-VEGF - 1:100); IgG mouse anti-vascular cell adhesive molecule (anti-VCAM - 1:100) followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:200), peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:200) and immunoreactions revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich). For the negative control of immunohistochemical reaction, the same procedures were followed, except that the primary antibody was omitted and replaced by 0.1M PBS.

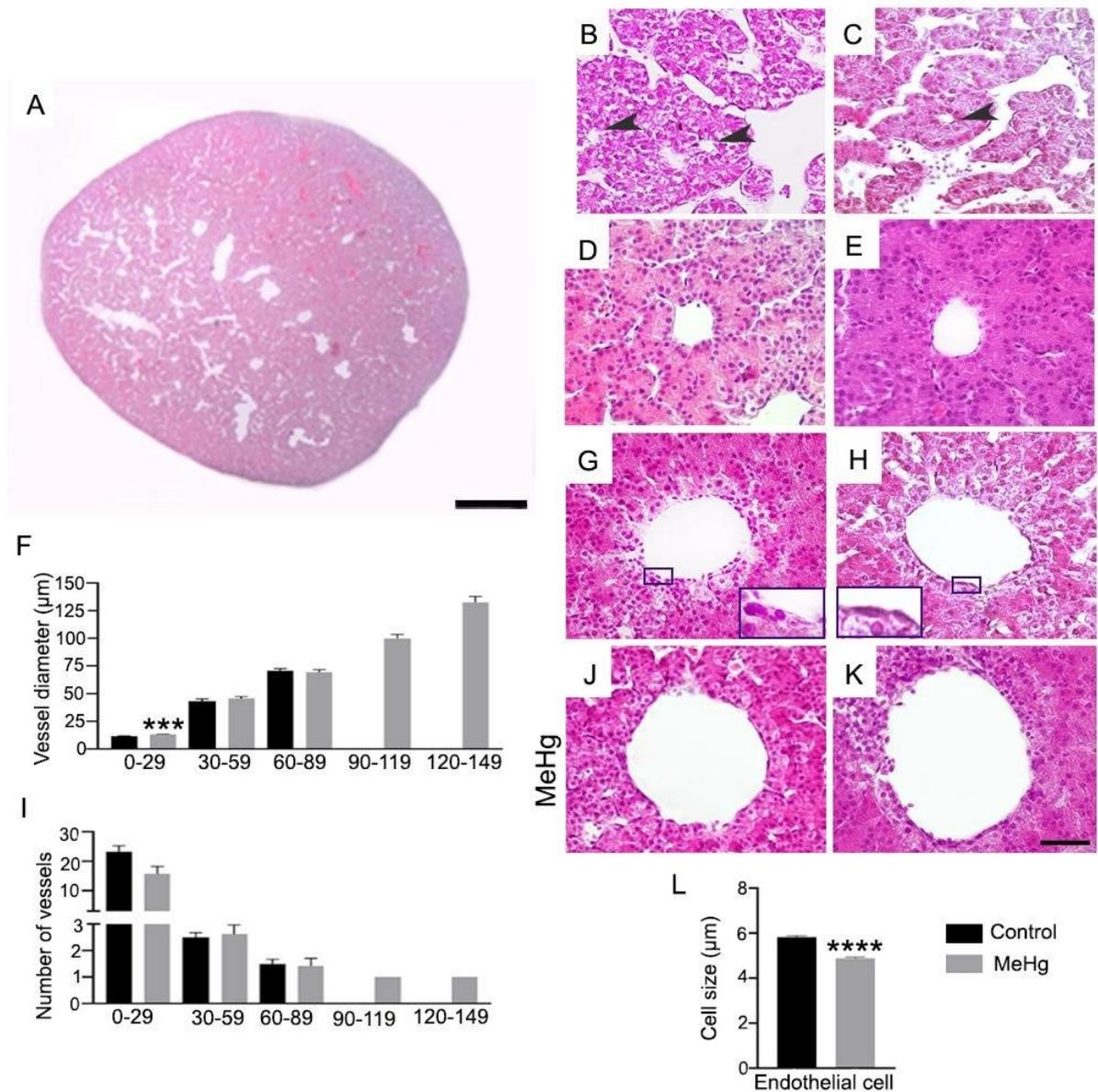
### **Statistical analysis**

Statistical analysis were performed with GraphPad Prism. Data normality was previously tested. The differences between groups were evaluated by Student's t-test, followed by Tukey's post hoc test. A significant difference was considered when  $p < 0.05$ . All data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## Results

To better understand the impact of MeHg on the hepatic and pulmonary vessels, we established common classes of vessel diameter to analyze the effects of this metal exposure. The classes defined were as follows: Class 1 (0  $\mu\text{m}$  - 29  $\mu\text{m}$ ), Class 2 (30  $\mu\text{m}$  - 59  $\mu\text{m}$ ), Class 3 (60  $\mu\text{m}$  - 89  $\mu\text{m}$ ), Class 4 (90  $\mu\text{m}$  - 119  $\mu\text{m}$ ), and Class 5 (120  $\mu\text{m}$  - 149  $\mu\text{m}$ ).

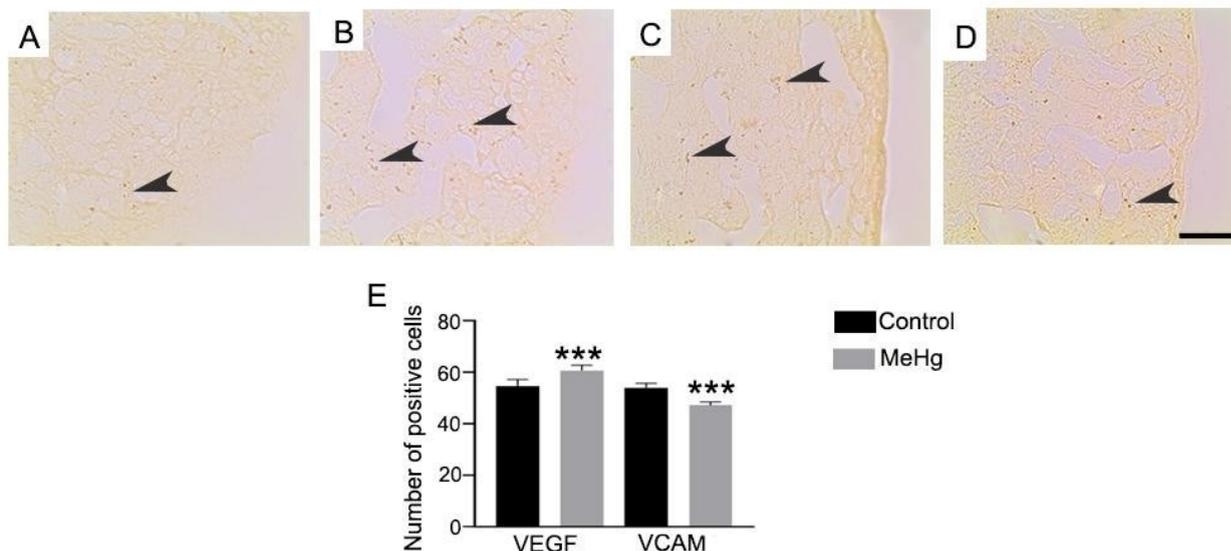
In the liver, exposure to MeHg induced a significant increase in class 1 vessel diameter, from 11.61  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.32) in the control group to 13.43  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.37;  $p < 0.001$ ) in MeHg-exposed embryos. However, there was a significant reduction in the number of vessels of the same class, from 23.21 ( $\pm$  1.90) in the control group to 15.78 ( $\pm$  2.40;  $p < 0.05$ ) in MeHg-exposed embryos. Regarding the size of hepatic endothelial cells, there was a significant reduction from 5.81  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.079) in control embryos to 4.88  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.051;  $p < 0.0001$ ) in MeHg-exposed embryos (Fig. 1). In addition to these measurements, the content of proteins related to vessel growth and cell adhesion was investigated using the VEGF marker and the VCAM marker, respectively. For vascular growth, there was a significant increase in the number of VEGF-positive cells, from 54.40 ( $\pm$  2.509) in the control to 60.72 ( $\pm$  2.05;  $p < 0.001$ ) in MeHg-exposed embryos. However, for cell adhesion, a significant decrease in the number of VCAM-positive cells was observed from 54.06 ( $\pm$  1.69) in control to 47.23 ( $\pm$  1.34;  $p < 0.001$ ) in MeHg-exposed embryos (Fig. 2).



**Figure 1.** Hepatic vessels of *Gallus domesticus* embryos at E10. Liver of the control embryo (A). Class 1 liver vessels (arrowheads), in control (B) and MeHg-exposed embryos (C). Class 2 liver vessels, in control (D) and MeHg-exposed embryos (E). Class 3 liver vessels (insert with endothelial cells), in control (G) and MeHg-exposed embryos (H). Class 4 (J) and class 5 (K) liver vessels in MeHg-exposed embryos. The graphs show the diameter of the vessels (F), the number of vessels (I) and the size of endothelial cells (L). MeHg, methylmercury. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*indicates  $p < 0.05$ ,

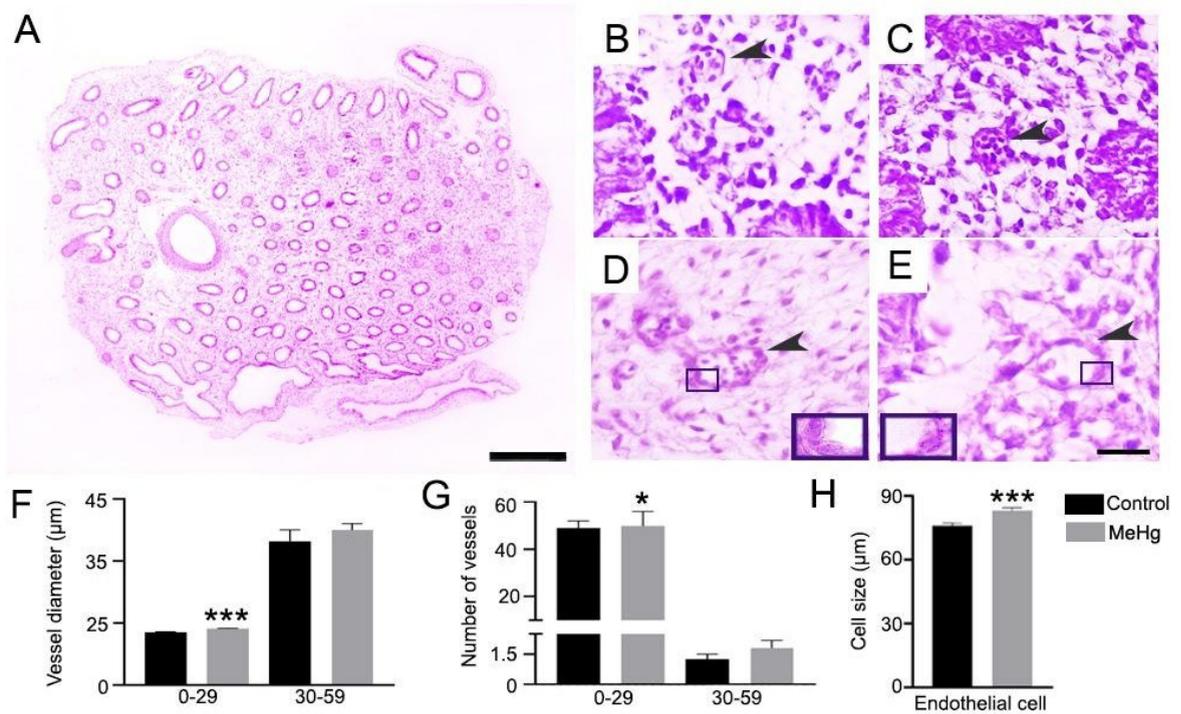
\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p > 0.0001$  between control and MeHg-exposed embryos.

Scale bars at A = 200  $\mu\text{m}$ ; in B, C, D, E, G, H, J, K = 20  $\mu\text{m}$ .

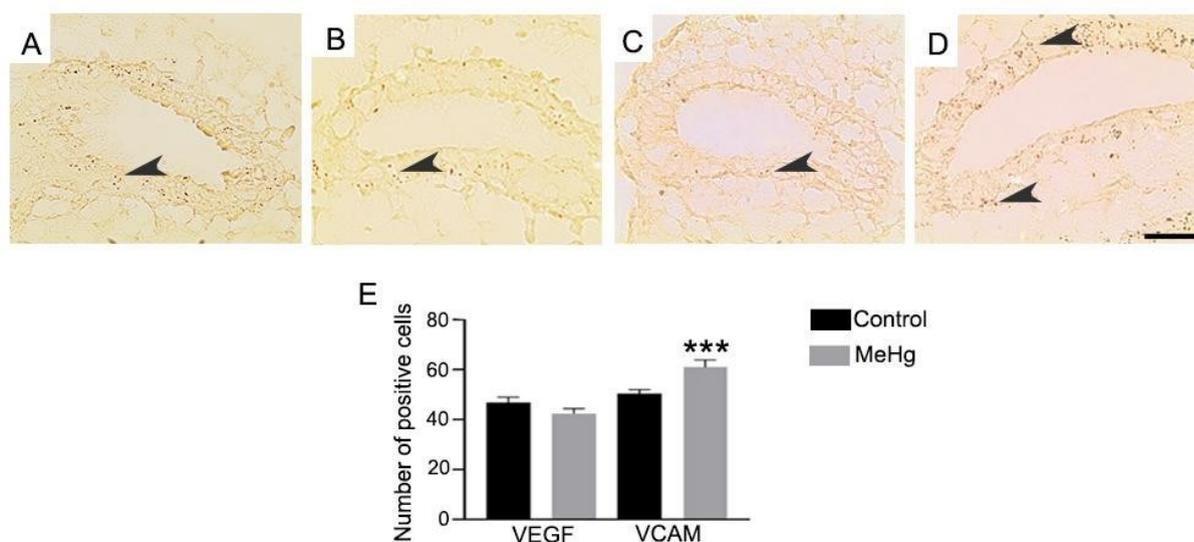


**Figure 2.** Immunolocalization in the liver of *Gallus domesticus* embryos at E10. VEGF-positive cells (arrowheads), in control (A) and in MeHg-exposed embryos (B). VCAM-positive cells (arrowheads), in control (C) and in MeHg-exposed embryos (D). The graph shows the mean number of positive cells (E). MeHg, methylmercury; VEGF, vascular endothelial growth factor; VCAM, vascular cell adhesion molecule. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  between control and MeHg-exposed embryos. Scale bar at A, B, C and D = 20  $\mu\text{m}$ .

In the lung, exposure to MeHg induced a significant increase in class 1 vessel diameter, from 12.71  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.183$ ) in the control group to 13.57  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.186$ ;  $p < 0.001$ ) in embryos exposed to MeHg. Regarding the size of lung endothelial cells, there was a significant increase from 4.390  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.041$ ) in control embryos to 4.547  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.040$ ;  $p < 0.01$ ) in embryos exposed to MeHg (Fig. 3). Furthermore, the number of VCAM-positive cells increased from 50.44 ( $\pm 1.56$ ) in control to 60.94 ( $\pm 2.99$ ;  $p < 0.001$ ) in embryos exposed to MeHg (Fig. 4).

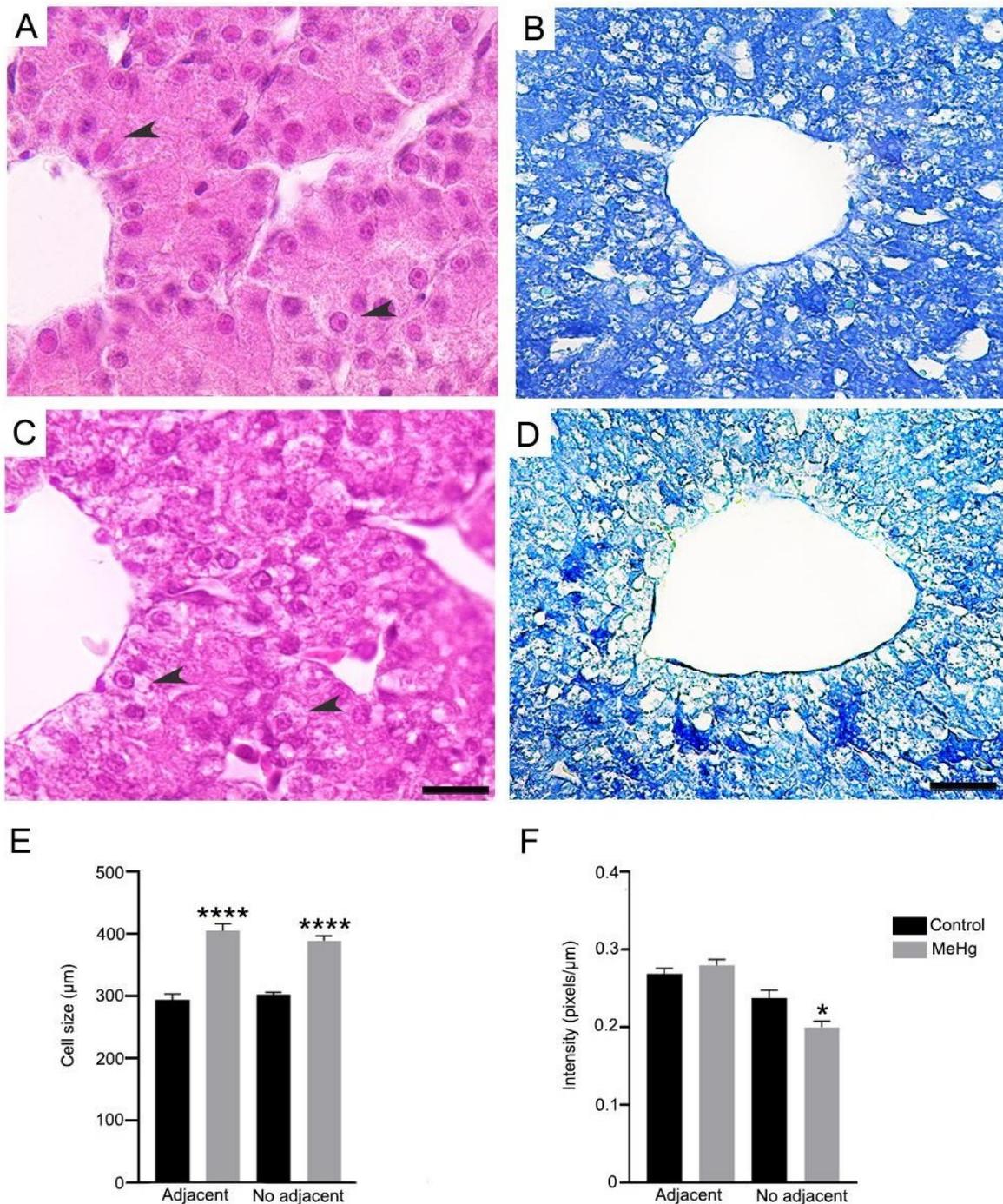


**Figure 3. Lung vessels of *Gallus domesticus* embryos at E10. Lung of the control embryo (A). Class 1 pulmonary vessels (arrowheads), in control (B) and MeHg-exposed embryos (C). Class 2 pulmonary vessels (arrowhead for vessel with insert with endothelial cells), in control (D) and MeHg-exposed embryos (E). The graphs show the diameter of the vessels (F), the number of vessels (G) and the size of endothelial cells (H). MeHg, methylmercury. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*indicates  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p > 0.0001$  between control and MeHg-exposed embryos. Scale bars at A = 200  $\mu\text{m}$ ; in B, C, D and E = 20  $\mu\text{m}$ .**



**Figure 4. Immunolocalization in the lung of *Gallus domesticus* embryos at E10. VEGF-positive cells (arrowheads), in control (A) and in MeHg-exposed embryos (B). VCAM-positive cells (arrowheads), in control (C) and in MeHg-exposed embryos (D). The graphs show the diameter of the vessels (F), the number of vessels (G) and the size of endothelial cells (H). MeHg, methylmercury. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*indicates  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p > 0.0001$  between control and MeHg-exposed embryos. Scale bars at A, B, C and D = 20  $\mu\text{m}$ .**

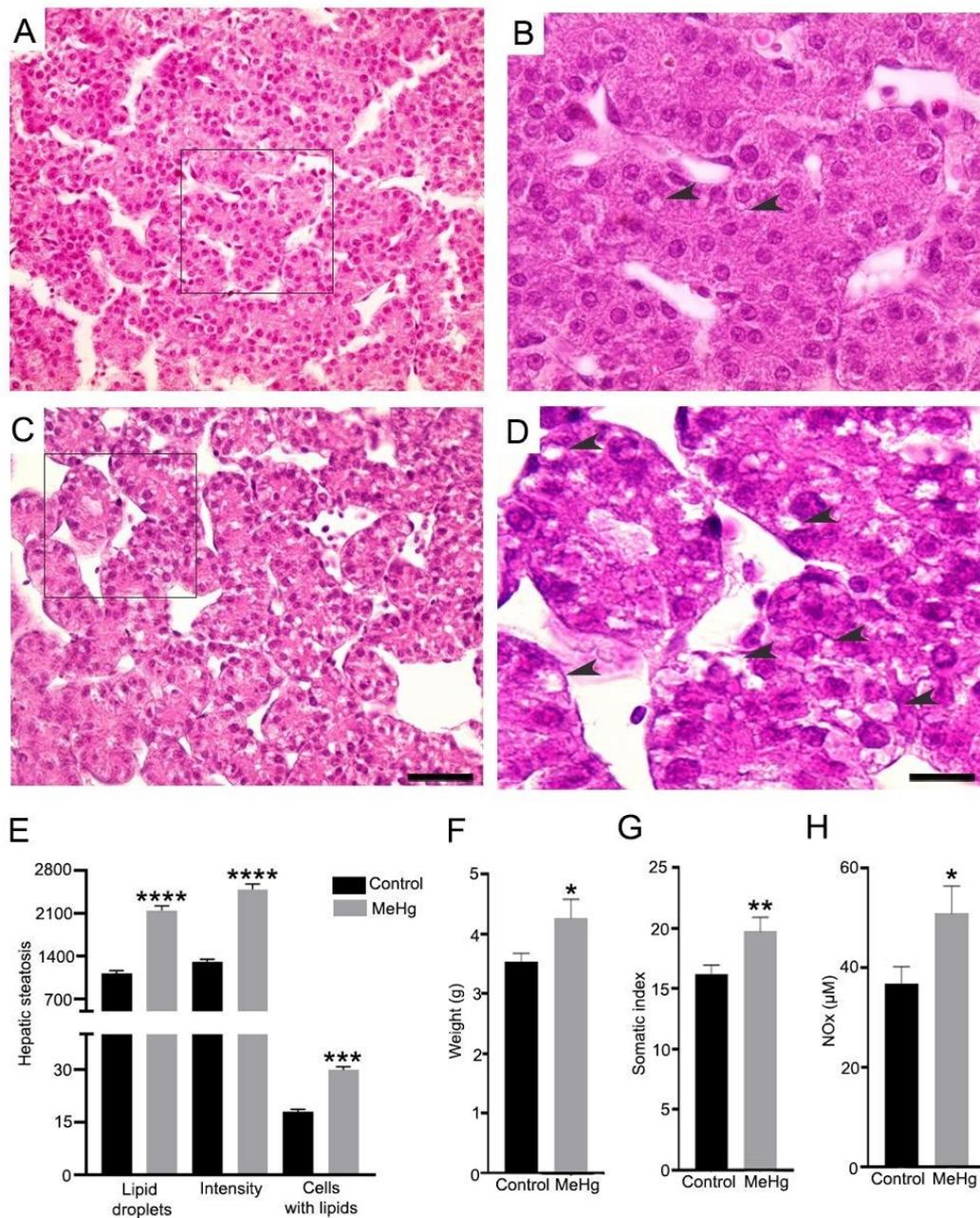
Regarding hepatocytes, an increase in hepatocytes adjacent to vessels was observed from 7.01  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.08) in the control group to 8.16  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.09;  $p < 0.001$ ) in MeHg-exposed embryos. The intensity of acidic polysaccharides in hepatocytes adjacent to vessels reduced from 0.4745  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm$  0.021) in control group to 0.4001  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm$  0.016;  $p < 0.05$ ) in MeHg-exposed embryos. Additionally, for hepatocytes no-adjacent to vessels, an increase in cell size was also observed from 7.09  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.03) in control group to 8.01  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.05;  $p < 0.01$ ) in MeHg-exposed embryos. The intensity of acidic polysaccharides in hepatocytes not adjacent to vessels did not show a significant difference between the control and MeHg-exposed groups (Fig. 5).



**Figure 5.** Hepatocytes from *Gallus domesticus* embryos at E10. Hepatocytes adjacent to vessels and not adjacent (arrowheads), in control (A) and MeHg-exposed embryos (B). Reaction of acidic polysaccharides, in control (C) and MeHg-exposed embryos (D). The graphs show the hepatocyte size (E) and the intensity of the hepatocyte reaction (F). MeHg, methylmercury. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*indicates  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p > 0.0001$  between

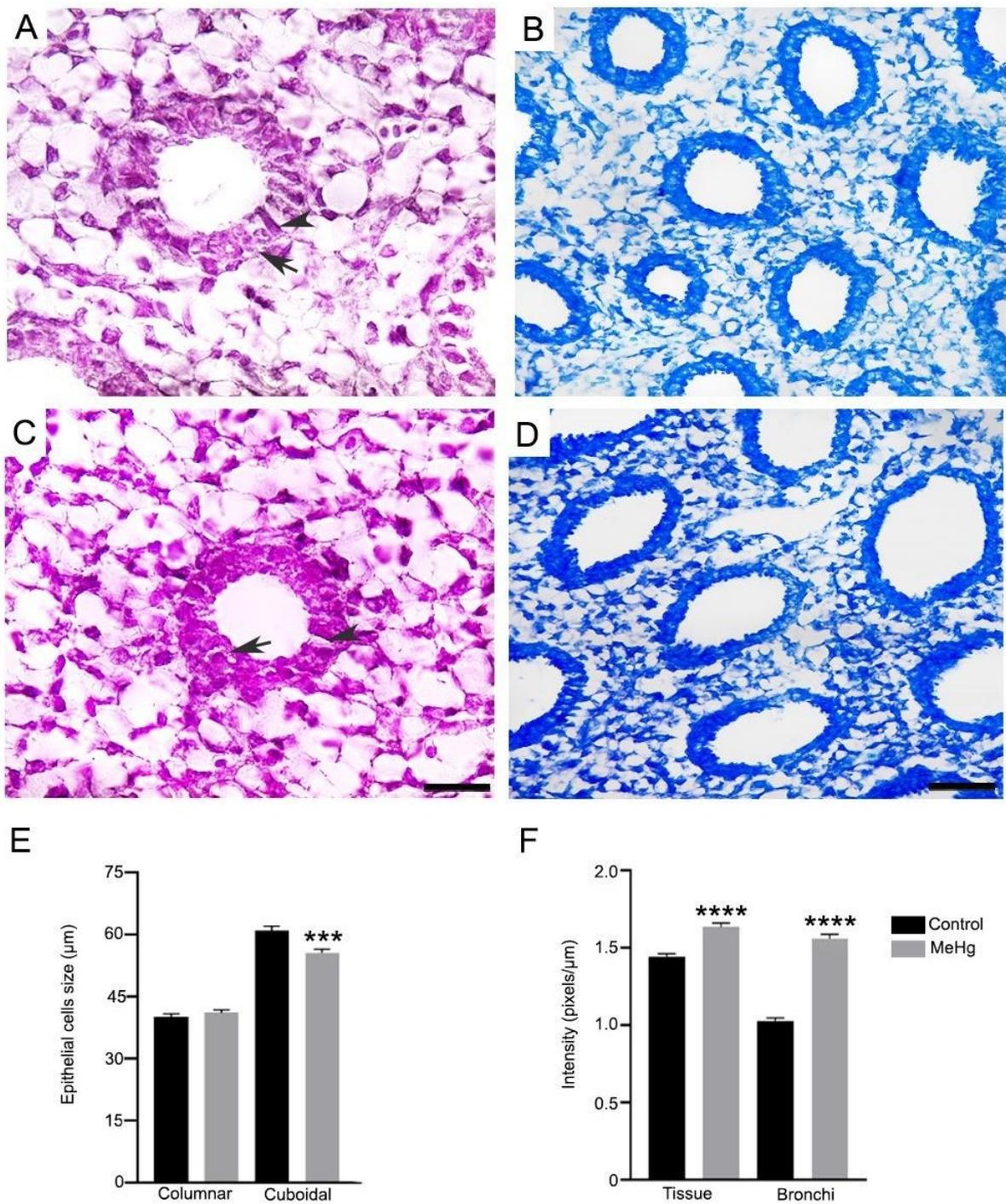
**control and MeHg-exposed embryos. Scale bars in A and C = 10  $\mu\text{m}$ ; in B and D = 20  $\mu\text{m}$ .**

The number of cells with lipid droplets increased from 18.01 ( $\pm$  0.63) in control to 29.78 ( $\pm$  0.97;  $p < 0.001$ ) in MeHg-exposed embryos. The number of lipid droplets per liver increased from 1,118 ( $\pm$  45.51) in controls to 2,146 ( $\pm$  75.67;  $p < 0.0001$ ) in MeHg-exposed embryos. Droplet intensity per liver increased from 1,300  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  52.87) in control to 2,492  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  85.25;  $p < 0.0001$ ) in MeHg-exposed embryos. Furthermore, the hepatosomatic index increased from 16.23% ( $\pm$  0.72) in control embryos to 19.72% ( $\pm$  1.16;  $p < 0.01$ ) in MeHg-exposed embryos. NOx concentration increased from 36.74  $\mu\text{M}$  ( $\pm$  3.42) in control to 50.88  $\mu\text{M}$  ( $\pm$  5.52;  $p < 0.05$ ) in MeHg-exposed embryos (Fig. 6).



**Figure 6.** Hepatocytes with lipid droplets from *Gallus domesticus* embryos at E10. Hepatocytes (highlighting the region with lipid droplets), in control (A) and MeHg-exposed embryos (C). Hepatocytes at greater magnification with lipid droplets, in control (B) and MeHg-exposed embryos (D). The graphs show hepatic steatosis (E), somatic index (F) and NOx concentration (G). MeHg, methylmercury. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*indicates  $p < 0.05$ , \*\*  $p > 0.01$ , \*\*\*  $p > 0.001$  and \*\*\*\*  $p > 0.0001$  between control and MeHg-exposed embryos. Scale bars in A and B = 20  $\mu\text{m}$ ; in C and D = 10  $\mu\text{m}$ .

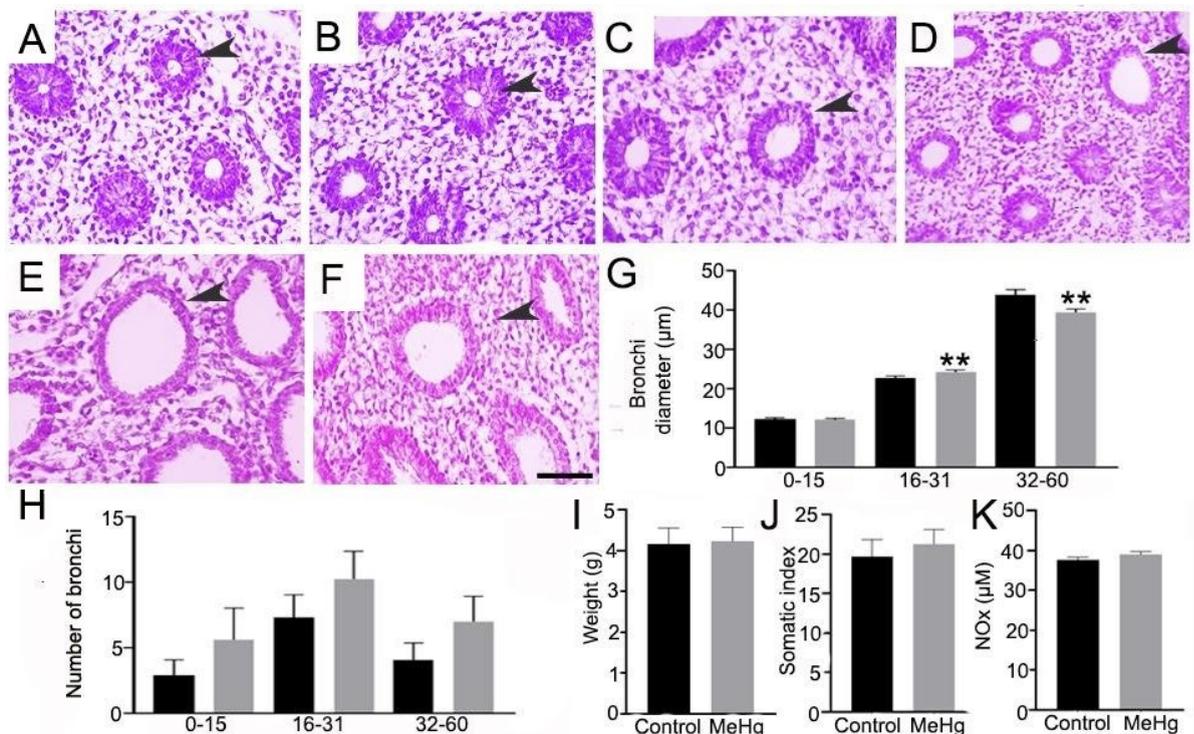
In the lung, a reduction in the cell size of cuboidal epithelial cells was observed from 2.981  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.029$ ) in the control group to 2.886  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.022$ ;  $p < 0.05$ ) in MeHg-exposed embryos. Regarding the intensity of acidic polysaccharides, an increase in the reaction was observed in the region close to the bronchi from 1.029  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 0.021$ ) in control to 1.561  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 0.029$ ;  $p < 0.0001$ ) in MeHg-exposed embryos. Similarly, in the alveolar parenchyma, there was an increase from 1.446  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 0.017$ ) in the control to 1.636  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 0.025$ ;  $p < 0.0001$ ) in MeHg-exposed embryos (Fig. 7).



**Figure 7. Epithelial cells and bronchi of *Gallus domesticus* embryos at E10. Columnar (arrows) and cuboidal (arrowhead) epithelial cells, in control (A) and MeHg-exposed embryos (C). Reaction of acidic polysaccharides in bronchi and tissue, in control (B) and MeHg-exposed embryos (D). The graphs show the size of epithelial cells (E) and the intensity of the reaction in the**

bronchi and tissue (F). MeHg, methylmercury. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* indicates  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p > 0.0001$  between control and MeHg-exposed embryos. Scale bars in A and B= 10  $\mu\text{m}$ ; in C and D = 20  $\mu\text{m}$ .

To better understand the impact of MeHg on the bronchi, we established classes of bronchi diameters to analyze the effects of this metal exposure. The classes defined were as follows: Parabronchi (0  $\mu\text{m}$  - 15  $\mu\text{m}$ ), secondary bronchi (16  $\mu\text{m}$  - 31  $\mu\text{m}$ ) and primary bronchi (32  $\mu\text{m}$  - 60  $\mu\text{m}$ ). Exposure to MeHg induced an increase in mean bronchiolar diameter classification, from 22.81  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.48) in control to 24.33  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.50;  $p < 0.01$ ) in embryos MeHg-exposed. In the classification of largest bronchiolar diameter, a reduction was observed from 43.83 ( $\pm$  1.41) in the control group to 39.44  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0.82;  $p < 0.01$ ) in embryos MeHg-exposed. Furthermore, no significant differences were observed in the lung in the somatic index, when comparing control and MeHg-exposed embryos. Likewise, NOx concentration did not respond differently between control and MeHg-exposed embryos (Fig. 8).



**Figure 8.** Lung organization of *Gallus domesticus* embryos at E10. Class 1 Parabronchi (arrowheads), in control (A) and embryos exposed to MeHg (B).

**Secondary bronchi, in control (C) and embryos exposed to MeHg (D). Primary bronchi, in control (E) and in embryos exposed to MeHg (F). The graphs show the diameter of the bronchi (G), the number of bronchi per class (H), weight (I), somatic index (J) and NO<sub>x</sub> concentration (K). MeHg, methylmercury. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*indicates  $p < 0.01$  between control and MeHg-exposed embryos. Scale bars in A, B, C, D, E and F = 20  $\mu$ m.**

## **Discussion**

The toxicity of MeHg for liver and lung development is an important issue, given the known consequences it causes in organs of the cardiovascular system and the central nervous system. In this study, a single exposure to MeHg, administered early in liver and lung development, caused specific and differential damage to blood vessels. Furthermore, it caused morphological damage to liver and lung endothelial cells, as well as affecting the morphology of hepatocytes and epithelial cells. Damage to hepatocytes involves an increase in cell size and accumulation of lipids. Meanwhile, exposed cuboidal epithelial cells were shown to be reduced in size.

The initial impact of MeHg exposure observed here was an increase in vessel diameter. In the liver and lung, vessels with a diameter of 0 to 29  $\mu$ m showed this increase. This result allows us to explore the potential equal effect of MeHg exposure on vessel formation in organs with the same embryonic origin. This egalitarian effect demonstrates that even organs of the same origin, but with different tissue organizations, present similar responses. The liver, for example, has greater tissue density and compaction compared to the lung (Evenou et al., 2011). Thus, we sought to understand the responses of growth factors and endothelial adhesiveness. In this observed parameter, the organs responded to MeHg toxicity in different ways. The liver showed an increase in the number of cells positive for endothelial growth factor, while the number of cells positive for vascular adhesion molecules decreased. This imbalance is certainly related to vessels in the 90 to 119  $\mu$ m and 120 to 149  $\mu$ m classes that were observed in the liver of embryos exposed

to MeHg and which, in turn, are not found in control embryos. In the lung, although only the 0 to 29  $\mu\text{m}$  and 30 to 59  $\mu\text{m}$  classes were observed, the number of cells positive for endothelial growth factor did not differ. On the other hand, the increase in cells positive for vascular adhesion molecules demonstrates the importance of maintaining already formed vessels. Since, these molecules have the important function of maintaining the vascular lumen (Cheng et al., 2015).

Specifically, the endothelial cells, MeHg exposure, had contrasting effects on these cells in the liver and lung. In the liver, exposure to MeHg resulted in a reduction in endothelial cell size, whereas in the lung, there was an increase in cell size. Despite the differing responses of these cells, MeHg appears to exert distinct effects in each tissue, potentially influencing the selective permeability role of endothelial cells. Additionally, responses to physical and chemical stimuli in circulation can disrupt cellular balance and directly affect cell shape, impacting functions such as vascular tone regulation. Consequently, alterations in endothelial cell morphology serve as important indicators of pathological states (Ando and Kamiya, 1993; Sumpio et al., 2002; Pober and Sessa, 2007; Sturtzel, 2017). Therefore, endothelial dysfunction may also be related to the bioavailability of vasodilators originating from the endothelium, such as nitric oxide (NO) (Shah et al., 1997; Pennathur and Heinecke, 2007; Vanhoutte et al., 2009; Greuter and Shah, 2016). The imbalance of this molecule disrupts endothelium-dependent vasodilation, which, when combined with the dysregulation of molecules such as VCAM and VEGF, stimulates angiogenesis to sustain tissue functions and manifests an inflammatory stimulus that can be triggered by lipopolysaccharides or lipoproteins (Davies et al., 1993; Hood et al., 2012; Botham and Wheeler-Jones, 2013; Lange et al., 2016). Thus, in this study, we observed an increase in plasma levels of NO<sub>x</sub> in the liver, indicating inflammation in liver tissue. Unlike the lung, where plasma NO<sub>x</sub> levels did not differ between control and exposed to MeHg, directly related to the increase in endothelial cell size. On the other hand, in the liver, the increase in vessel diameter tends to be related to this inflammatory profile induced by MeHg, different from what was expected in this study. The liver has a temporary contribution to embryonic hematopoiesis, according to Couinaud (1999), highlighting the importance of morphological studies to understand the spatial

distribution of hematopoietic sites during development. In view of the impact of MeHg on endothelial cells, the remaining cells were observed individually in each of the two organs, so that we had cellular responses related to the specific functions of the liver and lung, as well as susceptibility to MeHg toxicity.

Increase in the cellular size of hepatocytes adjacent to vessels and non-adjacent hepatocytes represents an expected morphological change for the cell type. Thus, hepatocytes adjacent to the vessels that transport MeHg to the bloodstream and the hepatocytes not adjacent to the vessels had an equal response. However, the effect of MeHg on hepatocytes was not restricted to an increase in hepatocyte size and led us to a more specific investigation into the cause of this increase. Thus, the intensity of acidic polysaccharides was tested and demonstrated to be reduced for hepatocytes not adjacent to the vessels, demonstrating changes in the components of the cell cytoplasm. In that the number of droplets and the size of these droplets increased, increases in lipid content have already been observed with other toxicants, as described by Geng et al. (2019). Furthermore, Geng et al. (2019) describes the composition of lipids presented in the form of phospholipids and cholesterol esters are described. Furthermore, the non-metabolization of different lipid components shows us effects correlated to the inflammatory response induced by MeHg highlighted by the levels of NO<sub>x</sub>. Consequently, the observation of an increase in liver weight in exposed embryos and an increase in the somatic index of exposed embryos. Highlighting the effect of MeHg from early liver development through exposure to a single dose at E1.5 early in liver development (Kingsbury et al., 1956).

In the lung, we also analyzed the cellular size of epithelial cells. In this case, only cuboidal epithelial cells exhibited a notable reduction in cell size. Furthermore, throughout lung tissue, an increase in the intensity of the reaction with acidic polysaccharides has been demonstrated. Thus, the function of the successor cells of the cuboidal epithelial cells (type II pneumocytes) is related to the production of pulmonary surfactant, essential for maintaining the integrity of the alveoli and facilitating breathing. This increase in the occurrence of acidic polysaccharides may be associated with the accumulation of surfactant components such as

phospholipids, proteins and glycoproteins (Bernhard et al., 2001; Bernhard et al., 2004; Bjørnstad et al., 2014). Therefore, we can infer that the reduction in size of cuboidal epithelial cells and the increase observed in intensity with acidic polysaccharides indicates premature differentiation/formation of cuboidal epithelial cells in type I and type II pneumocytes. This inference is supported by the fact that chicken embryos only begin to express surfactants at E17, as demonstrated in the study by Bjørnstad et al. (2014).

In this study, we observed an increase in the luminal diameter of bronchi in the class 16 to 31 $\mu$ m a reduction in the luminal diameter of bronchi classified between 32 and 60  $\mu$ m. These results can be attributed to the reduction of cuboidal epithelial cells and the reactions of acidic components in the lung tissue. Therefore, the change induced by MeHg in this tissue is limited to vascular damage related to the diameter of its vessels and the consequent increase in endothelial cell size, combined with the damage induced by MeHg in the differentiation of columnar epithelial cells in cuboidal epithelial cells. This directly interferes with the subsequent expression of surfactants necessary for the maturation of lung tissue. However, such results did not directly impact tissue weight, somatic index, and did not even demonstrate signs of inflammation when related to plasma NO<sub>x</sub> levels.

In conclusion, our study clarifies the differential effects of MeHg toxicity on embryonic development, particularly in organs with distinct tissue organizations, such as the liver and lung. We observed distinct responses in vascular morphology, endothelial cell dynamics, hepatocyte and epithelial cells morphology between these two organs after exposure to MeHg during embryonic development. The liver exhibited an increase in vessel diameter and a reduction in the size of endothelial cells, along with signs of inflammation, while the lung showed changes mainly in cuboidal epithelial cells and surfactant expression precursors without evident signs of inflammation. These findings emphasize the complex and tissue-specific nature of MeHg toxicity during embryonic development, highlighting the importance of further research in elucidating the underlying mechanisms and potential implications for human health. Furthermore, our study highlights the importance of considering

organ-specific responses in assessing the overall impact of environmental toxicants on prenatal development.

### Data Availability

Data supporting the findings of the study are available from the corresponding author upon reasonable request

### References

- Grotto, D., Valentini, J., Fillion, M., Passos, C. J. S., Garcia, S. C., Mergler, D., & Barbosa Jr, F. (2010). Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Science Of The Total Environment*, 408(4), 806-811. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.053>
- Wildemann, T. M., Mirhosseini, N., Siciliano, S. D., & Weber, L. P. (2015). Cardiovascular responses to lead are biphasic, while methylmercury, but not inorganic mercury, monotonically increases blood pressure in rats. *Toxicology*, 328, 1-11. <https://10.1016/j.tox.2014.11.009>
- Peppriell, A. E., Gunderson, J. T., Vorojeikina, D., & Rand, M. D. (2020). Methylmercury myotoxicity targets formation of the myotendinous junction. *Toxicology*, 443, 152561. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152561>
- Rosa-Silva, H. T., Panzenhagen, A. C., Schmidtt, V., Teixeira, A. A., Espitia-Pérez, P., de Oliveira Franco, Á., ... & Moreira, J. C. F. (2020). Hepatic and neurobiological effects of foetal and breastfeeding and adulthood exposure to methylmercury in Wistar rats. *Chemosphere*, 244, 125400. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125400>
- Huang, Y., Mai, W., Hu, Y., Wu, Y., Song, Y., Qiu, R., ... & Kuang, J. (2011). Poor sleep quality, stress status, and sympathetic nervous system activation in nondipping hypertension. *Blood Pressure Monitoring*, 16(3), 117-123. <https://doi.org/10.1097/MBP.0b013e328346a8b4>
- Robinson, J. F., Theunissen, P. T., van Dartel, D. A., Pennings, J. L., Faustman, E. M., & Piersma, A. H. (2011). Comparison of MeHg-induced toxicogenomic responses across in vivo and in vitro models used in developmental toxicology. *Reproductive Toxicology*, 32(2), 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.011>

- Ferreira, F. F., Nazari, E. M., & Müller, Y. M. (2018). MeHg causes ultrastructural changes in mitochondria and autophagy in the spinal cord cells of chicken embryo. *Journal of Toxicology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8460490>
- Bjørklund, G., Antonyak, H., Polishchuk, A., Semenova, Y., Lesiv, M., Lysiuk, R., & Peana, M. (2022). Effect of methylmercury on fetal neurobehavioral development: An overview of the possible mechanisms of toxicity and the neuroprotective effect of phytochemicals. *Archives of Toxicology*, 96(12), 3175-3199. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03366-3>
- Ronconi-Krüger, N., Pinheiro, J., Simioni, C., & Nazari, E. M. (2022). Methylmercury Toxicity During Heart Development: A Combined Analysis of Morphological and Functional Parameters. *Cardiovascular Toxicology*, 22(12), 962-970. <https://doi.org/10.1007/s12012-022-09772-4>
- Ronconi-Krüger, N., Müller, Y. M. & Nazari, E. M. (2024). Exploring developmental MeHg impact on extraembryonic and cardiac vessels and its effect on cardiomyocyte contractility. *Journal of Applied Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/jat.4661>
- Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., ... & Jesudason, E. (2010). Lung organogenesis. *Current Topics In Developmental Biology*, 90, 73-158. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)90003-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)90003-3)
- Herriges, M., & Morrisey, E. E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*, 141(3), 502-513. <https://doi.org/10.1242/dev.098186>
- Jia, J., Qian, C., Dong, Y., Li, Y. F., Wang, H., Ghossoub, M., ... & Ozin, G. A. (2017). Heterogeneous catalytic hydrogenation of CO<sub>2</sub> by metal oxides: defect engineering—perfecting imperfection. *Chemical Society Reviews*, 46(15), 4631-4644. <https://doi.org/10.1039/C7CS00026J>
- Golub, R., & Cumano, A. (2013). Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 51(4), 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.08.004>
- Pulikanti, R., Peebles, E. D., Keirs, R. W., Bennett, L. W., Keralapurath, M. M., & Gerard, P. D. (2010). Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation<sup>1, 2</sup>. *Poultry Science*, 89(5), 860-865. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00531>
- Costa, R. H., Kalinichenko, V. V., & Lim, L. (2001). Transcription factors in mouse lung development and function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(5), L823-L838. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.5.L823>
- Carvalho, M. C., Nazari, E. M., Farina, M., & Muller, Y. M. (2008). Behavioral, morphological, and biochemical changes after *in ovo* exposure to

methylmercury in chicks. *Toxicological Sciences*, 106(1), 180-185. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn158>

Hassan, S. A., Moussa, E. A., & Abbott, L. C. (2012). The effect of methylmercury exposure on early central nervous system development in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Journal of Applied Toxicology*, 32(9), 707-713. <https://doi.org/10.1002/jat.1675>

Perkins, M., Barst, B. D., Hadrava, J., & Basu, N. (2017). Mercury speciation and subcellular distribution in experimentally dosed and wild birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(12), 3289-3298. <https://doi.org/10.1002/etc.3905>

Abbott, L. C., & Nigussie, F. (2021). Mercury toxicity and neurogenesis in the mammalian brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7520. <https://doi.org/10.3390/ijms22147520>

Hirooka, T., & Kaji, T. (2012). The cytotoxicity of methylmercury in human microvascular endothelial cells and pericytes in culture. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(8), 1201-1205. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00394>

Leland, S. E., Straeter, P. A., & Gnadt, B. J. (2019). The role of the IACUC in the absence of regulatory guidance. *ILAR Journal*, 60(1), 95-104. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilz003>

Kingsbury, J. W., Alexanderson, M., & Kornstein, E. S. (1956). The development of the liver in the chick. *The Anatomical Record*, 124(2), 165-187. <https://doi.org/10.18466/cbayarfb.305213>

Mellouk, N., Ramé, C., Delaveau, J., Rat, C., Maurer, E., Froment, P., & Dupont, J. (2018). Adipokines expression profile in liver, adipose tissue and muscle during chicken embryo development. *General and Comparative Endocrinology*, 267, 146-156. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.06.016>

National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals US. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/12910>

Granger, D. L., Hibbs, J. B., Perfect, J. R., & Durack, D. T. (1990). Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 85(1), 264-273. <https://doi.org/10.1172/JCI114422>

Duma, D., Fernandes, D., Bonini, M. G., Stadler, K., Mason, R. P., & Assreuy, J. (2011). NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. *European Journal of Pharmacology*, 668(1-2), 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.065>

- Braun, C. M., Burgess, J. R., & Latour, M. A. (2001). Liver lipid accumulation in duck embryos and hatchlings change with parental age<sup>1</sup>. *Neonatology*, 80(3), 228-234. <https://doi.org/10.1159/000047148>
- Evenou, F., Hamon, M., Fujii, T., Takeuchi, S., & Sakai, Y. (2011). Gas-permeable membranes and co-culture with fibroblasts enable high-density hepatocyte culture as multilayered liver tissues. *Biotechnology Progress*, 27(4), 1146-1153. <https://doi.org/10.1002/btpr.626>
- Cheng, X., Luo, R., Wang, G., Xu, C. J., Feng, X., Yang, R. H., ... & Yang, X. (2015). Effects of 2, 5-hexanedione on angiogenesis and vasculogenesis in chick embryos. *Reproductive Toxicology*, 51, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.12.006>
- Ando, J., & Kamiya, A. (1993). Blood flow and vascular endothelial cell function. *Frontiers of Medical and Biological Engineering: The International Journal of the Japan Society of Medical Electronics and Biological Engineering*, 5(4), 245-264. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00770-1>
- Sumpio, B. E., Riley, J. T., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(12), 1508-1512. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00075-4](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00075-4)
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 803-815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial cells. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, 71-91. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_4)
- Shah, V., Haddad, F. G., Garcia-Cardena, G., Frangos, J. A., Mennone, A., Groszmann, R. J., & Sessa, W. C. (1997). Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2923-2930. <https://doi.org/10.1172/JCI119842>
- Pennathur, S., & Heinecke, J. W. (2007). Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Current Diabetes Reports*, 7(4), 257-264. <https://doi.org/10.31083/j.fb12703105>
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E. H., & Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, 196(2), 193-222. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>
- Greuter, T., & Shah, V. H. (2016). Hepatic sinusoids in liver injury, inflammation, and fibrosis: new pathophysiological insights. *Journal of Gastroenterology*, 51, 511-519. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1190-4>

- Davies, M. J., Gordon, J. L., Gearing, A. J. H., Pigott, R., Woolf, N., Katz, D., & Kyriakopoulos, A. (1993). The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *The Journal of Pathology*, 171(3), 223-229. <https://doi.org/10.1002/path.1711710311>
- Hood, E. D., Greineder, C. F., Dodia, C., Han, J., Mesaros, C., Shuvaev, V. V., ... & Muzykantov, V. R. (2012). Antioxidant protection by PECAM-targeted delivery of a novel NADPH-oxidase inhibitor to the endothelium in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 163(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.08.031>
- Botham, K. M., & Wheeler-Jones, C. P. (2013). Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 446-464. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.06.001>
- Lange, C., Storkebaum, E., De Almodóvar, C. R., Dewerchin, M., & Carmeliet, P. (2016). Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nature Reviews Neurology*, 12(8), 439-454. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.88>
- Couinaud, C. (1999). Liver anatomy: portal (and suprahepatic) or biliary segmentation. *Digestive Surgery*, 16(6), 459-467. <https://doi.org/10.1159/000018770>
- Geng, D., Musse, A. A., Wigh, V., Carlsson, C., Engwall, M., Orešič, M., & Hyötyläinen, T. (2019). Effect of perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) on the liver lipid metabolism of the developing chicken embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.040>
- Bernhard, W., Haslam, P. L., & Floros, J. (2004). From birds to humans: new concepts on airways relative to alveolar surfactant. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30(1), 6-11. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0158TR>
- Bernhard, W., Gebert, A., Vieten, G., Rau, G. A., Hohlfeld, J. M., Postle, A. D., & Freihorst, J. (2001). Pulmonary surfactant in birds: coping with surface tension in a tubular lung. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(1), R327-R337. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.1.R327>
- Bjørnstad, S., Paulsen, R. E., Erichsen, A., Glover, J. C., & Roald, B. (2014). Type I and II pneumocyte differentiation in the developing fetal chicken lung: conservation of pivotal proteins from birds to human in the struggle for life at birth. *Neonatology*, 105(2), 112-120. <https://doi.org/10.1159/000355346>

## **Acknowledgements**

This work was supported by scholarships (N Ronconi-Krüger) of Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina/FAPESC and Coordenação de Aproveitamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, Brazil. EM Nazari is recipient of productivity fellowship of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq, Brazil (number 311570/2020-8). The authors are thankful to Laboratory of Poultry Science (UFSC), Multiuser Laboratory/LAMEB (UFSC), and Central Laboratory of Electron Microscopy/LCME (UFSC).

## **Author information**

### **Authors and Affiliations**

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Nathália Ronconi-Krüger & Evelise Maria Nazari

### **Contributions**

NR-K contributed to data curation, conceptualization, methodology, formal analysis, validation, investigation, and writing and editing of the original draft. EMN contributed to data curation, supervision, conceptualization, Project administration, and writing, editing, and reviewing of the manuscript.

### **Corresponding author**

Correspondence to Evelise Maria Nazari

### **Ethics declarations**

### **Conflict of interest**

All authors declare that they have no conflict of interest.

#### 4. DISCUSSÃO

A toxicidade do MeHg durante o desenvolvimento embrionário é um tema complexo, que abrange uma variedade de órgãos e sistemas, com implicações significativas para a saúde pública e ambiental. A poluição por MeHg nos ecossistemas aquáticos resulta em bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar, afetando a fauna aquática e comprometendo a saúde dos ambientes naturais. Conseqüentemente, os seres humanos que consomem esses organismos também são impactados (Clarkson e Magos, 2006). A contaminação ambiental, portanto, não apenas compromete a biodiversidade e o equilíbrio ecológico, mas também aumenta o risco de exposição humana ao MeHg (Grandjean e Landrigan, 2006; Yang et al., 2020).

Em humanos, a exposição de embriões ao MeHg está intimamente ligada ao consumo materno de alimentos contaminados (Driscoll et al., 2013). A quantificação do MeHg em recém-nascidos logo após o nascimento também é um indicativo preocupante (Hightower et al., 2006; Bellanger et al., 2013; Mortensen et al., 2014), evidenciando a transferência desse metal tóxico da gestante para o embrião/feto. Estudos epidemiológicos têm documentado a associação entre níveis elevados de MeHg e o aumento do risco de doenças cardiovasculares em crianças e jovens (Sørensen et al., 1999; Grandjean et al., 2004; Yorifuji et al., 2010; Gribble et al., 2015). Em estudo prévio de Ronconi-Krüger et al. (2022), desenvolvido no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, foram observadas alterações morfológicas significativas nos corações de embriões de *Gallus domesticus* expostos ao MeHg. A exposição resultou em redução na espessura das paredes ventriculares e mudanças nas trabéculas. Esses impactos foram associados ao aumento de proteínas relacionadas à interrupção do ciclo celular e à redução da proliferação dos cardiomiócitos. Além disso, houve alterações nos mediadores endoteliais responsáveis pela contratilidade e integridade vascular. A quantidade e a morfologia das mitocôndrias dos cardiomiócitos também foram prejudicadas. Resultados combinados que causaram a redução dos batimentos cardíacos e inspiraram a continuação da investigação sobre o efeito do MeHg na vasculatura embrionária.

#### 4.1. Efeito do MeHg sobre os vasos extraembrionários

Primeiramente, nesta tese investigamos a interferência do MeHg na morfologia dos vasos extraembrionários. Os resultados obtidos através das análises morfométricas dos vasos demonstraram que os vasos extraembrionários tiveram o diâmetro e número aumentados. Essas alterações evidenciam a relação direta do MeHg na formação dos vasos. Uma vez que os vasos extraembrionários são o primeiro microambiente a ter contato com o MeHg, devido à forma de administração, foram observadas alterações em todas as classes vasculares. Além disso, os vasos extraembrionários expostos ao MeHg apresentaram a redução do número de células positivas para VEGF e aumento para VCAM, ambas moléculas utilizadas neste estudo como marcadores de formação, tamanho e manutenção de integridade vascular. Isso ocorre porque o VEGF é um fator de crescimento regulado para determinar o tamanho do vaso e conseqüentemente a formação do espaço do lúmen vascular (Cheng et al., 2015). A redução do conteúdo de VEGF induzida pelo MeHg, sugere que a rede vascular já esteja completamente estabelecida impactando a sinalização de crescimento (Simons et al., 2016). Por outro lado, o aumento de VCAM pode indicar um esforço do sistema vascular para manter sua integridade e funcionalidade, como uma possível resposta adaptativa à redução de VEGF (He et al., 2013).

O número de células positivas para VCAM demonstrado neste estudo, indica uma resposta da rede vascular extraembrionária na integridade e estabilidade vascular. Os vasos extraembrionários são utilizados como modelo de estudos de capacidade vascular e toxicidade devido à sua acessibilidade e representatividade das respostas vasculares embrionárias. Estudos como os de Allen e Wilson (1993), Plasswilm et al. (1999), Tufan e Satiroglu-Tufan (2003), Cheng et al. (2015), Guidolin et al. (2020) e Acharya et al. (2024), nos ajudam a fundamentar a ideia de que a exposição ao MeHg pode comprometer a capacidade dos vasos sanguíneos de suportar o fluxo e o volume sanguíneo, aumentando o risco de disfunção vascular e doenças cardiovasculares (Sukra et al., 1976; Maltepe e Celeste Simon 1998; Gheorghescu et al., 2015). Além disso, conforme Gladwin et al. (2005), o aumento da demanda de oxigênio e nutrientes estimula o microambiente extraembrionário a buscar alternativas para manter o crescimento

dos vasos e a vasodilatação. Assim, analisamos a concentração de NOx nos vasos extraembrionários e como a exposição ao MeHg pode influenciar na vasodilatação. Sendo observada a redução na concentração de NOx, era esperado o comprometimento da vasodilatação dos vasos expostos. No entanto, os vasos extraembrionários apresentaram um aumento do diâmetro dos vasos, indicando que um mecanismo fisiopatológico inicial em resposta à exposição ao MeHg. Esse aumento no diâmetro dos vasos pode representar um mecanismo compensatório pelo qual o embrião regula o suprimento sanguíneo durante a vasculogênese, em resposta às demandas metabólicas iniciais do desenvolvimento (Lee et al., 2007; Culver e Dickinson, 2010; Odland et al., 2019).

#### **4.2. Efeito do MeHg sobre o desenvolvimento do coração**

Com relação às demandas cardíacas, o estudo conduzido por Ronconi-Krüger et al. (2022), revelou que embriões expostos ao MeHg apresentaram paredes cardíacas mais finas, resultando em diminuição da demanda energética e dos batimentos cardíacos. Esses resultados prévios destacaram a necessidade de investigar o papel das artérias coronárias na manutenção da saúde cardíaca. Nos embriões de aves, modelo de estudo aqui utilizado, os vasos extraembrionários tem função de fornecer oxigênio e nutrientes ao embrião. Da mesma forma, as artérias coronárias são responsáveis por fornecer o suprimento sanguíneo ao tecido cardíaco e aos tecidos adjacentes (Lavine e Ornitz, 2009; Red-Horse et al., 2010; Wu et al., 2012; Tian et al., 2013). Este paralelo entre a função dos vasos extraembrionários e as artérias coronárias, sugere que qualquer comprometimento nas artérias coronárias poderia afetar a função cardíaca e o desenvolvimento embrionário. No que diz respeito aos mamíferos placentários, embora as artérias coronárias desempenhem um papel semelhante no fornecimento de sangue ao tecido cardíaco, o suprimento sanguíneo aos órgãos embrionários é mediado pela placenta (Burton e Fowden, 2015).

A exposição ao MeHg promoveu alterações na localização das artérias coronárias, que em embriões expostos encontram-se mais próximas do miocárdio. Esse resultado sugere uma adaptação em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo

proveniente da região extraembrionária, em virtude do aumento do diâmetro dos vasos extraembrionários, em direção à região intraembrionária. A proximidade das artérias coronárias com o miocárdio pode indicar uma alteração morfológica compatível com a menor espessura das paredes ventriculares (Tomanek 2005; Wu et al., 2012; Ronconi-Krüger et al., 2022). Essas alterações na morfologia das artérias coronárias podem representar um mecanismo de regulação para enfrentar a pressão sanguínea recebida pelo músculo cardíaco embrionário, uma vez que a estrutura modificada das artérias pode ajudar a distribuir a pressão de maneira mais uniforme e eficiente, evitando sobrecargas locais e potencial dano ao tecido cardíaco em desenvolvimento. A redução da espessura das paredes ventriculares e a nova localização das artérias coronárias podem contribuir para a adaptação do coração embrionário às mudanças nas condições hemodinâmicas, garantindo assim um suprimento sanguíneo adequado ao tecido cardíaco em desenvolvimento, como proposto por Sehgal e Menahem (2013).

Além do impacto na localização das artérias coronárias, o MeHg também promoveu o aumento no diâmetro e número de veias no tecido cardíaco. Esse resultado pode indicar uma resposta adaptativa à maior demanda de oxigênio exigida pelo músculo cardíaco para sustentar seu desenvolvimento e funcionamento adequado (Sehgal e Menahem, 2013). Com o aumento das veias, há um potencial aumento na capacidade de transporte de oxigênio e nutrientes para as células do miocárdio. Análogo aos efeitos observados nos vasos extraembrionários, investigamos os efeitos da toxicidade do MeHg sobre as moléculas VEGF e VCAM no tecido cardíaco. Assim, diferente do observado na região extraembrionária, aqui ambas as moléculas apresentaram redução no número de células positivas para VEGF e VCAM. Essas moléculas estão relacionadas aos processos de regulação da função endotelial e formação de vasos, o que sugere a disfunção endotelial no tecido cardíaco exposto ao MeHg, contribuindo possivelmente para estímulos inflamatórios (Furieri et al., 2011; Fowler et al., 2021). Furieri et al. (2011), mostraram que a exposição ao MeHg pode induzir a ativação de vias inflamatórias e de disfunção endotelial, promovendo a resposta inflamatória no tecido cardíaco. Este processo pode resultar em um ambiente

pro-inflamatório, caracterizado por um aumento de infiltração de células imunes no tecido.

Observamos também uma redução da concentração de NOx no tecido cardíaco exposto ao MeHg. A medição dos níveis de NOx pode ser utilizada para estimar a quantidade de óxido nítrico presente no tecido. A exposição ao MeHg pode ativar o sistema de desintoxicação do estresse oxidativo, levando à redução do NO, necessário para a vasodilatação e crescimento dos vasos. Em particular, o estresse oxidativo pode interferir na função vasoprotetora do NO, relacionada à baixa interação endotelial e à redução proliferação celular (Förstermann e Münzel, 2006; Förstermann, 2010; Freed e Gutterman, 2013; Akhigbe e Ajayi, 2021). Além disso, Ronconi-Krüger et al. (2022) demonstraram que o MeHg causa um desequilíbrio entre os mediadores endoteliais NOS-1 e NOS-3, resultando em redução na proliferação celular em cardiomiócitos. Este panorama demonstra o comprometimento da dinâmica do NO e a interferência na remodelação estrutural da parede vascular, que pode perturbar a contração e o relaxamento do tecido cardíaco.

Ainda, observamos a redução do número de sarcômeros em embriões expostos ao MeHg, acompanhada por uma redução na distância entre a linha Z e a banda M. Essa redução implica diretamente na função mecânica do coração, afetando sua capacidade de contrair e bombear sangue de maneira adequada às demandas metabólicas do organismo (Coulshed e Cowan, 1991; Ferrantini et al., 2017). Ainda, observamos o aumento do conteúdo de cTnl, impactando a estrutura miofibrilar. As troponinas cardíacas modulam a taxa de deslocamento das miofibrilas e a capacidade de ligação ao íon cálcio (Liu et al., 2020; Juncos et al., 2021). O aumento no conteúdo de cTnl já foi documentado como indutor da hiperpolarização citosólica em células cardíacas expostas ao bromo por Juncos et al., (2021). Esses resultados, que incluem a redução do número de sarcômeros, a diminuição da distância entre a linha Z e a banda M, e o aumento do conteúdo de cTnl, sugerem que a eficiência de contração cardíaca foi afetada pelo MeHg, o que está fortemente relacionado à redução do ritmo cardíaco. Além disso, a redução do ritmo cardíaco compromete a circulação sanguínea para as regiões periféricas do

embrião em desenvolvimento (Rusu et al., 2017; Khadangi et al., 2019; Liu et al., 2020).

### **4.3. Efeito do MeHg sobre o desenvolvimento do fígado**

Prosseguimos nossa investigação para os tecidos altamente vascularizados, porém com organizações teciduais diferenciadas, como fígado e pulmão. Ambos têm a mesma origem embrionária, endodérmica. No entanto, o fígado apresenta uma organização tecidual densa com uma estrutura parenquimatosa compacta, enquanto o pulmão possui uma organização tecidual mais esponjosa, caracterizada por um parênquima alveolar que irá permitir trocas gasosas (Costa et al., 2001; Pulikanti et al., 2010; Golub e Cumano, 2013; Gordillo et al., 2015). Nesse contexto, é importante destacar que o fígado possui uma diferenciação vascular ainda pouco compreendida, já descrita por Collardeau-Frachon e Scoazec (2008). Isso porque a relação entre a complexidade da função hematopoiética e a necessidade de um aporte vascular altamente permeável dentro de uma estrutura tecidual densa, com uma diferenciação vascular ainda pouco compreendida em relação às demandas metabólicas e hematopoiéticas do fígado em desenvolvimento. De tal modo, o conceito de hierarquização da distribuição sanguínea no fígado é fundamental para sua segmentação funcional. Esse conceito é explorado em trabalhos clássicos como de Couinaud (1999), Mavrides et al., (2001) e Gallego et al., (2004), que discutem a organização do fígado em unidades funcionais baseadas na ramificação da veia porta e na distribuição dos vasos hepáticos. Essa organização permite uma eficiente distribuição do sangue para atender às necessidades específicas de cada segmento do fígado.

No presente estudo, observamos a redução no número de vasos de menor diâmetro e registramos a ocorrência de um vaso nas duas maiores classes no fígado de embriões expostos ao MeHg. Em contrapartida, o diâmetro dos vasos aumentou nos vasos de menor diâmetro e vasos com mais de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro foram registrados apenas no fígado de embriões expostos ao MeHg. O que nos levou a observar o aumento de células positivas para VEGF e a redução de células positivas para VCAM, ambas moléculas com as funções já esclarecidas nos tópicos

anteriores da discussão desta tese. As alterações dos diâmetros dos vasos observadas neste estudo estão relacionadas à distribuição vascular e à permeabilidade exercida por um número menor de vasos, compensada pelo maior diâmetro dos vasos com mais de 100  $\mu\text{m}$ . Além disso, o aumento de VEGF é um dos indicativos de que os vasos ainda estão em formação, enquanto a redução de VCAM pode sugerir uma menor necessidade de adesão celular para manter o lúmen vascular. Uma vez que os vasos ainda estão em formação, há menos necessidade de manter a integridade e a estabilidade dos vasos quando observados os embriões expostos (Cheng et al., 2015).

A partir do número de células positivas para VEGF e VCAM, investigamos os efeitos do MeHg na população de células de revestimento vascular, especialmente as células endoteliais do fígado, onde foi observada uma redução no tamanho das células endoteliais em embriões expostos ao MeHg. Essa redução indica uma alteração morfológica que pode afetar a função das células endoteliais, uma vez que elas respondem a estímulos físicos e químicos na circulação, perturbando o equilíbrio desse tipo celular e influenciando sua forma (Ando e Kamiya, 1993; Sumpio et al., 2002; Pober e Sessa, 2007; Sturtzel, 2017). Isso as torna um importante indicador patológico, quando observada a exposição ao MeHg. Ainda, observamos um aumento na concentração de NOx no tecido hepático exposto ao MeHg, possivelmente relacionado à redução do tamanho das células endoteliais e da consequente biodisponibilidade do óxido nítrico, conforme sugerido aqui e documentado por Rauen et al. (2007) em casos de disfunção endotelial. Esses resultados indicam, mais uma vez, que a disfunção endotelial pode ser um mecanismo subjacente aos efeitos tóxicos do MeHg no fígado em desenvolvimento (Zheng et al., 2013). Tendo em vista o impacto do MeHg sobre as células endoteliais seguidas da disfunção endotelial observada, as células hepáticas foram avaliadas em relação à sua proximidade ao vaso.

O MeHg induziu o aumento dos hepatócitos, tanto aqueles adjacentes quanto os não adjacentes aos vasos sanguíneos. Isso demonstra que, além do MeHg alcançar o tecido por meio dos vasos sanguíneos, a permeabilidade tecidual do fígado mostrou-se eficiente (Jungermann e Katz, 1989). Portanto, os hepatócitos adjacentes e hepatócitos não adjacentes demonstram impacto semelhante no

tamanho da célula, evidenciando a resposta uniforme do tecido hepático à exposição ao MeHg. Para compreender melhor o aumento do tamanho dos hepatócitos, investigamos a intensidade de polissacarídeos ácidos. Os polissacarídeos ácidos são componentes da matriz extracelular e podem influenciar a morfologia celular (Frantz et al., 2010). Observamos aqui, a redução na intensidade desses polissacarídeos na região dos hepatócitos não adjacentes aos vasos sanguíneos. No entanto, mesmo com a redução de intensidade de reação, os hepatócitos não adjacentes aos vasos sanguíneos apresentaram regiões com metacromasia. Esse resultado sugere uma possível alteração na composição ou distribuição de polissacarídeos ácidos, relacionada a alterações na matriz extracelular, indicando uma resposta do fígado à exposição ao MeHg (Knook et al., 1977). Observamos também o aumento no número de hepatócitos com gotículas lipídicas, das quais apresentavam diferentes tamanhos quando comparadas às células do fígado do embrião controle. O que demonstrou uma intensidade maior de acúmulo lipídico por célula nos embriões expostos ao MeHg.

A presença dessas gotículas lipídicas indica uma possível disfunção metabólica induzida pelo MeHg, refletindo alterações tanto na estrutura celular quanto na função metabólica do fígado em desenvolvimento (Feldman e Grantham, 1964). Portanto, a associação entre a redução na intensidade dos polissacarídeos ácidos e a presença de gotículas lipídicas no tecido hepático exposto ao MeHg pode fornecer informações importantes sobre mecanismos subjacentes aos efeitos tóxicos do MeHg no fígado em desenvolvimento.

#### **4.4. Efeito do MeHg sobre o desenvolvimento do pulmão**

Após discutir a relação da toxicidade do MeHg com um tecido altamente vascularizado, como o fígado, que possui uma organização tecidual densa, passamos a observar os efeitos do MeHg em outro órgão de origem endodérmica, o pulmão. Diferentemente do fígado, o pulmão possui um parênquima alveolar, frouxamente organizado, com vasos (Ovalle e Nahirney, 2008). Em relação aos vasos pulmonares, houve o aumento do diâmetro dos vasos da menor classe. Esses vasos, de tamanho semelhante aos da menor classe no fígado, também foram impactados pela exposição ao MeHg. Assim, podemos inferir que o MeHg

tem um efeito similar nos vasos de órgãos derivados do endoderma, afetando principalmente os vasos de menor diâmetro, independentemente do número de classes estabelecidas em cada órgão e independente da organização tecidual de cada órgão. Diante disso, buscamos compreender as respostas das moléculas relacionadas à integridade dos vasos. Foi observado uma alteração significativa apenas em VCAM, com um aumento no número de células positivas para essa molécula. Isso é consistente com o papel de VCAM, uma vez que os vasos estão em formação, há maior necessidade de adesão celular na manutenção do lúmen vascular conforme discutido por Cheng et al. (2015). Portanto, o próximo passo foi analisar como as células endoteliais pulmonares responderam à exposição ao MeHg.

Assim, houve um aumento das células endoteliais pulmonares. Embora as células endoteliais apresentem diferentes respostas ao MeHg durante o desenvolvimento, principalmente ao compararmos as respostas das células endoteliais hepáticas e pulmonares, é importante destacar que essas células adquirem especificidades arteriais, venosas, capilares e linfáticas (Fish e Wythe, 2015; Marziano et al., 2021). Esse processo de especificação ocorre simultaneamente com a morfogênese e a organogênese, levando as células endoteliais a uma especialização organotípica, ou seja de acordo com o órgão (Nolan et al., 2013; Paik et al., 2020). Sendo assim, no pulmão, um órgão repleto de capilares destinados à futura troca gasosa, essa especialização endotelial é particularmente notável. Essa especialização demonstrou-se influenciada pela exposição ao MeHg com o aumento das células endoteliais, embora não tenhamos avaliado diretamente a capacidade de troca gasosa, nossos resultados indicam que a exposição ao MeHg pode comprometer essa função após o nascimento.

Com relação às células específicas do pulmão, observou-se uma redução das células epiteliais cúbicas. Além disso, foi observado o aumento na intensidade da reação com polissacarídeos ácidos. A função dos pneumócitos tipo II está relacionada à produção de surfactante pulmonar, essencial para manter a integridade da estrutura de troca gasosa e facilitar a respiração. Esse aumento na reação de polissacarídeos ácidos pode estar associado ao acúmulo de componentes do surfactante, como fosfolipídios, proteínas e glicoproteínas

(Bernhard et al., 2001; Bernhard et al., 2004; Bjørnstad et al., 2014). Jozsa e Reffy (1975) descreveram a reação do azul de toluidina como útil para identificar o surfactante alveolar, pois o corante reage com os fosfolipídios presentes no surfactante pulmonar. Portanto, podemos inferir que a redução do eixo das células epiteliais cúbicas e o aumento na intensidade de polissacarídeos ácidos indicam uma diferenciação e maturação prematura dessas células, assim como um aumento nas moléculas precursoras do surfactante alveolar. Esta inferência é apoiada pelo fato de que os embriões de galinha iniciam a produção de surfactante apenas em E17, quando as células epiteliais cúbicas já se diferenciaram em pneumócitos tipo I e tipo II, sendo o tipo II responsável pela produção de surfactante, conforme demonstrado por Bjørnstad et al. (2014). Corroborando a esses resultados, observamos que nos embriões expostos ao MeHg houve um aumento do diâmetro dos brônquios secundários e a redução do diâmetro dos brônquios primários. Isso ocorre porque a formação dos brônquios secundários, juntamente com a produção de surfactante, é um indicativo de maturação precoce. O aumento no diâmetro dos brônquios pode sugerir que os pulmões estão se preparando para a produção de surfactante (Orgeig et al., 2004). Portanto, a alteração induzida pelo MeHg neste tecido não se limita ao dano vascular relacionado ao diâmetro dos vasos e ao aumento no tamanho das células endoteliais, mas também afeta o tamanho das células epiteliais cúbicas e consequentemente impacta a maturação do tecido pulmonar.

#### **4.5. Efeito sistêmico do MeHg no desenvolvimento do embrião**

Os efeitos sistêmicos do MeHg durante o desenvolvimento embrionário foram evidenciados através da análise dos índices somáticos dos órgãos estudados. A massa dos embriões expostos ao MeHg apresentou-se reduzida, indicando uma restrição no crescimento embrionário que pode estar relacionada aos efeitos tóxicos do MeHg sobre a função vascular e a integridade dos tecidos, interferindo na distribuição de nutrientes e oxigênio durante o desenvolvimento. Sorensen et al. (1999) e Reyes e Manalich (2005), consideram o baixo peso ao nascer determinante para alterações nas condições de pressão arterial na infância e indicam como determinantes de hipertensão na vida adulta. Além disso, o MeHg

já foi associado a baixos índices de crescimento ao nascer, como peso e comprimento (Obi et al., 2015; Ou et al., 2015; Wells et al., 2016).

Durante essa análise, foi observada uma redução no índice cardio-somático, acompanhada de um aumento no índice hepatossomático. No entanto, apesar dos indícios de maturação prematura dos brônquios no pulmão, não foram registradas alterações significativas no índice somático deste órgão. Esses resultados ressaltam a heterogeneidade das respostas dos órgãos à exposição ao MeHg, com o coração e o fígado demonstrando alterações em relação ao seu tamanho e ao peso total do embrião. Por outro lado, o pulmão parece ter sido menos afetado em termos de proporção de seu tamanho em relação ao peso total do embrião, apesar das alterações observadas em sua morfologia.

O impacto da exposição a uma única dose de MeHg durante o desenvolvimento embrionário demonstrou a complexidade de diferentes respostas fisiológicas, evidenciando que diferentes órgãos podem reagir de maneiras variadas à toxicidade do MeHg. Essa adaptação à toxicidade, indicada pela redução no índice cardio-somático, combinada com o aumento no índice hepatossomático, indica uma possível redistribuição dos recursos metabólicos. Isso não se limita apenas ao baixo peso ao nascimento, mas também tem repercussões significativas na saúde cardiovascular, respiratória e metabólica desses indivíduos. Estes resultados destacam a importância de uma abordagem morfológica para entender os impactos sistêmicos do MeHg, que podem ter consequências duradouras na saúde dos indivíduos expostos. As descobertas enfatizam a necessidade de medidas preventivas para minimizar a exposição ao MeHg, especialmente em populações vulneráveis, e a importância de regulamentações mais rigorosas e programas de educação pública sobre os riscos do MeHg.

## **5. CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstram que uma única exposição ao MeHg durante o desenvolvimento embrionário, afetou os vasos extraembrionários e intraembrionários, com foco nos vasos sanguíneos do coração, fígado e pulmão. Adicionalmente, a exposição alterou a morfologia dos cardiomiócitos, hepatócitos,

pneumócitos e células endoteliais. O impacto do MeHg no desenvolvimento dos órgãos alvo deste estudo, demonstrou respostas diferenciadas, com relação a estrutura e organização tecidual de cada um deles.

Os vasos extraembrionários e cardíacos, apresentaram alterações relacionadas às moléculas de integridade e contratilidade, o que interferiu diretamente na resistência vascular e na contração cardíaca, impactando na distribuição sanguínea corporal. Além disso, as mudanças observadas no fígado, indicaram uma disfunção metabólica relacionada ao aumento de gotículas lipídicas. Em relação aos efeitos pulmonares, o MeHg demonstrou afetar formação vascular e células relacionadas à produção de moléculas precursoras de surfactante pulmonar, contribuindo para a maturação prematura dos brônquios.

## 6. REFERÊNCIAS

- Acharya, B., Dey, S., Sahu, P. K., Behera, A., Chowdhury, B., & Behera, S. (2024). Perspectives on chick embryo models in developmental and reproductive toxicity screening. *Reproductive Toxicology*, 126, 108583. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108583>
- Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 464-478. <https://doi.org/10.1038/nrm2183>
- Akhigbe, R., & Ajayi, A. (2021). The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01435-7>
- Al Naieb, S., Happel, C. M., & Yelbuz, T. M. (2013). A detailed atlas of chick heart development in vivo. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 195(4), 324-341. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2012.10.011>
- Allen, W. E., & Wilson, D. J. (1993). Early embryonic angiogenesis in the chick area vasculosa. *Journal of Anatomy*, 183, 579.
- Ando, J., & Kamiya, A. (1993). Blood flow and vascular endothelial cell function. *Frontiers of medical and biological engineering: the international journal of the Japan Society of Medical Electronics and Biological Engineering*, 5(4), 245-264.
- Bellanger, M., Pichery, C., Aerts, D., Berglund, M., Castaño, A., Čejchanová, M., & DEMO/COPHES. (2013). Economic benefits of methylmercury exposure control in Europe: monetary value of neurotoxicity prevention. *Environmental Health*, 12, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-3>
- Bernhard, W., Gebert, A., Vieten, G., Rau, G. A., Hohlfeld, J. M., Postle, A. D., & Freihost, J. (2001). Pulmonary surfactant in birds: coping with surface tension in a tubular lung. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(1), R327-R337. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.1.R327>
- Bernhard, W., Haslam, P. L., & Floros, J. (2004). From birds to humans: new concepts on airways relative to alveolar surfactant. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30(1), 6-11. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0158TR>
- Bjørnstad, S., Paulsen, R. E., Erichsen, A., Glover, J. C., & Roald, B. (2014). Type I and II pneumocyte differentiation in the developing fetal chicken lung: conservation of pivotal proteins from birds to human in the struggle for life at birth. *Neonatology*, 105(2), 112-120. <https://doi.org/10.1159/000355346>
- Botton, M. L. (2000). Toxicity of cadmium and mercury to horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) embryos and larvae. *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*, 64, 137-143. <https://doi.org/10.1007/s001289910021>

- Braun, C. M., Burgess, J. R., & Latour, M. A. (2001). Liver lipid accumulation in duck embryos and hatchlings change with parental age<sup>1</sup>. *Neonatology*, 80(3), 228-234. <https://doi.org/10.1159/000047148>
- Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2017). Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. *Archives of Toxicology*, 91(1), 63-81. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1803-y>
- Buckingham, M., Meilhac, S., & Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 826-835. <https://doi.org/10.1038/nrg1710>
- Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1663), 20140066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2018). Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*, 218(2), S745-S761. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.577>
- Cardoso, W. V., & Lü, J. (2006). Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*, 133 (9): 1611–1624. <https://doi.org/10.1242/dev.02310>
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389-395. <https://doi.org/10.1038/74651>
- Carvalho, M. C., Nazari, E. M., Farina, M., & Muller, Y. M. (2008). Behavioral, morphological, and biochemical changes after *in ovo* exposure to methylmercury in chicks. *Toxicological Sciences*, 106(1), 180-185. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn158>
- Ceccatelli, S., Bose, R., Edoff, K., Onishchenko, N., & Spulber, S. (2013). Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development. *Journal Of Internal Medicine*, 273(5), 490-497. <https://doi.org/10.1111/joim.12045>
- Cheng, X., Luo, R., Wang, G., Xu, C. J., Feng, X., Yang, R. H., .... & Yang, X. (2015). Effects of 2, 5-hexanedione on angiogenesis and vasculogenesis in chick embryos. *Reproductive Toxicology*, 51, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.12.006>
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., ... & Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 91(10), 3527-3561. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.10.3527>
- Clarkson, T. W., & Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(8), 609-662. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>

- Cleaver, O., & Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nature Medicine*, 9(6), 661-668. <https://doi.org/10.1038/nm0603-661>
- Collardeau-Frachon, S., & Scoazec, J. Y. (2008). Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(6), 614-627. <https://doi.org/10.1002/ar.20679>
- Costa, R. H., Kalinichenko, V. V., & Lim, L. (2001). Transcription factors in mouse lung development and function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(5), L823-L838. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.5.L823>
- Couinaud, C. (1999). Liver anatomy: portal (and suprahepatic) or biliary segmentation. *Digestive Surgery*, 16(6), 459-467. <https://doi.org/10.1159/000018770>
- Coulshed, D. S., & Cowan, J. C. (1991). Contraction-excitation feedback in an ejecting whole heart model—dependence of action potential duration on left ventricular diastolic and systolic pressures. *Cardiovascular Research*, 25(4), 343-352. <https://doi.org/10.1093/cvr/25.4.343>
- Counter, S. A., Buchanan, L. H., & Ortega, F. (2005). Mercury levels in urine and hair of children in an Andean gold-mining settlement. *International Journal Of Occupational And Environmental Health*, 11(2), 132-137. <https://doi.org/10.1179/oeh.2005.11.2.132>
- Culver, J. C., & Dickinson, M. E. (2010). The effects of hemodynamic force on embryonic development. *Microcirculation*, 17(3), 164-178. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2010.00025.x>
- Davidson, P. W., Myers, G. J., Cox, C., Axtell, C., Shamlaye, C., Sloane-Reeves, J., ... & Clarkson, T. W. (1998). Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *Jama*, 280(8), 701-707. <https://doi.org/10.1001/jama.280.8.701>
- DeBofsky, A. R., Klingler, R. H., Mora-Zamorano, F. X., Walz, M., Shepherd, B., Larson, J. K., ... & Carvan III, M. J. (2018). Female reproductive impacts of dietary methylmercury in yellow perch (*Perca flavescens*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 195, 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.029>
- Díaz, D., Krejsa, C. M., White, C. C., Charleston, J. S., & Kavanagh, T. J. (2004). Effect of methylmercury on glutamate-cysteine ligase expression in the placenta and yolk sac during mouse development. *Reproductive Toxicology*, 19(1), 117-129. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.06.006>
- Drake, C. J., & Fleming, P. A. (2000). Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(5), 1671-1679. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.5.1671.005k39> 1671 1679

- Driscoll, C. T., Mason, R. P., Chan, H. M., Jacob, D. J., & Pirrone, N. (2013). Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environmental Science & Technology*, 47(10), 4967-4983. <https://doi.org/10.1021/es305071v>
- Duma, D., Fernandes, D., Bonini, M. G., Stadler, K., Mason, R. P., & Assreuy, J. (2011). NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. *European Journal Of Pharmacology*, 668(1-2), 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.065>
- Feldman, G. L., & Grantham, C. K. (1964). Lipids of the embryonic liver. *Poultry Science*, 43(1), 150-153. <https://doi.org/10.3382/ps.0430150>
- Ferrantini, C., Coppini, R., Pioner, J. M., Gentile, F., Tosi, B., Mazzoni, L., ... & Poggesi, C. (2017). Pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy is mutation rather than disease specific: a comparison of the cardiac troponin T E163R and R92Q mouse models. *Journal of the American Heart Association*, 6(7), e005407. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005407>
- Fish, J. E., & Wythe, J. D. (2015). The molecular regulation of arteriovenous specification and maintenance. *Developmental Dynamics*, 244(3), 391-409. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24252>
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1(1), 27-30. <https://doi.org/10.1038/nm0195-27>
- Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 459, 923-939. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0808-2>
- Förstermann, U., & Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708-1714. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829-837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Fowler, J., Tsui, M. T. K., Chavez, J., Khan, S., Ahmed, H., Smith, L., & Jia, Z. (2021). Methyl mercury triggers endothelial leukocyte adhesion and increases expression of cell adhesion molecules and chemokines. *Experimental Biology and Medicine*, 246(23), 2522-2532. <https://doi.org/10.1177/15353702211033812>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195-4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- Freed, J. K., & Gutterman, D. D. (2013). Mitochondrial reactive oxygen species and vascular function: less is more. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*, 33(4), 673-675. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.13.301039>

- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>
- Furieri, L. B., Galán, M., Avendaño, M. S., García-Redondo, A. B., Aguado, A., Martínez, S., ... & Salices, M. (2011). Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. *British Journal of Pharmacology*, 162(8), 1819-1831. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01203.x>
- Gallego, C., Miralles, M., Marín, C., Muyor, P., González, G., & García-Hidalgo, E. (2004). Congenital hepatic shunts. *Radiographics*, 24(3), 755-772. <https://doi.org/10.1148/rq.243035046>
- Gheorghescu, A. K., Tywoniuk, B., Duess, J., Buchete, N. V., & Thompson, J. (2015). Exposure of chick embryos to cadmium changes the extra-embryonic vascular branching pattern and alters expression of VEGF-A and VEGF-R2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(1), 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.004>
- Gilbert, S. F. (2020) *Developmental Biology*. 12. ed. USA: Sinauer Associates Inc. 666- 668 p.
- Giordano, R. J., Anobom, C. D., Cardó-Vila, M., Kalil, J., Valente, A. P., Pasqualini, R., ... & Arap, W. (2005). Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chemistry & Biology*, 12(10), 1075-1083. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.07.008>
- Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P., Hogg, N., Shiva, S., ... & Lundberg, J. O. (2005). The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology*, 1(6), 308-314. <https://doi.org/10.1038/nchembio1105-308>
- Golub, R., & Cumano, A. (2013). Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules, And Diseases*, 51(4), 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.08.004>
- Gordillo, M., Evans, T., & Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Development*, 142(12), 2094-2108. <https://doi.org/10.1242/dev.114215>
- Gordon, A. M., Homsher, E., & Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews*, 80(2), 853-924. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>
- Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet*, 368(9553), 2167-2178. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69665-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69665-7)
- Grandjean, P., Murata, K., Budtz-Jørgensen, E., & Weihe, P. (2004). Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *The Journal Of Pediatrics*, 144(2), 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.10.058>

- Grandjean, P., White, R. F., Nielsen, A., Cleary, D., & de Oliveira Santos, E. C. (1999). Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. *Environmental Health Perspectives*, 107(7), 587-591. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107587>
- Granger, D. L., Hibbs, J. B., Perfect, J. R., & Durack, D. T. (1990). Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *The Journal Of Clinical Investigation*, 85(1), 264-273. <https://doi.org/10.1172/JCI114422>
- Gribble, M. O., Cheng, A., Berger, R. D., Rosman, L., & Guallar, E. (2015). Mercury exposure and heart rate variability: a systematic review. *Current Environmental Health Reports*, 2, 304-314. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0053-0>
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J. R., & Zaret KS (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes & Development*, 1;10(13):1670-82. <https://doi.org/10.1101/gad.10.13.1670>
- Guidolin, D., Tamma, R., Tortorella, C., Annese, T., Ruggieri, S., Marzullo, A., & Ribatti, D. (2020). Morphometric analysis of the branching of the vascular tree in the chick embryo area vasculosa. *Microvascular Research*, 128, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.103935>
- He, R. R., Li, Y., Li, X. D., Yi, R. N., Wang, X. Y., Tsoi, B., & Kurihara, H. (2013). A new oxidative stress model, 2, 2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride induces cardiovascular damages in chicken embryo. *PloS one*, 8(3), e57732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057732>
- Herbert, S. P., & Stainier, D. Y. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 551-564. <https://doi.org/10.1038/nrm3176>
- Hightower, J. M., O'Hare, A., & Hernandez, G. T. (2006). Blood mercury reporting in NHANES: identifying Asian, Pacific Islander, Native American, and multiracial groups. *Environmental Health Perspectives*, 114(2), 173-175. <https://doi.org/10.1289/ehp.8464>
- Iruela-Arispe, M. L., & Davis, G. E. (2009). Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Developmental Cell*, 16(2), 222-231. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.013>
- Itow, T., Loveland, R. E., & Botton, M. L. (1998). Developmental abnormalities in horseshoe crab embryos caused by exposure to heavy metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 33-40. <https://doi.org/10.1007/s002449900345>
- Jaddoe, V. W., De Jonge, L. L., Hofman, A., Franco, O. H., Steegers, E. A., & Gaillard, R. (2014). First trimester fetal growth restriction and cardiovascular risk factors in school age children: population based cohort study. *Bmj*, 348. <https://doi.org/10.1136/bmj.g14>

- Jia, J., Qian, C., Dong, Y., Li, Y. F., Wang, H., Ghossoub, M., ... & Ozin, G. A. (2017). Heterogeneous catalytic hydrogenation of CO<sub>2</sub> by metal oxides: defect engineering—perfecting imperfection. *Chemical Society Reviews*, 46(15), 4631-4644. <https://doi.org/10.1039/C7CS00026J>
- Jozsa, L., & Reffy, A. (1975). Light and electron microscopic studies of the pulmonary alveolar surfactant. *Acta Histochemica*, 53(1), 58-69.
- Juncos, J. X. M., Shakil, S., Bradley, W. E., Wei, C. C., Zafar, I., Powell, P., ... & Ahmad, S. (2021). Chronic heart structural damage, diastolic and systolic dysfunction following acute myocardial injury due to bromine exposure in rats. *Archives of Toxicology*, 95, 179-193. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02919-8>
- Jungermann, K., & Katz, N. (1982). Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology*, 2(3), 385S-395S.
- Jungermann, K., & Katz, N. (1989). Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological Reviews*, 69(3), 708-764. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.708>
- Khadangi, A., Hanssen, E., & Rajagopal, V. (2019). Automated segmentation of cardiomyocyte Z-disks from high-throughput scanning electron microscopy data. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 19(6), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12911-019-0962-1>
- Kingsbury, J. W., Alexanderson, M., & Kornstein, E. S. (1956). The development of the liver in the chick. *The Anatomical Record*, 124(2), 165-187. <https://doi.org/10.1002/ar.1091240204>
- Knook, D. L., Blansjaar, N., & Sleyster, E. C. (1977). Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from the rat liver. *Experimental Cell Research*, 109(2), 317-329. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90011-8)
- Kotton, D. N., & Morrissey, E. E. (2014). Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nature Medicine*, 20(8), 822-832. <https://doi.org/10.1038/nm.3642>
- Kraus, M. L., Weis, J. S., & Weis, P. (1988). Effects of mercury on larval and adult grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, 17, 355-363. <https://doi.org/10.1007/BF01055173>
- Lavine, K. J., & Ornitz, D. M. (2009). Shared circuitry: developmental signaling cascades regulate both embryonic and adult coronary vasculature. *Circulation Research*, 104(2), 159-169. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.191239>
- Lee, J. Y., Ji, H. S., & Lee, S. J. (2007). Micro-PIV measurements of blood flow in extraembryonic blood vessels of chicken embryos. *Physiological Measurement*, 28(10), 1149. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/10/002>
- Leland, S.E., Straeter, P.A., & Gnad, B.J. (2019). The role of the IACUC in the absence of regulatory guidance. *ILAR Journal*, 60, 95–104. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilz003>

- Lindsey, S. E., Butcher, J. T., & Yalcin, H. C. (2014). Mechanical regulation of cardiac development. *Frontiers in Physiology*, 21;5:318. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00318>
- Liu, S., Tsui, M. T. K., Lee, E., Fowler, J., & Jia, Z. (2020). Uptake, efflux, and toxicity of inorganic and methyl mercury in the endothelial cells (EA. hy926). *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66444-5>
- Maltepe, E., & Celeste Simon, M. (1998). Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. *Journal Of Molecular Medicine*, 76, 391-401. <https://doi.org/10.1007/s001090050231>
- Martin, M., Osborn, K. E., Billig, P., & Glickstein, N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 12(9), 305-308. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(81\)90081-3](https://doi.org/10.1016/0025-326X(81)90081-3)
- Marziano, C., Genet, G., & Hirschi, K. K. (2021). Vascular endothelial cell specification in health and disease. *Angiogenesis*, 24(2), 213-236. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09785-7>
- Mavrides, E., Moscoso, G., Carvalho, J. S., Campbell, S., & Thilaganathan, B. (2001). The anatomy of the umbilical, portal and hepatic venous systems in the human fetus at 14–19 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 18(6), 598-604. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7692.2001.00581.x>
- Mazerik, J. N., Hagele, T., Sherwani, S., Ciapala, V., Butler, S., Kuppusamy, M. L., ... & Parinandi, N. L. (2007). Phospholipase A2 activation regulates cytotoxicity of methylmercury in vascular endothelial cells. *International Journal Of Toxicology*, 26(6), 553-569. <https://doi.org/10.1080/10915810701707759>
- McElwee, M. K., & Freedman, J. H. (2011). Comparative toxicology of mercurials in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 30(9), 2135-2141. <https://doi.org/10.1002/etc.603>
- Mellouk, N., Ramé, C., Delaveau, J., Rat, C., Maurer, E., Froment, P., & Dupont, J. (2018). Adipokines expression profile in liver, adipose tissue and muscle during chicken embryo development. *General and Comparative Endocrinology*, 267, 146-156. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.06.016>
- Miot, H. A. (2011). Sample size in clinical and experimental trials. *Jornal Vascular Brasileiro*, 10, 275-278. <https://doi.org/10.1590/S1677-54492011000400001>
- Morales-Ruiz, M., Santel, A., Ribera, J., & Jiménez, W. (2017). The role of Akt in chronic liver disease and liver regeneration. In *Seminars in Liver Disease* (Vol. 58, No. 01, pp. 011-016). Thieme Medical Publishers. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597819>

- Mortensen, M. E., Caudill, S. P., Caldwell, K. L., Ward, C. D., & Jones, R. L. (2014). Total and methyl mercury in whole blood measured for the first time in the US population: NHANES 2011–2012. *Environmental Research*, 134, 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.019>
- Nolan, D. J., Ginsberg, M., Israely, E., Palikuqi, B., Poulos, M. G., James, D., ... & Rafii, S. (2013). Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Developmental Cell*, 26(2), 204-219. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.017>
- Obi, E., Okafor, C., Igwebe, A., Ebenebe, J., Afonne, O. J., Ifediata, F., ... & Basu, N. (2015). Elevated prenatal methylmercury exposure in Nigeria: evidence from maternal and cord blood. *Chemosphere*, 119, 485-489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.038>
- Odland, H. K., Johnsen, S. L., Rasmussen, S., Trae, G., Reistad, H. M., & Kiserud, T. (2019). The human yolk sac size reflects involvement in embryonic and fetal growth regulation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 98(2), 176-182. <https://doi.org/10.1111/aogs.13466>
- Orgeig, S., Daniels, C. B., & Sullivan, L. C. (2004). Development of the pulmonary surfactant system. *In The Lung. Academic Press*. 149-167. <https://doi.org/10.1016/B978-012324751-3/50044-9>
- Ou, L., Chen, C., Chen, L., Wang, H., Yang, T., Xie, H., ... & Wang, X. (2015). Low-level prenatal mercury exposure in north China: an exploratory study of anthropometric effects. *Environmental Science & Technology*, 49(11), 6899-6908. <https://doi.org/10.1021/es5055868>
- Ovalle, W. K., & Nahirney, P. C. (2008). *Netter Bases da Histologia*. Elsevier Brasil.
- Paik, D. T., Tian, L., Williams, I. M., Rhee, S., Zhang, H., Liu, C., ... & Wu, J. C. (2020). Single-cell RNA sequencing unveils unique transcriptomic signatures of organ-specific endothelial cells. *Circulation*, 142(19), 1848-1862. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041433>
- Passos, C. J., & Mergler, D. (2008). Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cadernos de Saúde Pública*, 24, s503-s520.
- Pedrero Zayas, Z., Ouerdane, L., Mounicou, S., Lobinski, R., Monperrus, M., & Amouroux, D. (2014). Hemoglobin as a major binding protein for methylmercury in white-sided dolphin liver. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 406, 1121-1129. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7274-6>
- Pi, X., Xie, L., & Patterson, C. (2018). Emerging roles of vascular endothelium in metabolic homeostasis. *Circulation Research*, 123(4), 477-494. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313237>
- Plasswilm, L., Höper, J., Cordes, N., & Tannapfel, A. (1999). Investigation of microvessel density after irradiation. *Radiation Research*, 151(4), 454-460. <https://doi.org/10.2307/3579833>

- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 803-815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Potente, M., & Carmeliet, P. (2017). The link between angiogenesis and endothelial metabolism. *Annual Review Of Physiology*, 79, 43-66. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105134>
- Pulikanti, R., Peebles, E. D., Keirs, R. W., Bennett, L. W., Keralapurath, M. M., & Gerard, P. D. (2010). Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation<sup>1</sup>. *Poultry Science*, 89(5), 860-865. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00531>
- Qiu, Q., Huang, Y., Zhang, B., Huang, D., Chen, X., Fan, Z., ... & Zhao, Q. (2022). Noninvasive dual-modality photoacoustic-ultrasonic imaging to detect mammalian embryo abnormalities after prenatal exposure to methylmercury chloride (MMC): a mouse study. *Environmental Health Perspectives*, 130(2), 027002. <https://doi.org/10.1289/EHP8907>
- Rand, M. D., Dao, J. C., & Clason, T. A. (2009). Methylmercury disruption of embryonic neural development in *Drosophila*. *Neurotoxicology*, 30(5), 794-802. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.04.006>
- Rauen, U., Li, T., Ioannidis, I., & de Groot, H. (2007). Nitric oxide increases toxicity of hydrogen peroxide against rat liver endothelial cells and hepatocytes by inhibition of hydrogen peroxide degradation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(4), C1440-C1449. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00366.2006>
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I. L., & Krasnow, M. A. (2010). Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*, 464(7288), 549-553. <https://doi.org/10.1038/nature08873>
- Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 11(1), 73-91. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.000445>
- Ronconi-Krüger, N., Pinheiro, J., Simioni, C., & Nazari, E. M. (2022). Methylmercury toxicity during heart development: A combined analysis of morphological and functional parameters. *Cardiovascular Toxicology*, 22(12), 962-970. <https://doi.org/10.1007/s12012-022-09772-4>
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Rustom, N. Y., & Reynolds, J. N. (2024). Developmental exposure to methylmercury alters GAD67 immunoreactivity and morphology of endothelial cells and capillaries of midbrain and hindbrain regions of adult rat offspring. *Neurotoxicology and Teratology*, 101, 107320. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2024.107320>

- Rusu, M., Hu, Z., Taylor, K. A., & Trinick, J. (2017). Structure of isolated Z-disks from honeybee flight muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 38, 241-250. <https://doi.org/10.1007/s10974-017-9477-5>
- Samson, J. C., & Shenker, J. (2000). The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 48(2-3), 343-354. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(99\)00044-2](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(99)00044-2)
- Sandoo, A., Van Zanten, J. J. V., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4, 302. <https://doi.org/10.2174/1874192401004010302>
- Sehgal, A., & Menahem, S. (2013). Evaluation of the coronary arteries in the foetus and newborn and their physiologic significance. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(10), 1042-1047. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.766704>
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Silverthorn, D. U. (2017). *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. Artmed editora.
- Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(10), 611-625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>
- Sitia, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., & Turiel, M. (2010). From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 9(12), 830-834. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.07.016>
- Solaro, R. J., & Rarick, H. M. (1998). Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circulation Research*, 83(5), 471-480. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.5.471>
- Sørensen, R., Meili, M., Lambertsson, L., von Brömssen, C., & Bishop, K. (2009). The effects of forest harvest operations on mercury and methylmercury in two boreal streams: relatively small changes in the first two years prior to site preparation. *AMBIO: A Journal Of The Human Environment*, 38(7), 364-372.
- Stabellini, G., Locci, P., Calvitti, M., Evangelisti, R., Marinucci, L., Bodo, M., & Carinci, P. (2001). Epithelial-mesenchymal interactions and lung branching morphogenesis. Role of polyamines and transforming growth factor  $\beta$ 1. *European Journal of Histochemistry*, 45(2), 152-62. <https://doi.org/10.4081/1625>
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial cells. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, 71-91. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_4)
- Sukra, Y., Sastrohadinoto, S., Js, H. H., & Bird, H. R. (1976). Effect of selenium and mercury on survival of chick embryos. *Poultry Science*, 55(4), 1423-1428. <https://doi.org/10.3382/ps.0551423>

- Sumpio, B. E., Riley, J. T., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(12), 1508-1512. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00075-4](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00075-4)
- Syversen, T., & Kaur, P. (2012). The toxicology of mercury and its compounds. *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology*, 26(4), 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.02.004>
- Tabas, I., García-Cardena, G., & Owens, G. K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *Journal of Cell Biology*, 209(1), 13-22. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412052>
- Takahashi, T., & Shimohata, T. (2019). Vascular dysfunction induced by mercury exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2435. <https://doi.org/10.3390/ijms20102435>
- Tian, X., Hu, T., Zhang, H., He, L., Huang, X., Liu, Q., ... & Zhou, B. (2013). Subepicardial endothelial cells invade the embryonic ventricle wall to form coronary arteries. *Cell Research*, 1075-90. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.94>
- Tomanek, R. J. (2005). Formation of the coronary vasculature during development. *Angiogenesis*, 8(3), 273-284. <https://doi.org/10.1007/s10456-005-9014-9>
- Tufan, A. C., & Satiroglu-Tufan, N. L. (2003). The effect of ethanol exposure on extraembryonic vascular development in the chick area vasculosa. *Cells Tissues Organs*, 175(2), 84-97. <https://doi.org/10.1159/000073752>
- Wells, E. M., Herbstman, J. B., Lin, Y. H., Jarrett, J., Verdon, C. P., Ward, C., ... & Goldman, L. R. (2016). Cord blood methylmercury and fetal growth outcomes in Baltimore newborns: potential confounding and effect modification by omega-3 fatty acids, selenium, and sex. *Environmental Health Perspectives*, 124(3), 373-379. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408596>
- Whitsett, J. A., & Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature Immunology*, 16(1), 27-35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>
- Wu, B., Zhang, Z., Lui, W., Chen, X., Wang, Y., Chamberlain, A. A., ... & Zhou, B. (2012). Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell*, 151(5), 1083-1096. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.023>
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. (2020). Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*, 245, 125586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586>
- Yorifuji, T., Tsuda, T., Kashima, S., Takao, S., & Harada, M. (2010). Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata. *Environmental Research*, 110(1), 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.10.011>

- Yu, M. S., Eng, M. L., Williams, T. D., Basu, N., & Elliott, J. E. (2016). Acute embryotoxic effects but no long-term reproductive effects of *in ovo* methylmercury exposure in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(6), 1534-1540. <https://doi.org/10.1002/etc.3307>
- Yutzey, K. E., Gannon, M., & Bader, D. (1995). Diversification of cardiomyogenic cell lineages *in vitro*. *Developmental Biology*, 170(2), 531-541. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1234>
- Zacharias, W. J., Frank, D. B., Zepp, J. A., Morley, M. P., Alkhaleel, F. A., Kong, J., ... & Morrissey, E. E. (2018). Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor. *Nature*, 555(7695), 251-255. <https://doi.org/10.1038/nature25786>
- Zheng, Z., Xu, X., Zhang, X., Wang, A., Zhang, C., Hüttemann, M., ... & Zhang, K. (2013). Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model. *Journal of Hepatology*, 58(1), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.009>
- Zorn, A. M. (2008). Liver development. *Stembook, Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute*. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.25.1>

## APÊNDICE A.

Estrutura	Categoria	Diâmetro
Vasos Extraembrionários	VEPC (Vasos Extraembrionários de Pequeno Calibre)	0,090 - 0,199 mm
	VEMC (Vasos Extraembrionários de Médio Calibre)	0,200 - 0,699 mm
	VEGC (Vasos Extraembrionários de Grande Calibre)	0,700 - 1,300 mm
Artérias do Coração	APC (Artéria de Pequeno Calibre)	1 - 25 $\mu\text{m}$
	AMC (Artéria de Médio Calibre)	26 - 51 $\mu\text{m}$
	AGC (Artéria de Grande Calibre)	52 - 77 $\mu\text{m}$
Veias do Coração	VPC (Veia de Pequeno Calibre)	1 - 30 $\mu\text{m}$
	VMC (Veia de Médio Calibre)	31 - 61 $\mu\text{m}$
	VGC (Veia de Grande Calibre)	62 - 91 $\mu\text{m}$
Vasos do Fígado	Classe 1	0 - 29 $\mu\text{m}$
	Classe 2	30 - 59 $\mu\text{m}$
	Classe 3	60 - 89 $\mu\text{m}$
	Classe 4	90 - 119 $\mu\text{m}$
	Classe 5	120 - 149 $\mu\text{m}$
Vasos do Pulmão	Classe 1	0 - 29 $\mu\text{m}$
	Classe 2	30 - 59 $\mu\text{m}$
Brônquios	Parabrônquios	0 - 15 $\mu\text{m}$
	Brônquio secundário	16 - 31 $\mu\text{m}$
	Brônquio primário	32 - 60 $\mu\text{m}$

## APÊNDICE B.

## Methylmercury Toxicity During Heart Development: A Combined Analysis of Morphological and Functional Parameters

(Published on November 9, 2022 in the *Journal of Cardiovascular Toxicology*, ISSN 1559-0259, Impact Factor 3.18/2022, Qualis/CAPES A2 - Doi: 10.1007/s12012-022-09772-4).

*Cardiovascular Toxicology* (2022) 22:962–970  
<https://doi.org/10.1007/s12012-022-09772-4>



### Methylmercury Toxicity During Heart Development: A Combined Analysis of Morphological and Functional Parameters

Nathália Ronconi-Krüger<sup>1</sup> · Jacqueline Pinheiro<sup>1</sup> · Carmen Simioni<sup>1</sup> · Evelise Maria Nazari<sup>1</sup>

Received: 22 July 2022 / Accepted: 27 October 2022 / Published online: 9 November 2022  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

#### Abstract

The heart of higher vertebrates develops early as a tubular structure, which requires cellular and molecular events for proliferation, differentiation and apoptosis for growth, and individualization of cardiac chambers. Exposure to different stressors can cause disturbances in the normal development and functionality of the cardiovascular system. This study aimed to characterize the impact of methylmercury (MeHg) on heart development, specifically related to tissue morphology and parameters of vascular integrity and contractility, also focusing on cell cycle and apoptosis, using *Gallus domesticus* embryos as a model. The results showed morphological alterations, reduction in the thickness of the ventricular walls, and trabeculae changes in the hearts of embryos exposed to 0.1 µg MeHg/50 µL saline solution. These impacts were associated with increased contents of proteins related to cell cycle arrest and reduced cardiomyocyte proliferation. In addition, the contents of endothelial mediators for contractility and vascular integrity were imbalanced. The quantity and morphology of mitochondria of cardiomyocytes were injured. Together, these negative measurements impacted the reduction of heartbeats. In general, the parameters identified here demonstrate the relevance of combined molecular cellular tissue and physiological diagnosis for a better understanding of the cardiotoxicity of MeHg during development.

**Keywords** Embryo · Heartbeat · Ventricular walls and trabeculae · Cell cycle and apoptosis · Mitochondria · Embryotoxicity

#### Introduction

Mercury (Hg) cardiotoxicity in adults and children has been well documented, and the main reports are changes in blood pressure, myocardial infarction, coronary dysfunction, and atherosclerosis [1–3]. Methylmercury (MeHg) is the most toxic form of Hg available in the environment [4, 5] and its effects are also well documented [6–9]. However, the impact of exposure to MeHg on embryonic development and, more specifically, on the cardiovascular system remains unclear [10, 11].

During the embryonic development of higher vertebrates, the heart begins as a tubular structure with a single chamber,

which will gradually organize itself into a four-chambered organ [12]. For the individualization of cardiac chambers, cellular events such as proliferation, differentiation, and apoptosis are necessary to organize septa, foramina, and trabeculae [13–16]. Considering that the heart is the first functional organ during development with high energy demand, pump function needs to be acquired quickly to supply blood flow and oxygen to other developing organs [17, 18]. For this, additional cellular and molecular elements are needed.

In this context, mitochondria are essential organelles for providing energy for the contractile role of cardiomyocytes necessary for the heart pump [19]. However, the same cellular and molecular events involved in normal cardiovascular morphophysiology are disrupted in some pathologies of this system. Mitochondrial dysfunction is involved in the progression of major heart diseases, such as heart failure [20]. When mitochondria are disrupted, the regulation of multiple cellular events is also affected. In cardiomyopathies, several molecules, such as p53, are impaired and lead to the arrest of the cardiomyocyte cell cycle [21]. Cell proliferation is still important in cardiac

Handling Editor: Vittorio Fineschi.

✉ Evelise Maria Nazari  
 evelise.nazari@ufsc.br

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil