

NATHÁLIA RONCONI ZILLI KRÜGER

**TOXICIDADE DO METILMERCÚRIO NAS CÉLULAS DO
CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina BIO7016 como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

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

Florianópolis

2017

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

Krüger, Nathália Ronconi Zilli
TOXICIDADE DO METILMERCÚRIO NAS CÉLULAS DO CORAÇÃO
DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus* / Nathália Ronconi
Zilli Krüger ; orientadora, Evelise Maria Nazari ,
2017.
57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Embriotoxicidade. 3.
MeHg. 4. Desenvolvimento. 5. Ventriculos cardíacos.
I. , Evelise Maria Nazari. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

NATHÁLIA RONCONI ZILLI KRÜGER

**TOXICIDADE DO METILMERCÚRIO NAS CÉLULAS DO
CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus***

Este Trabalho de Conclusão de curso foi avaliado e considerado **Aprovado** para obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas, em sua forma final pela Banca Examinadora.

Florianópolis, 17 de novembro de 2017.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari
Universidade Federal de Santa Catarina
Presidente

Prof^a. Dr^a. Patrícia de Souza Brocardo
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Titular

MSc. Manuela Sozo Cecchini
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Manuella Pinto Kaster
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Suplente

À minha família, minha fonte de inspiração nos momentos difíceis, por todo apoio e paciência ao longo dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de ter frequentado um dos melhores cursos de Ciências Biológicas do País, pela estrutura do Centro de Ciências Biológicas e por todos os recursos utilizados durante a graduação.

Aos professores da graduação, que sempre estavam preparados para dar suas aulas, mesmo com todo o cansaço do dia-a-dia, obrigada pelo conhecimento compartilhado.

À Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari, referencia em minha vida acadêmica e profissional, por ter me abraçado como monitora da disciplina de Embriologia e Desenvolvimento, e me acolhido em seu grupo de pesquisas no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA). Por me apoiar e me desafiar, acreditando sempre no meu potencial e por toda a dedicação durante a orientação deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Yara Maria Rauh Müller, por todo o conhecimento como professora e como pesquisadora. Obrigada pela experiência da monitoria e pela parceria durante todo o caminho.

Ao grupo do LRDA, por todas as experiências trocadas, por todo o apoio, e eu não poderia estar em outro grupo de pesquisas. Em especial à Dr^a. Cláudia Almeida Coelho de Albuquerque, pelo apoio e principalmente pelo tratamento dos embriões, e à minha parceira de coração, Maria Luiza, que compartilhou comigo momentos de angústia durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), por todo suporte e em especial a Dr^a. Chirle, que sempre tirou minhas dúvidas durante as análises.

Aos meus colegas de curso, obrigada pelo apoio e aos amigos que fiz nele, Cláudia, com quem eu quero ter contato para toda a vida, Julliane, minha parceira de estágio com quem dividi as experiências mais intensas da docência.

À minha mãe, Karin, minha luz nos momentos difíceis, meu ponto de referencia no mundo, obrigada por toda luta durante a minha educação. Te agradeço por cada palavra de conforto e incentivo.

Ao meu pai, Gerson, meu motivo de persistência durante todos esses anos longe de casa.

Ao meu segundo pai, Caio, que sempre esteve perto e me incentivou.

Aos meus avós, Sueli (*in memorian*), Eliseu (*in memorian*), com quem eu lembro de ter conhecido a vida, o respeito e dedicação a

uma família linda. À Angelina e Olívio, meus avós paternos, que me presentearam com uma educação de qualidade e que sempre estavam dispostos a fazer parte dela de algum modo. Lia e Severiano (*in memorian*), muito obrigada pelo acolhimento e por todo o amor que vocês me mostraram ser possível sentir por alguém que não tem o mesmo sangue.

Aos meus irmãos Gabriel e Marx, agradeço por cada abraço e carinho durante nossa vida.

Ao meu noivo, Francisco Junior, que esteve do meu lado me apoiando desde o início da graduação, obrigada por sempre acreditar em mim.

Aos meus sogros Francisco e Neide, que me abraçaram em uma família cheia de afeto e a minha cunhada Luciane, por sempre ter uma palavra de conforto e ainda me presentear com dois sobrinhos, Lívia e Lucas.

Às minhas amigas da vida, Pamela e Karoline, obrigada por cada parte da minha história.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho, e me ajudaram ao longo deste período, muito obrigada!

“Felicidade se acha é em horinhas de descuido”.

Guimarães Rosa

RESUMO

A toxicidade causada pelo metilmercúrio (MeHg) é bem documentada, principalmente em relação a sua neurotoxicidade. No entanto, a toxicidade do MeHg no coração em desenvolvimento não é totalmente compreendida. Assim, neste estudo investigamos o efeito de MeHg no coração, utilizando embrião de *Gallus domesticus* como organismo-modelo. Embriões no 3º dia embrionário (E3) foram tratados *in ovo* com 0.1 µg MeHg/50µL de solução salina e analisados no 10º dia embrionário (E10) (aprovado Comitê de Ética 355/CEUA e 23080.025620/2009-51/UFSC). Secções frontais (6 µm) do coração foram preparadas em lâminas histológicas e coradas com Hematoxilina-Eosina, para as análises morfológicas e morfométricas. Imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-fosfohistona H3 foi realizada para a identificação das células em proliferação. Após o tratamento com MeHg, observamos diminuição significativa no número de células em proliferação e aumento significativo na espessura da parede do ventrículo direito. Um número significativamente reduzido de células TUNEL-positivas, as quais indicam a morte celular por apoptose, foi observado nas paredes dos ventrículos direito e esquerdo, em embriões tratados com MeHg. Estes resultados mostram que o tratamento *in ovo* com MeHg afeta a proliferação e a morte celular por apoptose, podendo comprometer o desenvolvimento do coração.

Palavras-chave: embriotoxicidade, MeHg, desenvolvimento, ventrículos cardíacos, proliferação celular, morte celular.

ABSTRACT

Toxicity caused by methylmercury (MeHg) is a well-documented, especially the neurotoxicity. However, the toxicity of MeHg in the developing heart is not fully understood. Thus, in this study we investigated the effect of MeHg on the heart, using *Gallus domesticus* embryo, as model organism. Embryos at third embryonic day (E3) were treated *in ovo* with 0.1 μg MeHg/50 μL saline solution and analyzed at tenth embryonic day (E10) (approval Ethic Committee 355/CEUA e 23080.025620/2009-51/UFSC). The frontal sections (6 μm) of the heart were prepared on histological slides and stained with Hematoxylin-Eosin for morphological and morphometric analyses. Immunohistochemistry using anti-phospho histone H3 antibody was performed to identify proliferating cells. After treatment with MeHg, we observed a significant decrease in the number of proliferating cells and a significant increase in wall thickness of the right ventricle. A significantly reduced number of TUNEL-positive cells, which indicated apoptotic cell death, was observed in the left and right ventricles of MeHg-treated embryos. These results show that *in ovo* MeHg treatment affect cell proliferation and death by apoptosis, which could compromise the development of the heart.

Keywords: embryotoxicity, MeHg, development, heart ventricles, cell proliferation, cell death.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO DO MERCÚRIO NOS AMBIENTES NATURAIS.....	20
FIGURA 2. DESENVOLVIMENTO DO CORAÇÃO DE <i>G. DOMESTICUS</i>	23
FIGURA 3. OVOS E EMBRIÕES DE <i>G. DOMESTICUS</i>	28
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO CORAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO.....	31
FIGURA 5. MICROGRAFIA DO TECIDO CARDÍACO COM SOBREPOSIÇÃO DA IMAGEM DA GRATÍCULA DE WEIBEL.....	32
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CORAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO.....	34
FIGURA 7. VISTA FRONTAL DO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G.</i> <i>DOMESTICUS</i> EM E10, CORADO COM HE.....	36
FIGURA 8. ESPESSURA MÉDIA DA PAREDE DOS VENTRÍCULOS DO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. DOMESTICUS</i> EM E10 DOS GRUPOS CONTROLE E TRATADOS COM MEHG.....	37
FIGURA 9. DIÂMETRO MÉDIO DAS CÉLULAS DAS PAREDES DOS VENTRÍCULOS DIREITO E ESQUERDO DO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. DOMESTICUS</i> EM E10 DOS GRUPOS CONTROLE E TRATADOS COM MEHG.....	40
FIGURA 10. ESPAÇAMENTO MÉDIO ENTRE AS CÉLULAS DAS PAREDES DOS VENTRÍCULOS DIREITO E ESQUERDO DO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. DOMESTICUS</i> EM E10 DOS GRUPOS CONTROLE E TRATADOS COM MEHG.....	41
FIGURA 11. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR IMUNO- HISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTICORPO ANTI-PHH3 NO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. DOMESTICUS</i> EM E10.....	43
FIGURA 12. CORTES FRONTAIS DO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G.</i> <i>DOMESTICUS</i> EM E10, SUBMETIDOS À TÉCNICA DE TUNEL.....	466

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Átrio Direito
AE	Átrio Esquerdo
DAB	3,3'Diaminobenzidina
E	Dia Embrionário
HE	Hematoxilina-Eosina
HH	Hamburger e Hamilton
Hg ⁰	Mercúrio Metálico
Hg ⁺	Íon Inorgânico de Mercúrio
Hg ²⁺	Íon Inorgânico de Mercúrio
MeHg	Metilmercúrio
N	Tamanho Amostral
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PHH3	Fosfohistona H3, do inglês <i>phospho histone h3</i>
SAV	Septo Atrioventricular
SIA	Septo Interatrial
SIV	Septo Interventricular
T	Trabécula
TUNEL	<i>Terminal Transferase dutp Nick end Labeling</i>
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CARACTERÍSTICAS E TOXICIDADE DO MeHg	19
1.2 ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO DO CORAÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	27
3.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
3.3 PROCESSAMENTO DO CORAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ	29
3.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DO CORAÇÃO	29
3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS VENTRÍCULOS	30
3.6 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	31
3.7 ANÁLISE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS PELO MÉTODO DE TUNEL	33
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 EFEITO DO MeHg SOBRE A ORGANIZAÇÃO DAS PAREDES DAS CÂMARAS CARDÍACAS	35
4.2 EFEITO DO MeHg SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR	42
4.3 EFEITO DO MeHg SOBRE A APOPTOSE	44
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O mercúrio é um metal que se apresenta de três formas principais, o mercúrio metálico (Hg_0), íons inorgânicos (Hg^+ e Hg^{2+}) e o mercúrio orgânico (etilmercúrio e metilmercúrio), as quais diferem quanto à sua toxicocinética, bem como distribuição, acumulação e ciclagem no ambiente (FRIBERG e MOTTET, 1988; WIENER et al., 2003; SYVERSEN e KAUR, 2012; DUAN et al., 2016). Dentre as formas orgânicas, o metilmercúrio (MeHg) é normalmente encontrado na natureza, devido a metilação de bactérias sulforredutoras (MOREL et al., 1998; ACHÁ et al., 2011). O MeHg é a forma mais tóxica do mercúrio orgânico, podendo ser responsável por danos morfológicos, comportamentais e metabólicos nos indivíduos expostos (MEGLER et al., 2007; DUAN et al., 2016; TAKAHASHI et al., 2017).

Assim, considerando os diferentes impactos do MeHg sobre os organismos, o presente Trabalho de Conclusão de Curso teve como foco de estudo a toxicidade do MeHg sobre os processos de proliferação e apoptose nas células cardíacas, bem como sobre a morfologia do coração e a morfometria das paredes ventriculares, utilizando embriões de galinha doméstica (*Gallus domesticus*) como organismo de estudo.

1.1 CARACTERÍSTICAS E TOXICIDADE DO MEHG

O mercúrio é um metal inodoro e volátil, que em seu estado elementar apresenta-se como um líquido branco-prateado. As fontes naturais de emissões de mercúrio são vulcões, sedimentos oceânicos e incêndios florestais (Figura 1) (ASCHNER e ASCHNER, 1990; MOREL et al., 1998; ATKINS e JONES, 2012).

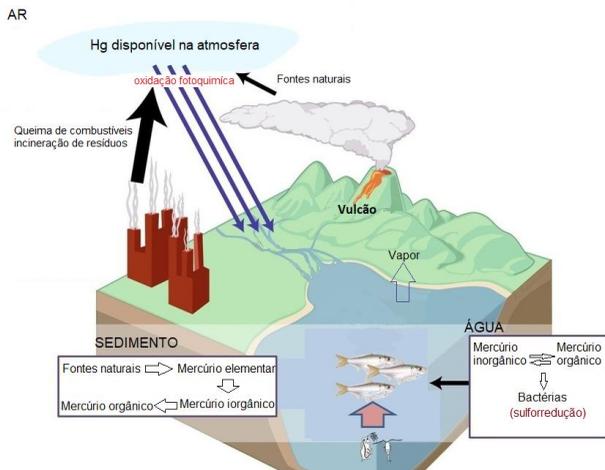


Figura 1. Ciclo do mercúrio nos ambientes naturais.

Fonte: modificado de Texas Christian University Aquatic Ecology (<http://www.aquaticecologylab.tcu.edu/>).

Com a metilação por microorganismos, o MeHg se torna altamente disponível, e devido à sua meia-vida relativamente longa nos tecidos biológicos, há uma considerável bioacumulação, sendo este um dos motivos que causa preocupação acerca da contaminação e toxicidade dessa forma de mercúrio orgânico (CHENG et al., 2013).

A toxicidade do MeHg ficou conhecida no contexto mundial pelos acidentes ambientais no Japão e Iraque. No acidente ocorrido no Japão, houve contaminação de peixes com resíduos industriais que continham MeHg, já no acidente no Iraque houve contaminação de sementes por fungicidas a base de mercúrio. Em ambos, foram relatados em adultos, crianças e recém-nascidos sintomas como náuseas, problemas motores e sensoriais (SAKAMOTO et al., 2002).

No Brasil, em novembro de 2015 aconteceu o rompimento da barragem de minério de Fundão, que atingiu diferentes localidades do

estado de Minas Gerais. A mineradora classificou como “não perigoso” os 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério de ferro liberados durante o acidente. Porém, o Laudo Técnico Preliminar do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, ressalta que, além da exploração de minério de ferro pela empresa responsável, a região é marcada pela presença de garimpo de ouro desenvolvido ao longo de séculos, e, embora grande parte esteja desativada, a atividade ainda é observada no Rio do Carmo, atingido pela lama de rejeito (IBAMA, 2015). Cabe ressaltar que a força feita pela passagem da lama, colocou sedimentos contaminados em suspensão contribuindo para o aumento da concentração de metais pesados, como o mercúrio. A detecção destes metais por exemplo, chegou a um nível 1465 vezes maior que o previsto pela legislação, segundo a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 396, que permite para o consumo humano $1\mu\text{g/L}$ Hg, o que causou risco ao abastecimento de água, impactos ambientais a curto e médio prazo, mas seus efeitos ainda serão apresentados ao decorrer do tempo, incluindo o risco à saúde pública da região, que é em sua maioria de ribeirinhos que costumam pescar o próprio alimento (FREITAS et al., 2016).

A toxicidade do MeHg é amplamente estudada no sistema nervoso central (SNC) e há um crescente corpo de evidências epidemiológicas, que indica que o sistema cardiovascular também esteja envolvido com a toxicidade induzida por este metal, sugerindo que a exposição pré-natal ao MeHg, afeta a homeostase do desenvolvimento do coração (SORENSEN et al., 1999; ROMAN et al., 2011; MOREIRA et al., 2012; GHIZONI et al., 2017). Além disso, também têm sido analisados os mecanismos envolvidos na estrutura celular e molecular

dos tecidos e órgãos embrionários quando expostos ao MeHg (PATEL e REYNOLDS, 2013; HUYCK et al., 2015). Trabalhos experimentais evidenciaram que o MeHg, mesmo em pequenas concentrações (3 μM) por 24 horas, afeta os processos básicos para a formação do SNC, como proliferação celular, diferenciação celular e apoptose (CRESPO-LOPEZ et al., 2009; XU et al., 2010; HE et al., 2012; MÜLLER et al., 2012).

1.2 ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO DO CORAÇÃO

O desenvolvimento do coração tem sido descrito em diferentes modelos animais como roedores, aves, anfíbios e peixes, sendo reconhecidas inúmeras semelhanças na formação do coração e dos vasos sanguíneos em embriões de vertebrados (RUIJTENBEEK e DE MEY, 2002; TUTAREL et al., 2005). Especificamente em embriões de aves, o sistema cardiovascular tem sido descrito desde a década de 1930, por meio da utilização de diferentes ferramentas metodológicas (GARCIA-MARTINEZ e SCHOENWOLF, 1993). O coração em desenvolvimento é inicialmente uma estrutura tubular de origem mesodérmica, denominada tubo cardíaco primitivo, que através de eventos celulares será organizado como um órgão com quatro cavidades em aves e mamíferos (YUTZEY et al., 1995; NAIEB et al., 2013; LINDSEY et al., 2014).

Em aves e mamíferos, o tubo cardíaco primitivo é composto pelo endocárdio, localizado mais internamente; pela geleia cardíaca, que dará origem aos coxins endocárdicos, as valvas e os septos; pelo miocárdio, que dará origem às células musculares cardíacas, as quais estarão presentes nas paredes dos átrios e ventrículos (com rede de trabéculas no lado luminal); e pelo epicárdio, que dará origem as fibras

musculares lisas e aos vasos coronarianos (Figura 2) (GARCIA-MARTINEZ e SCHOENWOLF, 1993; SEDMERA e MCQUINN, 2008; SADLER, 2010).

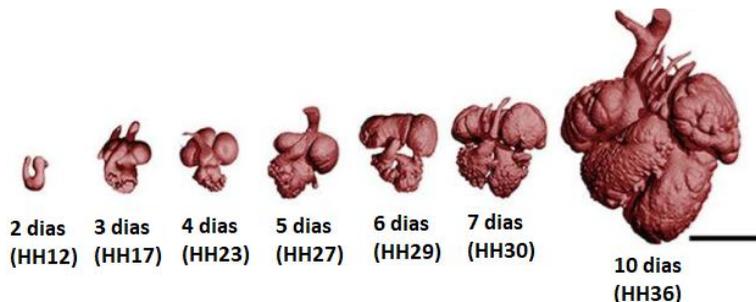


Figura 2. Desenvolvimento do coração de *G. domesticus*, ao longo dos dias de incubação e estágios HH correspondentes, conforme proposto por HAMBURGER e HAMILTON (1951).

Fonte: modificado de LINDSEY et al. (2014).

A região cefálica do tubo cardíaco primitivo é formada pelo ventrículo primitivo e a porção caudal é formada pelo átrio primitivo. Para aquisição da posição anatômica definitiva, deverá ocorrer o reposicionamento ântero-posterior das câmaras cardíacas, através de dobramentos chamados de “*looping*” cardíaco. O “*looping*” cardíaco é uma etapa do desenvolvimento do coração que confere a esse órgão características assimétricas (ICARDO et al., 2002), juntamente com a septação do coração, que individualizará as câmaras cardíacas formando dois átrios e dois ventrículos (CARLSON, 2014).

As células progenitoras cardíacas que dão origem ao endocárdio, miocárdio, mesocárdio e pericárdio parietal são encontradas nas primeiras 12 horas de desenvolvimento do embrião de *G. domesticus* (GARCIA-MARTINEZ e SCHOENWOLF, 1993; COHEN-GOULD e MIKAWA, 1996). No sexto dia de desenvolvimento, o

coração está maior e ainda fora da cavidade torácica, os primórdios das valvas cardíacas estão presentes e suas extremidades contêm células em proliferação (MARTINSEN, 2005).

Evidências sugerem que a exposição ao MeHg pode gerar um aumento dos riscos de efeitos adversos no sistema cardiovascular, como aumento na pressão arterial pós-natal (SORENSEN et al., 1999; ROMAN et al., 2011). Assim, com o intuito de contribuir com os trabalhos sobre a toxicidade do MeHg no sistema cardiovascular, o presente trabalho abordará os efeitos do MeHg sobre os processos de proliferação e morte celular na formação do coração, utilizando como modelo de estudo o embrião de *G. domesticus*, uma vez que existem poucos estudos enfocando a toxicidade do MeHg no desenvolvimento do principal órgão do sistema cardiovascular (DUAN et al., 2016). Nas aves, o MeHg chega nos ovos através das fêmeas, que transferem este metal aos embriões em desenvolvimento através do vitelo. Assim, pressupõe-se que os embriões sejam expostos ao MeHg desde a fertilização até a eclosão, podendo assim afetar o desenvolvimento como um todo (RUTKIEWICZ e BASU, 2013).

Considerando a grande importância da ampliação dos estudos da toxicidade do MeHg no desenvolvimento embrionário do coração, as hipóteses propostas para este trabalho são que o MeHg promova (i) a redução na proliferação celular; (ii) aumento da frequência de apoptose; e (iii) redução na espessura das paredes do coração dos embriões.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito do MeHg sobre a proliferação e a morte celular na formação do coração, utilizando embriões de *G. domesticus* em E10 como modelo de estudo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a organização tecidual das paredes das câmaras e dos septos cardíacos;

- Identificar e quantificar as células cardíacas em proliferação e em processo de morte celular programada por apoptose;

- Determinar a espessura das paredes do ventrículo direito e do ventrículo esquerdo, bem como o diâmetro das células cardíacas e o espaçamento entre as mesmas, nos embriões tratados com MeHg.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para realizar este trabalho foram utilizados embriões de galinha doméstica da espécie *G. domesticus*, provenientes de ovos fertilizados doados pela empresa Tyson do Brasil Alimentos LTDA, os quais foram transportados ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA)/BEG/CCB/UFSC. Em laboratório, os ovos foram mantidos em repouso por 24 horas e posteriormente incubados a 37.5°C - 38°C e 65% umidade em incubadora Golden®. Esses procedimentos foram realizados no período de janeiro de 2015 a julho de 2016, pela equipe do LRDA, principalmente pela doutoranda Cláudia Almeida Coelho de Albuquerque, do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento CCB/UFSC.

Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFSC, protocolo 355/CEUA e 23080.025620/2009-51/UFSC.

3.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após um período inicial de incubação, os ovos no 3º dia embrionário (E3), foram divididos em dois grupos:

- Grupo tratado com MeHg (n = 6 embriões): recebeu 0.1 µg MeHg / 50 µL de solução salina, injetado próximo a artéria vitelínica, de acordo com TAKAMATSU e FUJITA (1987). A dose administrada neste estudo foi baseada no trabalho de CARVALHO et al. (2008).

- Grupo controle (n = 6 embriões): recebeu 50 μ L de solução salina, injetado próximo a artéria vitelínica.

A administração do tratamento *in ovo* foi realizada através de abertura na casca dos ovos (região mais alongada), a qual foi posteriormente fechada com fita adesiva transparente e atóxica. Após, os ovos permaneceram na incubadora até o 10^o dia embrionário (E10) (Figura 3). As idades de E3 e E10 escolhidas para este trabalho se justificam pelo fato de em E3 o coração estar em processo inicial de formação, sendo que em E10, o coração já possui quatro cavidades. Diariamente, os embriões foram monitorados através da abertura da casca, de acordo com as características descritas por HAMBURGER e HAMILTON (1951).

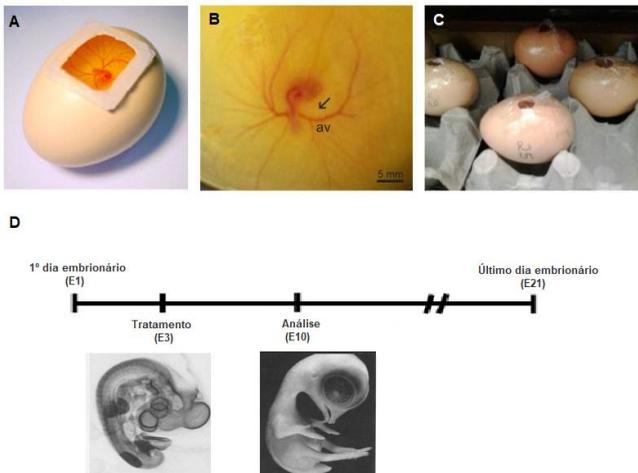


Figura 3. Ovos e embriões de *G. domesticus*. Ovo com embrião em E3, destacando a abertura ampliada na região mais alongada do ovo para exposição do embrião (A). Detalhe do embrião em E3, no qual é realizado o tratamento próximo à artéria vitelínica (av, seta) (B). Ovos após o tratamento, cuja abertura na casca, nas dimensões reais, foi fechada com fita adesiva (C). Representação do tempo do desenvolvimento, destacando as características dos embriões em E3 e E10 (D). // Representa quebra na escala temporal do desenvolvimento. Barra de escala = 5 mm. **Fonte:** modificado de Ferreira (2015).

3.3 PROCESSAMENTO DO CORAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Para obtenção dos corações em estágio E10, os embriões tiveram seu desenvolvimento interrompido após terem sido retirados da incubadora e dessensibilizados a 4°C por 15 min. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e colher, os embriões removidos dos ovos e das membranas extraembrionárias foram dispostos em placas de Petri e dissecados.

Os corações foram fixados em formaldeído a 4% por 24h, mantidos em etanol a 70%, onde permaneceram até que fossem analisados para este trabalho. Em seguida, foi realizada a desidratação em série crescente de etanol (70% -100%) por 1h em cada álcool, a diafanização em dois banhos de xilol puro por 5 min cada, ou até que a peça estivesse translúcida. Após, foram realizados três banhos em parafina a 60°C por 1h cada, sendo os corações orientados para realização de secções frontais (6 µm de espessura) em micrótomo rotativo Olympus CUT 2020A.

As secções foram dispostas em lâminas histológicas preparadas com gelatina a 0,5%, de modo que cada lâmina fosse montada com secções dos grupos controle e tratado com MeHg, destinadas à coloração Hematoxilina-Eosina (HE), análises por imuno-histoquímica e pelo método de TUNEL.

3.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DO CORAÇÃO

Para caracterização da micromorfologia do coração foi realizada a coloração de um conjunto das lâminas com HE. As secções

foram desparafinizadas com dois banhos de xilol puro por 5 min cada, seguidos da re-hidratação em série decrescente de etanol (100% - 70%) por 10 min cada. A seguir, as lâminas foram embebidas em água corrente por 10 min, imersas em Hematoxilina de Harris por 25 seg, lavadas com água corrente por 10 min, imersas em Eosina aquosa a 1% por 20 seg e lavadas em água destilada por 5 min. As secções foram desidratadas em série de etanol crescente (70% - 100%) por 5 min, diafanizadas em xilol puro por 5 min e montadas com Entelan®.

3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS VENTRÍCULOS

Para realização das morfometrias foram realizadas fotografias ao microscópio invertido Olympus IX83 (4 X e 100 X) (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, LAMEB) das lâminas com secções do coração corados com HE.

A espessura das paredes do ventrículo direito (VD) e do ventrículo esquerdo (VE) foi determinada (aumento de 4 X) utilizando o software CellSens (LAMEB). Considerando que a espessura das paredes ventriculares não apresentam dimensões uniformes, optou-se por determinar a espessura em três alturas de cada ventrículo. Foi considerada como a espessura da parede do ventrículo, a média dos valores obtidos para as três alturas mensuradas (Figura 4).

Para a determinação do diâmetro das células e dos espaços intercelulares (aumento de 100 X) nas paredes dos VD e VE foram analisadas por meio do software CellSens (LAMEB), as mesmas regiões dos ventrículos utilizadas para obtenção da espessura. Foram analisadas 10 células de cada uma das 3 regiões de cada ventrículo e para os espaços intercelulares foram medidos 5 espaços entre as células.

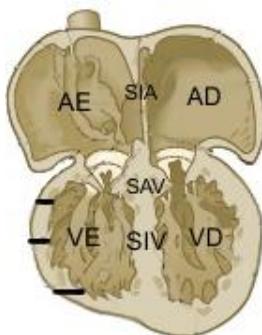


Figura 4. Representação do coração em desenvolvimento. Linhas horizontais em negrito na parede do VE indicam as três alturas mensuradas em ambos os ventrículos. AD, átrio direito; AE, átrio esquerdo; SAV, septo atrioventricular; SIA, septo interatrial; SIV, septo interventricular; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo.

Fonte: modificado de Carlson et al.(2014).

3.6 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para realizar as análises de proliferação celular, um outro conjunto de lâminas foi destinado à marcação por imuno-histoquímica, utilizando anticorpo anti-fosfohistona H3 (PHH3, do inglês *phosphohistone H3*). As secções foram desparafinizadas com dois banhos de xilol puro, por 5 min cada, seguidos da re-hidratação em série decrescente de etanol (100% -70%) por 10 min cada. Para inativação das peroxidases endógenas, as secções passaram por uma solução de peróxido de hidrogênio: metanol 100% (1:2) por 10 min. A permeabilização das membranas celulares foi realizada com banho de 5 min em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) a 0,1 M + Triton X-100 a 0,3%. Após foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com soro fetal bovino a 5% por 40 min.

Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo primário anti-PHH3 IgG anti-coelho IgG (diluição em PBS 1:300) por 12 h a 4°C. As lâminas passaram por seis banhos com PBS a 0,1 M + Triton X-100 a 0,3% de 5 min e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com peroxidase (diluição em PBS 1:400) por 3 h a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizados seis banhos com PBS a 0,1 M + Triton X-100 a 0,1% de 5 min cada. Após, as imunomarcações foram reveladas com DAB (3,3'-diaminobenzidina), e a montagem final das lâminas foi realizada com Entelan®.

A quantificação das células PHH3-positivas foi realizada em microscópio de luz marca Olympus CBA (aumento de 40 X), com auxílio da graticula de Weibel nº 2 – M42 (Figura 5). Para contagem de células imunomarcadas, foram utilizados 5 campos alternados ao longo do VE e VD, através do método estereológico (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

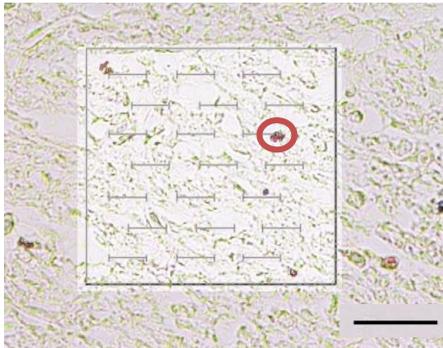


Figura 5. Micrografia do tecido cardíaco com sobreposição da imagem da Graticula de Weibel. Círculo vermelho indica a extremidade das barras da graticula, a qual é considerada para contagem. Apenas as células imunomarcadas que ficarem sobrepostas às extremidades da graticula foram quantificadas. Barra de escala = 40µm.

3.7 ANÁLISE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS PELO MÉTODO DE TUNEL

Para realizar as análises das células apoptóticas, um terceiro conjunto de lâminas foi destinado ao ensaio de TUNEL. As secções foram desparafinizadas em xilol puro e re-hidratadas em série decrescente de etanol (100% - 70%). Para conservação do tecido, as secções foram embebidas em solução de NaCl a 0,85% por 5 min. A permeabilização das membranas celulares foi realizada através de um banho de 5 min de PBS a 0,1 M pH 7,4, e por um banho de 30 seg de proteinase K diluída em tampão Tris 10 mM, pH 8,0 (1:1000). Após, as secções foram imersas por 5 min em PBS e fixados em formaldeído a 4%. Para reação de equilíbrio, as secções passaram por um banho de 5 min em tampão de equilíbrio e incubadas com a enzima de marcação (*TdTreaction mix – Equilibrate Buffer Nucleotide Mix + rTdTEnzyme*) a 37°C em câmara úmida por 60 min, cobertos por parafilme. Para terminar a reação de marcação, foi utilizada uma solução de NaCl e citrato de sódio diluída em água milliQ por 15 min, seguido de um banho em PBS pH 7,4 a 0,1 M, por 5 min. As células apoptóticas foram identificadas pela fluorescência verde.

A quantificação direta das células apoptóticas foi realizada a partir de micrografias obtidas no microscópio invertido Olympus IX83 (aumento de 40 X) (LAMEB) de três regiões dos tecidos do VD e VE e da região da base septo interventricular (SIV) entre VD e VE (Figura 6).

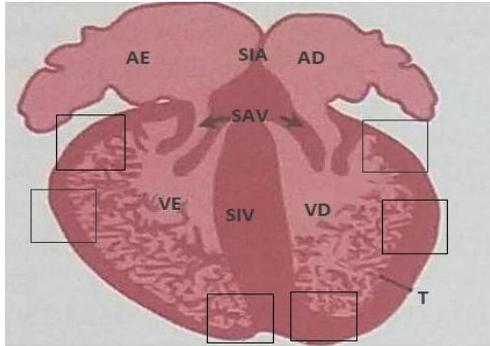


Figura 6. Representação esquemática do coração em desenvolvimento. Quadrados indicam as regiões de ambos os ventrículos onde foram realizadas as contagens das células apoptóticas. AD, átrio direito; AE, átrio esquerdo; SAV, septo atrioventricular; SIA, septo interatrial; SIV, septo interventricular; T, trabéculas; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo.

Fonte: modificado de FURTADO et al.(2016).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados morfométricos e quantitativos foram analisados no programa Statistica®, versão 13, sendo a normalidade dos dados testada previamente. Foi realizada análise de variância ANOVA uma via, seguido do teste *post-hoc* de Tukey. A interação entre o tratamento com MeHg e a lateralidade dos ventrículos foi avaliada através de ANOVA duas vias. Diferenças significativas foram consideradas, quando $p \leq 0,05$. Os dados foram apresentados em valores de média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DO MEHG SOBRE A ORGANIZAÇÃO DAS PAREDES DAS CÂMARAS CARDÍACAS

Neste trabalho, através das análises microscópicas verificou-se que dos 6 embriões analisados do grupo controle todos apresentavam coração com morfologia típica para a idade de estudo, E10. A análise da secção frontal mostra a organização dos átrios com paredes mais finas e um septo interatrial com espessura maior. As paredes dos ventrículos apresentavam trabéculas com aspecto esponjoso, presentes desde o septo atrioventricular até a base do ventrículo; o septo interventricular não apresentou trabéculas (Figura 7A). Quando comparados VE e VD, observou-se que o VE possuía trabéculas mais finas e longas e a espessura da parede ventricular foi aproximadamente três vezes maior que a do VD.

Quando analisados os corações dos embriões tratados com MeHg observou-se uma frequência de 4 embriões com coração com morfologia atípica das trabéculas (4 corações com alteração/6 corações analisados). Diferente do grupo controle, o grupo tratado com MeHg (Figura 7B), apresentou as trabéculas do VE semelhantes às do VD, em volume e espessura. Adicionalmente, as trabéculas do VD não apresentam aspecto esponjoso e não foram observadas em toda a extensão desse ventrículo.

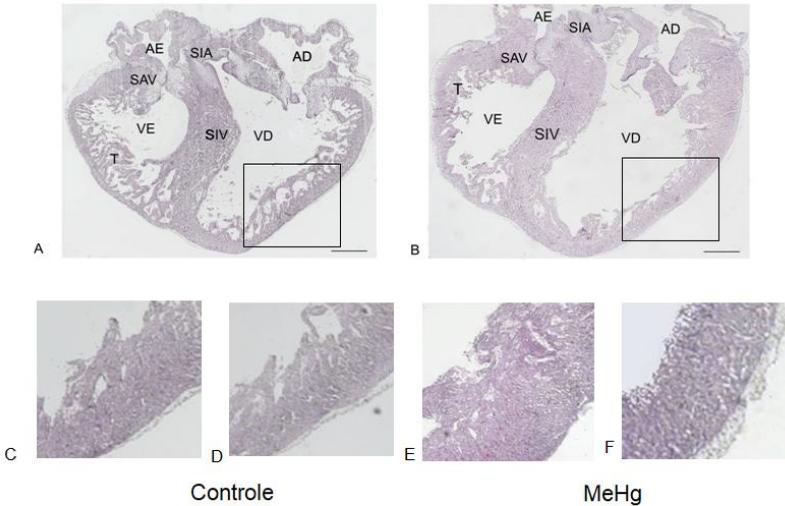


Figura 7. Vista frontal do coração de embriões de *G. domesticus* em E10, corado com HE. Destaque para a organização das trabéculas dos ventrículos direito e esquerdo dos embriões dos grupos controle (A), tratado com MeHg (B) representação das paredes do VD controle (C e D) e tratado com MeHg (E e F). AD, átrio direito; AE, átrio esquerdo; SAV, septo atrioventricular; SIA, septo interatrial; SIV, septo interventricular; T, trabéculas; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo. Barras de escala = 400 μ m.

Após a análise da morfologia das paredes do coração dos embriões de *G. domesticus*, foram realizadas as morfometrias das espessuras dos VE e VD. Nas três alturas analisadas, verificou-se que a espessura média do VE foi de 125,04 μ m (\pm 12,65) no grupo controle, a qual não diferiu do grupo tratado com MeHg (136,48 μ m; \pm 14,44). No VD observou-se um aumento significativo da espessura média de 206,36 μ m (\pm 27,64) nos embriões controle para 306,82 μ m (\pm 21,64; $p < 0,05$) nos embriões tratados com MeHg (Figura 8). A análise ANOVA de duas vias demonstrou que houve interação entre o tratamento com o MeHg e a lateralidade dos ventrículos ($F(1,12) = 5,44$; $p < 0,03$) para a análise da espessura da parede dos ventrículos (Figura 8).

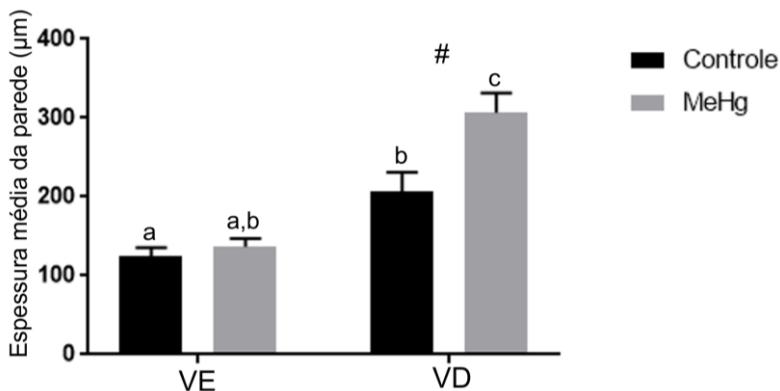


Figura 8. Espessura média da parede dos ventrículos do coração de embriões de *G. domesticus* em E10 dos grupos controle e tratados com MeHg. VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo. Letras minúsculas sobre as barras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). # indica a interação entre o tratamento com MeHg e a lateralidade dos ventrículos.

Destaca-se que, o aspecto esponjoso das paredes dos ventrículos dos embriões do grupo controle se deve a uma rede de fibras entrecruzadas que formam as trabéculas, as quais são separadas por recessos intertrabeculares, que se comunicam com a cavidade ventricular (DYCE, 2010).

O efeito do MeHg sobre a organização do coração e de suas paredes é escasso na literatura. Mais escasso ainda, são os trabalhos que enfocam essa temática em embriões. Por outro lado, há uma disponibilidade muito maior de estudos que abordam a toxicidade do MeHg sobre o SNC. Em 1978, CHOI et al., em um dos raros trabalhos com tecidos humanos, realizaram estudos clínicos e neuropatológicos detalhados em dois bebês recém-nascidos, que foram expostos ao MeHg durante a gravidez, quando houve a ingestão materna de pão contaminado com MeHg nos primeiros meses de gravidez. Esses autores observaram que além de uma migração incompleta de neurônios para o

córtex cerebelar e cerebral, houve alterações no cérebro dos recém-nascidos, que indicaram um grau elevado de vulnerabilidade do cérebro fetal humano à intoxicação materna com MeHg. HIROOKA et al. (2017), em cultura de células endoteliais do cérebro humano, observou que doses de 1 a 3 μ M de MeHg induziram o aumento na síntese de hialuronana, como segue: CARVALHO (2007) investigou em embriões de *G. domesticus* os efeitos da exposição ao MeHg administrado as mesmas doses utilizadas nesse trabalho, demonstrou a interferência do MeHg sobre a organização morfológica do cerebelo; FUJIMURA e USUKI (2017) utilizando camundongos adultos expostos à 30 ppm de MeHg, durante 8 semanas, observaram a degeneração neuronal induzida por MeHg no interior do córtex cerebral.

Embora trabalhos com o coração sejam pouco frequentes, o efeito do MeHg sobre um sistema que seja tão vascularizado quanto o cardiovascular, especialmente quando nos referimos aos processos fisiológicos, patológicos locais e sistêmicos, foi realizado por KHAN et al. (2017) utilizando os rins. Esses autores demonstraram que os rins de ratos *Wistar* fêmeas tratadas com 0.5 ppm e 5 ppm de MeHg, apresentaram lesões em células epiteliais tubulares e glomerulares, que levaram a desorganização estrutural do tecido. No presente estudo foi demonstrada que o MeHg apresentou efeito semelhante sobre a organização estrutural das paredes do coração.

Considerando os resultados obtidos nas análises morfológicas e morfométricas, realizou-se a análise do diâmetro médio das células das paredes dos ventrículos. Observou-se no VE redução significativa de 6,01 μ m (\pm 0,14) nos embriões do grupo controle para 4,5 μ m (\pm 0,11; p < 0,05) nos embriões do grupo tratado com MeHg. As células do VD

também apresentaram redução significativa de $5,34 \mu\text{m}$ ($\pm 0,09$) de diâmetro nos embriões do grupo controle para $4,63 \mu\text{m}$ ($\pm 0,12$; $p < 0,05$) de diâmetro nos embriões do grupo tratado com MeHg (Figura 9). A análise ANOVA de duas vias, demonstrou que houve interação entre o tratamento com MeHg e lateralidade dos ventrículos, ($F(1,47) = 10,79$; $p < 0,001$) para a análise do diâmetro médio das células (Figura 9).

O desenvolvimento cardíaco é um processo dinâmico e, portanto, requer diferentes sinalizações celulares considerando sua lateralidade direito-esquerdo (ZHOU et al., 2008; MA et al., 2008). Assim, diversas populações de células precursoras durante o desenvolvimento deste órgão, expressam fatores de transcrição relacionados a cada lado do coração (CAI et al., 2003; MEILHAC et al., 2003). Considerando que esses fatores influenciam o desenvolvimento do coração, neste trabalho foi possível observar que a espessura média do VE não difere entre embriões dos grupos controle e tratado com MeHg. Contudo, no VD o aumento significativo da espessura média das paredes nos embriões controle em relação embriões tratados com MeHg, nos faz compreender a interação da lateralidade versus MeHg. Buscando entender essa interação, foi determinado o diâmetro médio das células das paredes de VE e VD, e constatou-se que entre os embriões controles há diferença no diâmetro das células do VE e do VD. Ou seja, em condições normais do desenvolvimento, é característico das células do coração apresentarem diâmetros diferentes no VE e VD. Neste estudo pode-se observar que o MeHg promoveu alteração nas células, de modo que essa diferença não fosse mais observada, quando comparados os dois lados do coração.

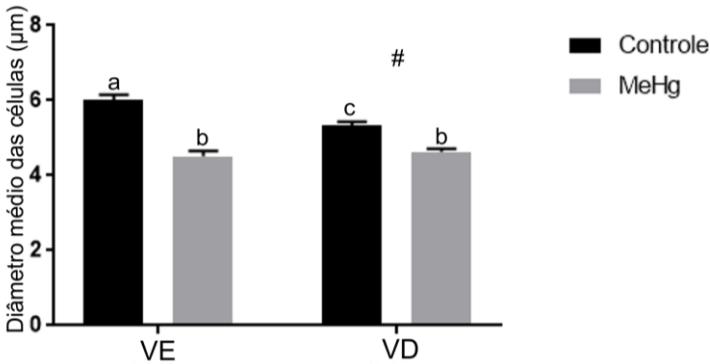


Figura 9. Diâmetro médio das células das paredes dos ventrículos direito e esquerdo do coração de embriões de *G. domesticus* em E10 dos grupos controle e tratados com MeHg. Letras sobre as barras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). # indica a interação entre o tratamento com MeHg e a lateralidade dos ventrículos.

A partir dos resultados das análises morfométricas anteriores, que mostraram um aumento na espessura das paredes do VD, sem que este aumento fosse acompanhado pelo aumento no diâmetro das células, e ainda pelas características do arranjo celular das paredes dos ventrículos, passou-se a investigar o espaçamento médio entre essas células. Verificou-se que o espaçamento médio entre as células no VE não diferiu entre os embriões controle ($12,94 \mu\text{m} \pm 1,38$) e tratados com MeHg ($15,49 \mu\text{m} \pm 2,1$). Do mesmo modo, no VD este espaçamento também não diferiu significativamente entre o grupo controle ($15,92 \mu\text{m} \pm 1,20$) e o grupo tratado com MeHg ($13,66 \mu\text{m} \pm 1,17$). Além disso, não foi observada diferença no espaçamento das células do VE e VD, quando comparados os embriões controles (Figura 10). A análise ANOVA de duas vias, demonstrou que não houve interação entre o tratamento com MeHg e a lateralidade dos ventrículos, ($F(1,11) = 1,84$; $p > 0,05$), para a análise do espaçamento entre as células.

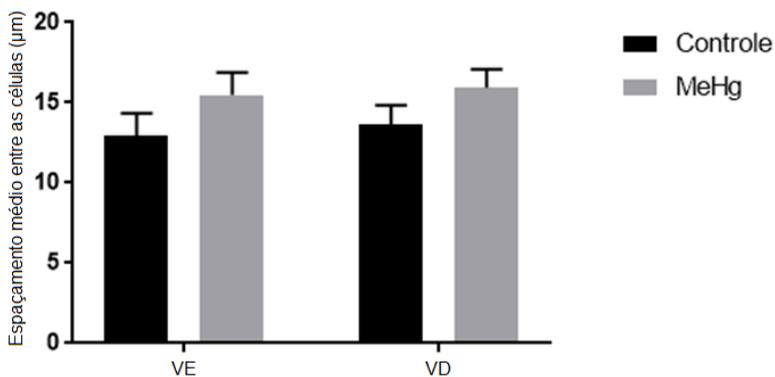


Figura 10. Espaçamento médio entre as células das paredes dos ventrículos direito e esquerdo do coração de embriões de *G. domesticus* em E10 dos grupos controle e tratados com MeHg.

Embora os resultados dos espaçamentos entre as células das paredes ventriculares não terem diferido significativamente, é possível sugerir que pelo fato do tecido cardíaco se desenvolver a partir do mesoderma, que esses espaços possuam rica vascularização e abundante matriz extracelular. Assim, tanto a vascularização quanto a matriz extracelular poderiam ser investigadas. TAKAHASHI et al. (2017), expondo ratos a 20 ppm de MeHg por até 4 semanas, observaram aumento da expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), utilizado como marcados na formação de vasos sanguíneos, no cerebelo de animais expostos ao MeHg. Adicionalmente, considerando que, o miocárdio secreta uma espessa matriz extracelular, rica em hialuronana (SADLER, 2010), esta proteína poderia ser utilizada como marcador.

4.2 EFEITO DO MEHG SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

O mecanismo de proliferação celular é básico para o desenvolvimento de organismos, estruturas e órgãos, e que a interferência neste mecanismo poderia justificar danos ao desenvolvimento de determinado tecido.

Neste estudo foram realizadas análises de marcações celulares por imuno-histoquímica, a fim de verificar as alterações induzidas pelo MeHg no conteúdo da proteína PHH3, envolvida na condensação da cromatina no processo de proliferação celular. O número médio de células PHH3-positivas no VE não diferiu significativamente entre os embriões controle (0,75 células \pm 0,1) e tratados com MeHg (0,62 células \pm 0,1). No entanto, o tratamento com MeHg promoveu uma redução significativa do número médio de células PHH3-positivas no VD (0,92 células PHH3-positivas \pm 0,07, $p < 0,05$), quando comparado com o grupo controle (1,36 células PHH3-positivas) (Figura 11). Além disso, foi observada diferença significativa na média do número de células em proliferação do VE e VD, quando comparados os embriões controles ($p < 0,01$). (Figura 11). A análise ANOVA de duas vias demonstrou que houve interação entre o tratamento com o MeHg e a lateralidade dos ventrículos ($F(1,356) = 5,59$; $p < 0,01$) para a análise da proliferação celular (Figura 11).

Mais uma vez, considerando que os estudos sobre a toxicidade de MeHg e o desenvolvimento do coração, são escassos na literatura, procurou-se quantificar o número real de trabalhos disponíveis em uma das bases de dados. Numa pesquisa utilizando as palavras-chaves *heart AND methylmercury* foram encontrados 147 resultados na base de dados *PubMed*, em 24 de outubro de 2017. Além disso, há uma menor

disponibilidade ainda, quando se considera os processos de proliferação celular, o que dificulta a análise da toxicidade deste metal, numa pesquisa utilizando as palavras-chaves *methylmercury AND heart AND cell proliferation* foi encontrado 1 resultado na base de dados *PubMed* (24/10/2017).

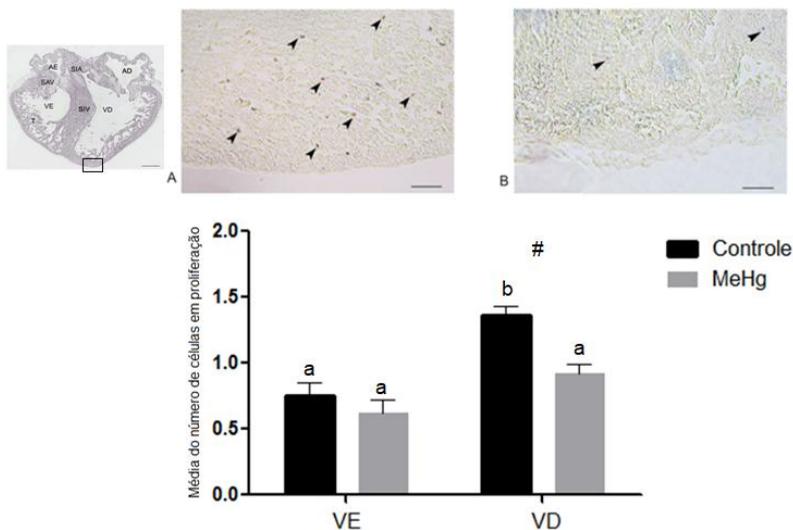


Figura 41. Análise da proliferação celular por imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-PHH3 no coração de embriões de *G. domesticus* em E10. Secções frontais do coração dos embriões do grupo controle (A) e tratado com MeHg (B) mostrando as células PHH3-positivas (cabeça de seta). Gráfico, indica o número médio de células PHH3-positivas para VE e VD. Letras sobre as barras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). # indica a interação entre o tratamento com MeHg e a lateralidade dos ventrículos. Barras de escala = 40 μ m.

Analisando a expressão da proteína PHH3, pode-se observar que o MeHg induziu redução de proliferação celular nas células do VD do coração de embriões em E10. Este marcador (anti-PHH3) tem sido utilizado de modo bem sucedido por KOBUS et al. (2009), para o mesmo modelo experimental em células da medula espinhal. Para XU et al. (2010), utilizando culturas de células progenitoras primárias do

córtex cerebral de embriões de ratos em E13, incubadas com baixas doses de MeHg (2,5 – 50 nM), como modelo para estudar o potencial efeito do MeHg em células progenitoras neurais, onde sugere que o MeHg induziu a inibição do ciclo celular antes da proliferação celular. Contudo, FERREIRA et al. (2015), em estudo com *G. domesticus*, em E10, observaram que os embriões tratados com a mesma dose de MeHg adotada nesse estudo, apresentaram redução na proliferação celular das camadas endodimal e manto, enquanto que, na camada marginal não houve uma redução no número de células PHH3-positivas.

Assim, reforça-se a importância de ampliar as pesquisas, uma vez que o coração é um órgão vital e que a proliferação celular é um mecanismo essencial nos processos de organogênese e morfogênese.

4.3 EFEITO DO MEHG SOBRE A APOPTOSE

Assim como a proliferação celular, a apoptose é um mecanismo inerente ao desenvolvimento embrionário, necessário para a organogênese e ainda é o tipo de morte celular mais comum em embriões, sendo associada também a morfogênese de alguns órgãos (DOSEFF, 2004). A fim de verificar a ocorrência de apoptose induzida por MeHg, foi utilizado o método de TUNEL para marcações celulares no coração de embriões de *G. domesticus*. Nos resultados obtidos verificou-se que o número médio de células apoptóticas no VE não diferiu significativamente entre os embriões controle (7,08 células positivas/mm² ± 0,7) e tratados com MeHg (4,82 células positivas/mm² ± 0,68). Por outro lado, no VD o número médio de células apoptóticas reduziu significativamente nos embriões tratados com MeHg (6,41 células positivas/mm² ± 0,83, $p < 0,05$), em comparação com os

embriões do grupo controle (9,97 células positivas/mm² ± 0,8) (Figura 12). Além disso, foi observada diferença significativa na média do número de células apoptóticas do VE e VD, quando comparados os apenas os embriões controles ($p < 0,05$). A análise ANOVA de duas vias demonstrou que não houve interação entre o tratamento com o MeHg e a lateralidade dos ventrículos ($F(1,132) = 1,03$; $p > 0,05$) para a análise da apoptose.

Considerando o efeito do MeHg descrito nos trabalhos de HUYCK et al. (2015) e FERREIRA et al. (2015) como indutor da apoptose, uma das hipóteses deste trabalho era que o MeHg promovesse a morte celular no tecido cardíaco. Durante o desenvolvimento embrionário, a apoptose atua na remoção de células excedentes que auxilia na modelagem de estruturas e órgãos (DOSEFF, 2004). Neste trabalho a análise morfológica indicou alterações na modelagem da estrutura das trabéculas, onde os embriões tratados com MeHg apresentaram uma morfologia atípica. Essa alteração causada pelo tratamento com MeHg pode ser atribuída a redução da apoptose, de modo a não haver a modelagem das trabéculas, mantendo o tecido da parede cardíaca com aspecto mais compactado. A apoptose é regulada por sinais intracelulares e extracelulares (ALBERTS et al., 2010) e o MeHg parece ter alterado esta sinalização.

FERREIRA et al. (2015), utilizando embriões de *G. domesticus* tratados com a mesma dose, na mesma idade do presente estudo, observaram, que o MeHg tem ação genotóxica, causando danos ao DNA e induzindo as células das camadas do SNC à morte por apoptose. Esses mesmos autores sugerem que possa haver uma relação entre à diminuição da proliferação celular induzida pelo MeHg e

comprometimentos das proteínas do ciclo celular com a morte celular programada por apoptose. Em organismos adultos expostos ao MeHg, KHAN et al. (2017) utilizando os rins de ratos *Wistar*, demonstraram que estes órgãos apresentaram morte por apoptose de células tubulares renais.

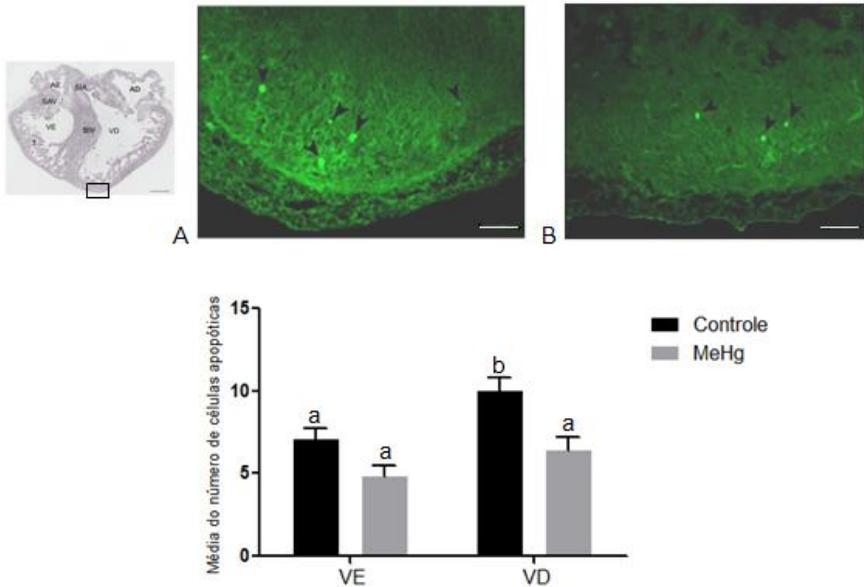


Figura 12. Cortes frontais do coração de embriões de *G. domesticus* em E10, submetidos à técnica de TUNEL. Detalhe do ventrículo mostrando células positivas distribuídas no tecido do grupo controle (A), ventrículo tratado com MeHg mostrando células positivas (B). Gráfico, indicando a média de células positivas para TUNEL em embriões de *G. domesticus* para VE e VD. Letras sobre as barras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Barras de escala = 40 μ m.

De um modo geral, neste estudo, a dose de MeHg utilizada, tempo de exposição e a idade de análise, se mostraram adequadas para a investigação da toxicidade do MeHg nas células do coração de embriões. As metodologias adotadas permitiram uma adequada análise morfológica e morfométrica do coração, porém para análise do efeito do

MeHg sobre a proliferação e a morte celular, são necessárias mais ferramentas de análise, visando contemplar um conjunto maior de fatores envolvidos nos processos de proliferação e morte celular.

Ao final deste trabalho podemos aceitar a hipótese de que o MeHg promove a redução na proliferação celular e rejeitar as hipóteses de que o MeHg promove o aumento da frequência de apoptose e a redução da espessura das paredes do coração dos embriões.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi investigado o efeito do MeHg no desenvolvimento do coração de embrião de *G. domesticus*, sendo que os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- O MeHg induziu alterações na organização morfológica, sendo que, 100% dos embriões controle apresentavam morfologia típica e 66% embriões tratados com MeHg apresentavam morfologia atípica;
- O MeHg induziu alterações na morfometria das paredes das câmaras cardíacas de *G. domesticus* do VD, e demonstrou interação com a lateralidade do órgão;
- O MeHg induziu a redução no diâmetro médio das células das paredes do ventrículo, e demonstrou ainda, interação com a lateralidade do órgão;
- O MeHg não modificou o espaçamento médio entre as células das paredes do ventrículo, e também não apresentou interação com a lateralidade;
- O MeHg induziu a redução concomitante dos processos de proliferação celular e apoptose nos corações analisados.

6 REFERÊNCIAS

- ACHÁ, D.; HILTELMANN, H.; YEE, J. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere*, 82: 911 – 916. 2011.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula 5ª Edição*. Porto Alegre. Artmed. 2010.
- ASCHNER, M.; ASCHNER, J. L. Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14: 169 – 176. 1990.
- ATKINS, P.W.; JONES, L. *Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente 5ª Edição*. Bookman. 2012.
- CAI, C. L.; LIANG, X.; SHI, Y.; CHU, P. H.; PFAFF, S. L.; CHEN, J.; EVANS, S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, 5: 877-889. 2003.
- CARVALHO, C. M. Efeitos neurotóxicos da exposição perinatal ao metilmercúrio em *Gallus domesticus*. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.
- CARVALHO, C. M.; NAZARI, M. E.; FARINA, M.; MÜLLER, R. M. Y. Behavioral, morphological, and biochemical changes after *in ovo* exposure to methylmercury in chicks. *Toxicological Sciences*, 106: 180 – 185. 2008.
- CARLSON, B. M. *Human Embryology and Developmental Biology 5ª Edition*. Elsevier. 2014.
- CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 188: 301 – 308. 2010.
- CHENG, J.; ZHAO, W.; WANG, Q.; LIU, X.; WANG, W.; Accumulation of mercury, selenium and PCBs in domestic duck brain, liver and egg from a contaminated area with an investigation of their redox responses. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35: 388 – 394. 2013.

- CHOI, B. H.; LAPHAM, L. W.; AMIN-ZAKI, L.; SALEEM, T. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse White matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in útero. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 6: 719 – 733. 1978.
- COHEN-GOULD, L.; MIKAWA, T. The fate diversity of mesodermal cells with in the heart field during chicken early embryogenesis. *Developmental Biology*, 177: 265 – 273. 1996.
- CRESPO-LOPEZ, M. E.; MACÊDO, G. L.; PEREIRA, S. I.; ARRIFANO, G. P.; PICANÇO-DINIZ, D. L.; NASCIMENTO, J. L.; HERCULANO, A. M. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, 4: 212 – 220. 2009.
- DYCE, K. M. *Tratado de Anatomia Veterinária*. Elsevier Brasil. 2010.
- DOSEFF, A. I; Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells and Development*, 13, 5:473 – 483. 2004.
- DUAN, J.; HU, H.; LI, Q.; JIANG, L.; ZOU, Y.; WANG, Y.; SUN, Z. Combined toxicity of silica nanoparticles and methylmercury on cardiovascular system in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44: 120 – 127. 2016.
- FERREIRA, F. F. Toxicidade do Metilmercúrio (MeHg) sobre a Organização das Camadas da Medula Espinhal de Embriões de *Gallus domesticus*. Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina. 2015.
- FERREIRA, F. F.; AMMAR, D.; BOURCKHARDT, F. G.; KOBUS-BIANCHINI, K.; MÜLLER, R. M. Y.; NAZARI, M. E. MeHg Developing exposure causes DNA double-strand breaks and elicits cell cycle arrest in spinal cord cells. *Journal of Toxicology*, 1 – 10. 2015.
- FUJIMURA, M.; USUKI, F. Site-specific neural hyperactivity via the activation of MAPK and PKA/CREB pathways triggers neuronal degeneration in methylmercury-intoxicated mice. *Toxicology Letters*, 271: 66-73. 2017.

- FURTADO, M. B.; NIM, H. T.; BOYD, S. E.; ROSENTHAL, N. A. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. *Development*, 143:387 – 397. 2016
- FREITAS, C. M.; SILVA, M. A.; MENEZES, F. C. O Desastre na barragem de mineração da SAMARCO-fratura exposta dos limites do Brasil na redução de risco de desastres. *Mariana/Artigos*, 25 – 30. 2016.
- FRIBERG, E.; MOTTET, N. K. Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. *Biological Trace Element Research*, 21: 201 - 206. 1988.
- GARCIA-MARTINEZ, V.; SCHOENWOLF, G. C. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Developmental Biology*, 159: 706 – 719. 1993.
- GHIZONI, H.; SOUZA, V.; STRALIOTTO, M. R.; BEM, A. F.; FARINA, M.; HORT, M. A. Superoxide anion generation and oxidative stress in methylmercury-induced endothelial toxicity *in vitro*. *Toxicology In Vitro*, 38: 19 – 26. 2017.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A Series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88: 231 – 272. 1951.
- HE, X.; IMANISHI, S.; SONE, H.; NAGANO, R.; QIN, X. Y.; YOSHINAGA, J.; AKANUMA, H.; YAMANE, J.; FUJIBUCHI, W.; OHSAKO, S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicology Letters*, 212: 1 – 10. 2012.
- HIROOKA, T.; YOSHIDA, E.; ETO, K.; KAJI, T. Methylmercury induces hyaluronan synthesis in cultured human brain microvascular endothelial cells and pericytes via different mechanisms. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42 (3): 329-333. 2017.
- HUYCK, R. W.; NAGARKAR, M.; OLSEN, N.; CLAMONS, S. E.; SAHA, M. S. Methylmercury exposure during early *Xenopus laevis* development affects cell proliferation and death but not neuronal progenitor specification. *Neurotoxicology and Teratology*, 47: 102 – 113. 2015.
- IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Laudo técnico preliminar. Impactos ambientais

decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Novembro, 2015. Disponível em:

<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/laud_o_tecnico_preliminar.pdf> . Acesso em: 07/06/2016.

ICARDO, J. M.; RINCÓN, J. M. G.; ROS, M. A. Congenital heart disease, heteroxia and laterality. *Revista Española de Cardiología*, 55: 962 – 974. 2002.

KHAN, H.; SINGH, R. D.; TIWARI, R.; GANGOPADHYAY, S.; ROY, S. K.; SINGH, D.; SRIVASTAVA, V. Mercury exposure induces cytoskeleton disruption and loss of renal function through epigenetic modulation of MMP9 expression. *Toxicology*, 386: 28 – 39. 2017.

KOBUS, K.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M. R. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. *Histochemistry Cell Biology*, 132: 525 – 532. 2009.

LINDSEY, S. E.; BUTCHER, J. T.; YALCIN, H. Mechanical regulation of cardiac development. *Frontiers in Physiology*, (5) 318: 1 – 15. 2014.

MA, Q.; ZHOU, B.; PU, W. T. Reassessment of *Isl1* and *Nkx2-5* cardiac fate maps using a *Gata4*-based reporter of cre activity. *Developmental Biology*, 323: 98 – 104. 2008.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. *Annals of The Brazilian Academy of Sciences*, 75: 469 – 486. 2003.

MARTINSEN, B. J. Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Developmental Dynamics*, 223: 1217 – 1237. 2005.

MEILHAC, S. M.; KELLY, R. G.; ROCANCOURT, D.; ELOY-TRINQUET, S.; NICOLAS, J. F.; BUCKINGHAM, M. E. A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development*, 130: 3877 – 3889. 2003.

MEGLER, D.; ANDERSON, H. A.; CHAN, L. H. M.; MAHAFFEY, K. R.; MURRAY, M.; SAKAMOTO, M.; STEM, A. H. Methylmercury exposure and health effects in humans: A worldwide concern. *A Journal of The Human Environment*, 36 (1): 3 – 11. 2007.

- MOREIRA, L. E.; OLIVEIRA, J.; DUTRA, F. M.; SANTOS, B. D.; GONÇALVES, A. C.; GOLDFEDER, M. E.; BEM, F. A.; PREDIGER, D. R.; ASCHNER, M.; FARINA, M. Does methylmercury – induced hypercholesterolemia play a casual role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? *Toxicological Sciences*, 130: 373 – 382. 2012.
- MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L.; AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 29: 543 – 566. 1998.
- MÜLLER, R. M. Y.; KOBUS, K.; SCHATZ, C. J.; AMMAR, D.; NAZARI, M. E. Prenatal lead acetate exposure induces apoptosis and changes GFAP expression during spinal cord development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75: 223 – 229. 2012.
- NAIEB, A. S.; HAPPEL, M. C.; YELBUZ, T. M. A detailed atlas of chick heart *in vivo*. *Annals of Anatomy*, 195: 324 – 341. 2013.
- PATEL, E.; REYNOLDS, M. Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. *Toxicology Letters*, 222: 265 – 272. 2013.
- ROMAN, A. H.; TYRA, L. W.; BRENT, A. C.; DEWAILLY, E.; GUALLAR, E.; HATTIS, D.; MARIËN, K.; SCHWARTZ, J.; STERN, H. A.; VIRTANEN, K. J.; RICE, G. Evaluation of cardiovascular effects of methylmercury exposures: current evidence supports development of a dose-response function for regulatory benefits analysis. *Environmental Health Perspectives*, 119: 607 – 614. 2011.
- RUIJTENBEEK, J. G. R.; DE MEY, C. E. B. The chicken embryo in developmental physiology of the cardiovascular system: a traditional model with new possibilities. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283: 549 – 551. 2002.
- RUTKIEWICZ, J.; BASU, N. Methylmercury egg injections: part 1 – tissue distribution of mercury in the avian embryo and hatchling. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93: 68 – 76. 2013.
- SADLER, T. W. *Langman Embriologia Médica 12ª Edição*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2010.

- SAKAMOTO, M.; KAKITA, A.; WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAKANO, A.; AKAGI, H. Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure through out gestation and lactation periods. *Brain Research*, 949: 51 – 59. 2002.
- SEDMERA, D.; MCQUINN, T. Embryogenesis of heart muscle. *Heart Failure Clinics*, 4(3): 235 – 245. 2008.
- SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26: 215 – 226. 2012.
- SORENSE, N.; MURATA, K.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; WEIHE, P.; GRANDJEAN, P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology Journal*, 10(4): 370 – 375. 1999.
- TAKAHASHI, T.; FUJIMURA, M.; KOYAMA, M.; KANAZAWA, M.; USUKI, F.; NISHIZAWA, M.; SHIMOHATA, T. Methylmercury causes blood-brain barrier damage in rats via up regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Plos One*, 12(1): 1 – 10. 2017.
- TAKAMATSU, T.; FUJITA, S. Growth of notochord and formation of cranial and mesencephalic flexures in chicken embryo. *Development Growth and Differentiation*, 29(5): 497 – 507. 1987.
- Texas Christian University Aquatic Ecology. Mercury Research. Disponível em: <<http://www.aquaticecologylab.tcu.edu/>>. Acesso em: 27/10/2017.
- TUTAREL, O.; NOROZI, K.; HORNUNG, O.; ORHAN, G.; WÜBBOLT-LEHMANN, P.; WESSEL, A.; YELBUZ, M. Cardiac failure in the chick embryo resembles heart failure in humans. *Imagens in Cardiovascular Medicine*, 112: 352 – 354. 2005.
- WIENER, J. G.; KRABBENHOFT, D. P.; HEINZ, G. H.; SCHEUHAMMER, A. M. Ecotoxicology of mercury. University Of New England. 2003. Disponível em: <<http://www.crcnetbase.com/doi/pdfplus/10.1201/9781420032505.ch16>>. Acesso em: 15/08/2017.

- XU, M.; YAN, C.; TIAN, Y.; YUAN, X.; SHEN, X. Effects of low level of methylmercury on proliferation of cortical progenitor cells. *Brain Research*, 1359: 272 – 280. 2010.
- YUTZEY, K. E.; GANNON, M.; BADER, D. Diversification of cardiomyogenic cell lineages *in vitro*. *Developmental Biology*, 170: 531 – 541. 1995.
- ZHOU, B.; GISE, A. V; MA, Q.; RIVERA-FELICIANO, J.; PU, W. T. Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 75: 450 – 453. 2008.