

**O CLORETO DE TRIBUTILESTANHO DESREGULA O EIXO
HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-ADRENAL EM DIFERENTES NÍVEIS
EM RATAS**

Eduardo Merlo

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Setembro de 2017

EDUARDO MERLO

**O CLORETO DE TRIBUTILESTANHO DESREGULA O EIXO
HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-ADRENAL EM DIFERENTES NÍVEIS
EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^o. Dr. Jones Bernardes Graceli

**VITÓRIA - ES
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito
Santo, ES, Brasil)

Merlo, Eduardo, 1992 -

M565c O cloreto de tributilestanho desregula o eixo hipotalâmico-hipofisário- adrenal em diferentes níveis em ratas / Eduardo Merlo – 2017.

78 f. : il.

Orientador: Jones Bernardes Graceli.

Coorientador: Leandro Ceotto Freitas Lima.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Hipotálamo. 2. Hipófise. 3. Inflamação. 4. Toxicologia. I. Graceli, Jones Bernardes. II. Lima, Leandro Ceotto Freitas. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612



**Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado do candidato **Eduardo Merlo**, intitulada "**O Cloreto de Tributilestanho Desregula o Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Adrenal em Diferentes Níveis em Ratas**", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, o candidato cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que o aluno faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 12 de setembro de 2017.

Prof^ª. Dr^ª. IVANITA STEFANON
Presidente da Comissão Julgadora - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Prof^ª. Dr^ª. SUELY GOMES DE FIGUEIREDO
Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. LEANDRO CEOTTO FREITAS LIMA
Co-orientador

CÍNTIA SILVA LIRIO
Secretária Administrativa - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Primeiramente, a **Deus**, pela dádiva da vida e por ter me iluminado nesta caminhada, fornecendo muita força e perseverança para a luta dos meus objetivos e sabedoria e crescimento perante as dificuldades.

Aos meus pais, **Carlos e Darlene**, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas, serem meus primeiros incentivadores dos estudos e da pesquisa. Desde assistir globo repórter ao meu lado quando pequeno até a ajuda sem limites para que eu pudesse ter uma educação de qualidade e pudesse aproveitar todas as oportunidades da minha vida acadêmica. Ao meu irmão, **Julisson**, por me lembrar que a vida não é feita só de trabalho, mas que também temos que aproveitar todos os momentos.

À minha noiva, **Anna Carolina**, que junto da ciência são as duas paixões da minha vida. Ela que sonha e cresce comigo cada dia mais. Aquela que sempre está pronta a me ajudar, aconselhar e incentivar. Que muitas vezes trocou o descanso do lar para ficar ao meu lado no laboratório aos finais de semana. E eu sei que graças a ela alcanço mais essa conquista na minha vida, mas sabendo que sempre podemos melhorar.

Ao **professor Jones**, por sua orientação ao longo desses anos, sendo o primeiro a me aceitar no mundo da pesquisa e sempre permitindo experimentar as dúvidas que surgem no meio do caminho científico. Dando suporte a mais esse momento da minha vida com suas palavras, ajuda e jeito descontraído e único.

Ao **Leandro**, que no meio do caminho se tornou meu co-orientador e desde então não deixou um dia sequer de exercer essa função. Sempre pronto a me ajudar, às vezes mais me indagando e fazendo procurar as respostas, mas sempre fazendo entender um pouco mais de como é a ciência, a qual a se baseia na curiosidade e na procura constante pela verdade.

Aos meus amigos de laboratório, **Júlia**, que está nessa caminhada científica comigo quase desde o início e que mais uma vez estamos vencendo as dificuldades de uma nova. A **Priscila**, por toda ajuda e companheirismo, por sempre compartilhar seus conhecimentos. E a todos que participam dessa nossa loucura: **Charles, Tiago, Oscar, Idelson, Rodrigo e Thaiza** e todos outros presentes.

Ao **CNPq**, pelos recursos financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

“Em um lugar escuro nos encontramos e um pouco mais
de conhecimento ilumina nosso caminho”

Mestre Yoda

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	14
Susceptibilidade do eixo HPA à agentes tóxicos	16
Interferentes endócrinos	18
Organoestânicos	19
Justificativa	23
OBJETIVOS	24
Geral	24
Específicos.....	24
MÉTODOS	25
Composto.....	25
Animais experimentais	25
Preparação de tecidos	25
Histomorfometria.....	26
Avaliação de mastócitos	26
Avaliação da densidade de superfície de colágeno	26
Avaliação de atividade de mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- β -d-glicosaminidase (NAG).....	27
RT-PCR quantitativo (qPCR)	28
Avaliação hormonal.....	28
Avaliação de colesterol total	29
Avaliação de deposição de lipídios	29
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	29
Extração de proteínas e imunoblotting.....	30
Ensaio de ânion superóxido	30
Avaliação de estresse de contenção.....	31
Avaliação do <i>feedback</i> negativo por glicocorticoides	31
Análise estatística	32
RESULTADOS	33
Morfologia da hipófise alterada pela exposição ao TBT.....	33
TBT causa inflamação na hipófise de ratas tratadas	33
A deposição de colágeno foi maior na hipófise de ratos TBT	34

Expressão hipotalâmica de mRNA de CRH está aumentada em ratos TBT.....	34
TBT aumenta a expressão hipotalâmica de iNOS	34
Os ratos TBT apresentaram baixa expressão de ACTH e ACTH plasmático basal	35
Expressão aumentada de mRNA de StAR na adrenal em ratos TBT	35
Expressão semelhante da proteína CYP11B1/2 e aumento dos níveis plasmáticos basais de corticosterona em ratos TBT.....	37
TBT induziu anormalidades morfológicas na adrenal	39
Presença de inflamação nas adrenais de ratos TBT.....	39
A deposição de colágeno foi maior em adrenais de ratos TBT.....	40
Aumento dos níveis de colesterol no soro em ratos TBT.....	40
Nível de colesterol, a deposição lipídica e expressão de PPAR γ aumentaram nas adrenais de ratos TBT.....	42
Os níveis de O $_2^-$ na hipófise e nas adrenais e os marcadores apoptóticos foram altamente expressos em ratos TBT	43
Níveis de CRH e ACTH se mantem elevados em ratos TBT durante estresse de contenção	45
Animais ADX tratados com TBT apresentam diferentes níveis de ACTH de acordo com tempo de tratamento	47
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eixo hipotálamo-hipófise adrenal de roedores.	15
Figura 2. Captura de tela Islands 44 Plus TM como anunciado no site Sea Hawk Paints.	21
Figura 3. Histomorfometria e perfil inflamatório da hipófise de ratos CON, TBT15 e TBT30.	37
Figura 4. Avaliação da expressão do CRH e iNOS no hipotálamo, expressão ACTH pituitária, expressão de StAR e CYP11B1/2 na adrenal e os níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona.	38
Figura 5. Histomofometria e perfil inflamatório da adrenal de animais CON, TBT15 e TBT30.	42
Figura 6. Avaliação da acumulação de gotículas de lipídios e análise de Western blot para a proteína PPAR γ nas glândulas adrenais de ratos CON, TBT15 e TBT30.....	45
Figura 7. Análise de estresse oxidativo e apoptose na hipófise e adrenal no animais CON, TBT15 e TBT30.....	47
Figura 8. Estresse de contenção e avaliação feedback negativo de glicocorticoides em ratos CON, TBT15 e TBT30.	48
Figura 9. Modelo do potencial mecanismo de modulação do eixo HPA pelo TBT. ...	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário de efeitos no eixo HPA causados por OTs	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

ADX: Adrenalectomia

CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina

DHE: Dihidroetídio

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDC: Compostos Interferentes Endócrinos

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPA-USA: Agência de Proteção Ambiental Americana

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ES: Espírito Santo

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase

GC: Glicocorticoides

H&E: Hematoxilina e Eosina

HPA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IMO: Organização Marítima Internacional

iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzível

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: Ácido Ribonucleico mensageiro

NAG: n-Acetil- β -d-glicosaminidase

NO: Óxido Nítrico

O₂⁻: Ânion Superóxido

OD: Absorção Ótica

OTs: Organoestânicos

PIB: Produto Interno Bruto

PPAR γ : Receptor ativado por Proliferadores de Peroxissoma gama

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RIA: Radioimunoensaio

StAR: Proteína Reguladora de Esteridogênese Aguda

TBT: Tributilestanho

TBTO: Óxido de bis (tri-n-butilestanho)

TM: Tricrômio de Masson

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

ZF: zona fasciculada

RESUMO

O cloreto de tributilestanho (TBT) é um contaminante ambiental que é utilizado como biocida em tintas anti-incrustantes. Foi demonstrado que o TBT induz efeitos de desregulação endócrina. No entanto, os estudos que avaliam os efeitos do TBT no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) são especialmente raros. O presente estudo demonstra que a exposição ao TBT é criticamente responsável pela função imprópria do eixo HPA de mamíferos, bem como o desenvolvimento de morfologia anormal na glândula pituitária e adrenal. Ratas fêmeas foram tratadas com TBT e a morfofisiologia do eixo HPA foi avaliada. CRH alto, baixa expressão de ACTH e altos níveis plasmáticos de corticosterona foram detectados em ratos TBT. Além disso, o TBT aumenta a expressão da proteína iNOS no hipotálamo de ratos. Anormalidades morfofisiológicas, incluindo inflamação, um balanço redox celular alterado, apoptose e deposição de colágeno nas glândulas pituitária e adrenal, além de aumento na adiposidade e expressão proteica de PPAR γ na adrenal, foram observadas em ratos TBT. Juntos, estes dados fornecem evidências *in vivo* de que TBT leva à dissociação funcional entre CRH, ACTH e corticosterona, que poderia ser associado a inflamação e aumento da expressão de iNOS no hipotálamo. Assim, o TBT exerce efeitos tóxicos em diferentes níveis na função do eixo HPA.

Palavras chave: Tributilestanho; Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; Interferentes endócrinos; Inflamação.

ABSTRACT

Tributyltin chloride (TBT) is an environmental contaminant that is used as a biocide in antifouling paints. TBT has been shown to induce effects of endocrine disruption. However, studies evaluating the effects of TBT on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis are especially rare. The present study demonstrates that exposure to TBT is critically responsible for the inappropriate function of the mammalian HPA axis, as well as the development of abnormal morphology in the pituitary and adrenal gland. Female rats were treated with TBT and the HPA axis morphophysiology was evaluated. High CRH, low ACTH expression and high plasma corticosterone levels were detected in TBT rats. In addition, TBT increases the expression of the iNOS protein in the rat hypothalamus. Morphophysiological abnormalities, including inflammation, altered cellular redox balance, apoptosis and collagen deposition in the pituitary and adrenal glands, in addition to increased adiposity and PPAR γ protein expression in the adrenal, were observed in TBT rats. Together, these data provide *in vivo* evidence that TBT leads to functional dissociation between CRH, ACTH and corticosterone, which could be associated with inflammation and increased iNOS expression in the hypothalamus. Thus, TBT exerts toxic effects at different levels on HPA axis function.

Keywords: Tributyltin; Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; Endocrine disrupting compounds; Inflammation.

INTRODUÇÃO

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é de importância vital para a sobrevivência e desenvolvimento dos mamíferos (AGUILERA, 2011). Participa ativamente da regulação da homeostase, durante todo o período da vida (MOISIADIS; MATTHEWS, 2014a), sendo crítico para o desenvolvimento normal e manutenção da fisiologia metabólica, imunológica, endócrina e reprodutiva dos mamíferos (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; FOWDEN; LI; FORHEAD, 1998). Na placenta, a atividade dos corticoides maternos é essencial, pois participa do processo de maturação de diferentes órgãos que serão necessários após o desenvolvimento do feto (MOISIADIS; MATTHEWS, 2014a). Ao longo da vida, o eixo HPA atua frente a fenômenos que desregulam a homeostase, atuando sobre o organismo para reestabelecer o equilíbrio ou até mesmo nos preparar para o estresse diário (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005).

No hipotálamo é sintetizado o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), uma proteína que coordena a cascata de maturação e ação do eixo HPA. Sintetizado nos corpos celulares dos neurônios do núcleo paraventricular, (BALE; VALE, 2004), o CRH é liberado na circulação porta-hipofisária e alcança a hipófise, na qual atua nos corticotrofos regulando a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A ação do ACTH ocorre, em especial, nas glândulas adrenais (BORNSTEIN; CHROUSOS, 1999; NICOLAIDES et al., 2015). O ACTH é o principal regulador da síntese de glicocorticoides (GC) no córtex adrenal, particularmente na zona fasciculada (ZF). Além disso, ele estimula o crescimento e desenvolvimento normal da glândula adrenal, assim como a formação da cascata de esteroidogênese. No córtex adrenal é sintetizado o cortisol, corticosterona em roedores, que através de sua ação sobre o hipotálamo e os corticotrofos, regula o eixo HPA por um mecanismo de *feedback* negativo (Figura 1) (MOISIADIS; MATTHEWS, 2014a; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

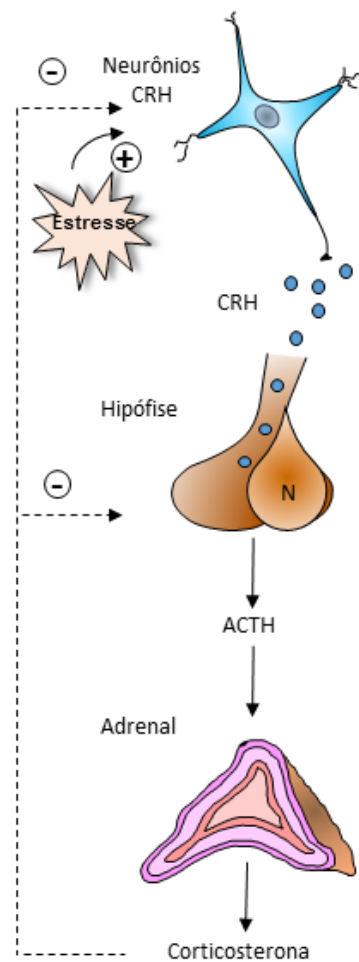


Figura 1. Eixo hipotálamo-hipófise adrenal de roedores. Os neurônios CRH, localizados no hipotálamo, quando estimulados por um estresse produzem e secretam hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual é liberado na circulação porta-hipofisária. Na hipófise o CRH estimula a produção e secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual é liberado na circulação sistêmica. O ACTH atua no córtex adrenal estimulando a produção de corticosterona. A corticosterona atua no organismo regulando o sistema imune e o metabolismo, além disso através do feedback negativo, ele inibe a produção de CRH e ACTH, promovendo um controle da sua produção. Merlo et al., 2017 do acervo pessoal.

A função principal do cortisol é o controle metabólico frente a algum tipo de estresse, seja este fisiológico ou patológico, buscando o reestabelecimento da homeostase

(MUNCK; GUYRE; HOLBROOK, 1984). O cortisol age sobre o balanço energético do organismo, através do aumento da glicose plasmática, devido ao aumento da degradação de glicogênio e formação de glicose a partir de aminoácidos. Além disso, o cortisol possui ação anti-inflamatória, induzindo a síntese de citocinas anti-inflamatórias e inibindo as pró-inflamatórias. O cortisol atua sobre dois receptores nucleares, receptor de glicocorticoides e receptor de mineralocorticoides. Estes receptores encontram-se em diversos órgãos e tecidos, nos quais atuam sobre o processo de transcrição do DNA, regulando diferentes funções tecidos-específicas (KINO; CHROUSOS, 2001; RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

Susceptibilidade do eixo HPA à agentes tóxicos

Estudos toxicológicos indicam que dentre os órgãos com função glandular, a adrenal é a mais afetada, sendo o córtex adrenal mais afetado que a medula (HINSON e RAVEN, 1999; ROSOL *et al.*, 2001). Essa particularidade da glândula adrenal se deve as suas características morfofuncionais, como por exemplo: alta vascularidade, elevada em comparação ao seu tamanho, o que facilita o contato com agentes tóxicos no sangue; alta lipofilicidade, devido à grande quantidade de lipídios armazenados nas zonas corticais esteroidogênicas, aumentando a deposição de compostos lipofílicos; alto teor de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares adrenocorticais sensíveis a danos por peroxidação lipídica; grandes quantidades de enzimas do citocromo P450, que podem gerar radicais livres durante sua atividade, levando a algum prejuízo celular (SZABO E LIPPE, 1989; HARVEY *et al.*, 2007; HARVEY, 2014).

Devido a produção de hormônios esteroides nas zonas corticais da glândula adrenal há presença de acúmulo de lipídios nestas, sendo o precursor destes hormônios o colesterol (CHENG *et al.*, 1998; STOCCO; CLARK, 1996). Estudos demonstram que genes envolvidos na regulação da adipogênese estão envolvidos em vias moleculares comuns no controle da esteroidogênese. Por exemplo, o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), um receptor nuclear pertencente a superfamília dos receptores nucleares, cuja ação celular pode ser classificada como

regulador gênico mestre da adipogênese, está presente na adrenal (ROSEN et al., 2000; TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994; ZHU et al., 2010).

O eixo HPA e a inflamação interagem através de uma regulação mútua. A inflamação ativa o eixo HPA induzindo a produção hormonal, enquanto o cortisol, produto final do eixo HPA, atua inibindo o processo inflamatório (MUNCK; GUYRE; HOLBROOK, 1984). Estudos demonstram que o processo inflamatório na hipófise é mediado por resposta celular e humoral (ROTONDO et al., 2010; VIDAL et al., 2002). As citocinas produzidas por estas células regulam o funcionamento da adenohipófise, inclusive sobre a produção e liberação de ACTH (ARZT et al., 1999). Macrófagos, monócitos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos, estão localizados no interior do córtex adrenal de roedores e humanos (BORNSTEIN; CHROUSOS, 1999). Essas células liberam citocinas que estão presentes em diferentes zonas do córtex adrenal e podem atuar na regulação da sua atividade, como a diferenciação e crescimento das células corticais, na produção de GC independente de ACTH, na inibição do estímulo do ACTH para a síntese GC, entre outros (BORNSTEIN; CHROUSOS, 1999; PÄTH et al., 1997).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbios, levando a concentrações fisiológicas necessárias para a função celular normal. Por outro lado, o excesso de ERO devido a um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, é chamado de "estresse oxidativo" (RAY; HUANG; TSUJI, 2012). A produção celular de ERO tem sido associada com o processo de apoptose ou outros quadros como a inflamação (BUTTKE; SANDSTROM, 1994; HENSON; HUME, 2006; STRIDH et al., 1998). A apoptose, morte celular programada, é um processo associado com a via das caspases, enzimas responsáveis por alterações celulares, como vacuolização do citoplasma e fragmentação de DNA nuclear, que culminam na morte da célula (NAGATA; HANAYAMA; KAWANE, 2010; SALVESEN; DIXIT, 1997; ZHIVOTOVSKY et al., 1997).

Interferentes endócrinos

Existem evidências que a função do eixo HPA pode ser regulada tanto por fatores epigenéticos como ambientais (GORE, 2008; MOISIADIS; MATTHEWS, 2014b). O desenvolvimento da glândula adrenal é, em grande parte, regulada por genes e fatores de transcrição (PARKER; SCHIMMER, 1993; VAL; SWAIN, 2010). Contudo, estudos vêm demonstrando que fatores ambientais podem afetar o desenvolvimento e função do eixo HPA. Dentre os fatores, podem ser citados: estresse na gravidez, o uso de GC exógenos sem controle e a exposição a compostos interferentes endócrinos (EDC) e/ou outros xenobióticos que podem causar má-formação e mau funcionamento do eixo HPA. Tais alterações resultam em doenças crônicas permanentes no indivíduo (HARVEY, 2016; ROSOL et al., 2001; ZHANG et al., 2014).

EDC são um grupo emergente de xenobióticos definidos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA-USA) como: "agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ação de ligação ou eliminação de hormônios transmitidos pelo sangue que estão presentes no corpo e são responsáveis pela homeostase, reprodução, e processo de desenvolvimento" (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; EPA, 1997). Diversos compostos recebem essa definição, como: o bisfenol A, os organoestânicos (OTs), os ftalatos e outros. Presente cada vez em maiores quantidades e variedades no meio ambiente, estes compostos são uma fonte de contaminação aos seres vivos e motivo de desenvolvimento de doenças, bem como disfunções emergentes (BOYER, 1989; JENKINS et al., 2009; LATINI, 2005).

Os custos estimados com saúde no ano de 2010 por conta da exposição aos EDC se encontram na casa de bilhões de euros na Europa. Mesmo com as menores probabilidades de exposição os custos se mantêm altos, 109 bilhões de euros. Esta estimativa sugere que 1,28% do produto interno bruto (PIB) da União Europeia é alocado para gastos com o manejo de casos de exposição a EDC (TRASANDE et al., 2015). Nos Estados Unidos a situação é ainda mais preocupante, na qual a simulação indica que mais de 2% do PIB, aproximadamente 340 bilhões de dólares, são gastos no custeio de doenças causadas pela exposição a EDC (ATTINA et al., 2016). Nessas simulações só são considerados os compostos que apresentam evidências suficientes de indução de desregulações endócrinas em humanos, ou seja, menos de 5% dos compostos.

Organoestânicos

Dentre os EDC, encontram-se os OTs, compostos que caracterizam-se pela presença de uma ou mais ligações entre o átomo de estanho e átomos de carbono (Sn-C) (HOCH, 2001). Estes compostos são aplicados em diversas áreas de atividade humana, como por exemplo, estabilizantes de PVC, biocidas em tintas anti-incrustantes, catalisadores na produção de polímeros, agentes preservativos de madeiras, pesticidas e fungicidas agrícolas, biocidas em materiais de construção e itens de casa, desinfetantes de superfície (incluindo aqueles usados em hospitais e prática veterinária), higienizadores de roupas, repelentes de roedores, detectores de cintilação de raios γ e raios X, aditivos balísticos para combustíveis sólidos de foguetes, ionóforos em eletrodos seletivos de íons de membrana líquida e fármacos, por exemplo, anti-inflamatórios e drogas para o tratamento de câncer (ROSENBERG, 2013; SOUSA et al., 2014).

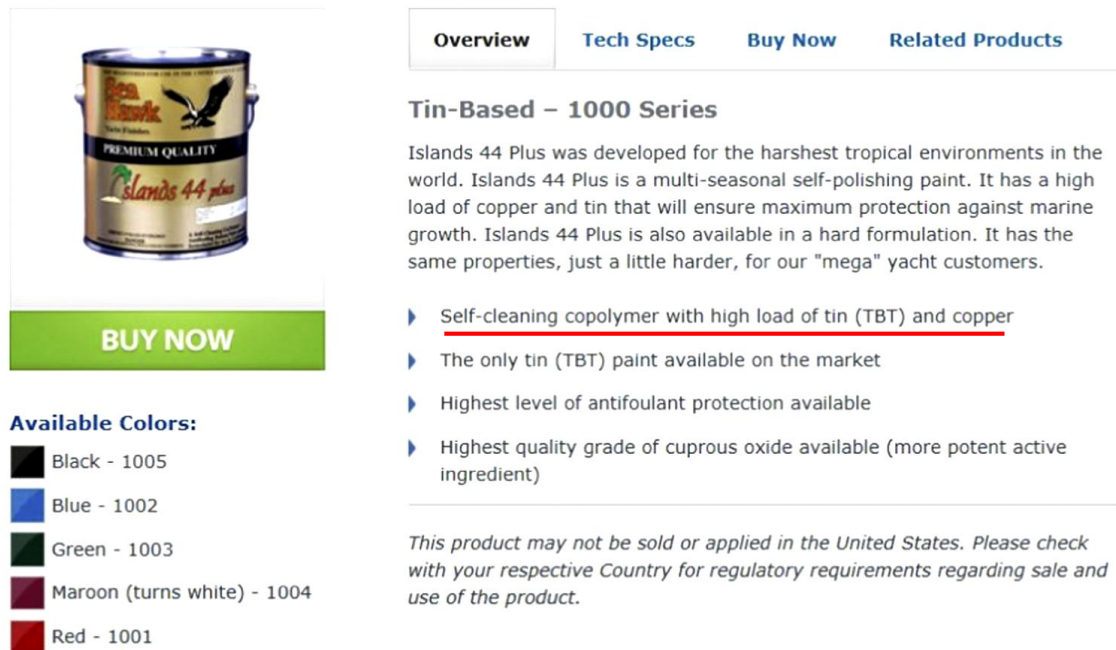
Dentre esses diversos usos dos OTs, uma forma ganhou grande destaque a partir da década de 1950, a aplicação em tintas anti-incrustantes. Estas tintas são aplicadas nos cascos de navios para evitar incrustações de algas, mexilhões e outros organismos nas embarcações, pela sua atividade biocida, tendo como composto principal o tributilestanho (TBT) (BRYAN et al., 1986; GRACELI et al., 2013). O uso de TBT nas tintas gerou uma renda na ordem de bilhões (SOUSA et al., 2014). Entretanto por volta da década de 1970 surgiram as primeiras evidências de efeitos tóxicos do uso de TBT em tintas anti-incrustantes sobre organismos não alvos (ALZIEU, 1998). Na Inglaterra o pesquisador Blaber (1970) encontrou sinais de alterações na anatomia do gastrópode *Nucella lapillus*, as quais se caracterizavam pelo surgimento de órgãos sexuais masculinos em indivíduos fêmeas, este fenômeno foi denominado imposex, sendo comprovado posteriormente que a causa era a exposição a TBT. Desta forma foram descobertos os efeitos tóxicos de TBT sobre a biota marinha (MATTHIESSEN, 2013).

As primeiras regulamentações adotadas para o uso do TBT como biocida nas tintas anti-incrustantes surgiram em 1982, pelo Ministério Francês do Ambiente, com a finalidade de reduzir sua utilização (ALZIEU, 1998). Entretanto, esta diminuição não

foi generalizada devido à importância econômica dessas tintas para as indústrias que utilizam o transporte marítimo (LIU et al., 1997). Com o passar do tempo, o TBT, bem como sua bioacumulação no ambiente, apresentou elevada toxicidade sobre várias espécies, o que gerou a adoção de uma série de restrições em vários países (DORNELES et al., 2008; MATTHIESSEN; GIBBS, 1998; WHALEN; LOGANATHAN; KANNAN, 1999). Em 2001, a IMO (International Maritime Organization) adotou um decreto, segundo o qual, tintas com TBT teriam que ser removidas ou seladas dos cascos das embarcações até janeiro de 2008 (IMO, 1999).

Entretanto, alguns destes decretos não impedem a produção e comercialização de tintas anti-incrustantes com TBT, eles apenas solicitam que os fabricantes parem voluntariamente a produção (SONAK et al., 2009), como pode ser verificado no endereço eletrônico de um fabricante norte-americano (Figura 2; <https://www.seahawkpaints.com/product/islands-44-plus/>) (TURNER; GLEGG, 2014). Além disso, o decreto criado pela Organização Marítima Internacional (IMO) só alcançou aceitação global recentemente por volta de 2010 (IMO, 2017), quando os países que possuem quase 100% da frota naval concordaram com esta ação de regulação, o que gera uma preocupação com a persistência do TBT no ambiente, já que estudos indicam que este pode persistir por 20 anos no sedimento em condições favoráveis (SWENNEN et al., 1997). Porém, em muitos países em desenvolvimento sabe-se que a regulamentação, fiscalização e cumprimento do decreto não ocorre da forma desejada (CHAMP, 2003; SANTOS *et al.*, 2011). Somado ao fato do problema de retirada das tintas dos navios, que geram resíduos contaminados com TBT, os quais não possuem a devida atenção no decreto da IMO e podem ser uma fonte de contaminação do meio ambiente (SONAK et al., 2009). Estes detalhes somados geram uma preocupação com a real situação da contaminação ambiental pelo TBT.

Islands 44 Plus™



Overview Tech Specs Buy Now Related Products

Tin-Based – 1000 Series

Islands 44 Plus was developed for the harshest tropical environments in the world. Islands 44 Plus is a multi-seasonal self-polishing paint. It has a high load of copper and tin that will ensure maximum protection against marine growth. Islands 44 Plus is also available in a hard formulation. It has the same properties, just a little harder, for our "mega" yacht customers.

- ▶ Self-cleaning copolymer with high load of tin (TBT) and copper
- ▶ The only tin (TBT) paint available on the market
- ▶ Highest level of antifoulant protection available
- ▶ Highest quality grade of cuprous oxide available (more potent active ingredient)

This product may not be sold or applied in the United States. Please check with your respective Country for regulatory requirements regarding sale and use of the product.

Available Colors:

- Black - 1005
- Blue - 1002
- Green - 1003
- Maroon (turns white) - 1004
- Red - 1001

Figura 2. Captura de tela Islands 44 Plus™ como anunciado no site Sea Hawk Paints. <https://www.seahawkpaints.com/product/islands-44-plus/> Acessado em agosto de 2017.

No Brasil, diferentes estudos vêm demonstrando ao longo do tempo o perfil de contaminação por TBT no litoral brasileiro (DE CASTRO *et al.*, 2008; DE CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012; FERNANDEZ *et al.*, 2002). No Estuário de Santos foi encontrada a presença de TBT em crustáceos que foram coletados próximo a áreas de atividade naval, como ancoragem e docagem (CRISTALE *et al.*, 2012). No sul da Bahia foi demonstrada a presença de gastrópodes afetados pelo fenômeno imposex, o qual é caracterizado como um indicador da contaminação por TBT (ZEIDAN; BOEHS, 2017). Já no Espírito Santo (ES) investigações demonstraram níveis preocupantes de contaminação por OTs no litoral do ES utilizando espécies indicadoras, como as fêmeas do gastrópode *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (COSTA *et al.*, 2008), além de contaminação de outras espécies como *Littoraria angulifera* em estudo mais recente (COSTA *et al.*, 2013). Demonstrando assim a presença do TBT em grande parte do litoral brasileiro.

Ademais, um agravante deste quadro é a possibilidade de biotransferência deste agente químico para outros níveis tróficos e, possivelmente para o ecossistema terrestre (FERNANDEZ *et al.*, 2005), sugerindo um risco potencial para saúde dos seres humanos, principalmente decorrente da ingestão de alimentos marinhos contaminados por OTs, pela população ribeirinha (GUÉRIN *et al.*, 2007), como evidenciado pelo nosso grupo o prejuízo observado sobre o sistema reprodutor de ratas férteis, devido ao consumo de mariscos contaminados por OTs (PODRATZ *et al.*, 2015).

Diversos estudos demonstraram que a exposição ao TBT desencadeia uma toxicidade complexa em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (BERTULOSO *et al.*, 2015; BOYER, 1989; GROTE *et al.*, 2004; MITRA *et al.*, 2013). Estudos mostraram ação imunotóxica do TBT sobre diferentes tipos de células imunes de ratos e humanas (GENNARI *et al.*, 2000; STRIDH *et al.*, 1998, 2001). Em modelos *in vitro* e *in vivo*, o TBT demonstrou ação citotóxica e prejudicial de células neuronais de diferentes áreas cerebrais, com formação de ERO e morte celular (ISHIHARA *et al.*, 2012; MITRA *et al.*, 2013; MITRA; SIDDIQUI; KHANDELWAL, 2015).

Além dos efeitos citados anteriormente o TBT tem grande influência sobre o eixo reprodutivo. A exposição de ratos a diferentes doses de TBT causou o retardo da separação prepucial, alteração do peso de órgãos reprodutivos, redução da concentração de testosterona plasmática e de hormônio luteinizante (GROTE *et al.*, 2004). Em ratas foi demonstrado que o TBT interfere no equilíbrio dos hormônios sexuais, desregula o ciclo estral de ratas férteis e reduziu o peso dos ovários (PODRATZ *et al.*, 2012). Somado a isso o TBT desregulou o controle neural do eixo reprodutivo, além de causar inflamação no útero e reduzir a fertilidade desses animais (SENA *et al.*, 2017).

Dentre todas as outras ações tóxicas, os efeitos metabólicos do TBT requerem atenção por sua gravidade. O TBT é capaz de ativar o receptor PPAR γ , que é responsável pelo controle de adipogênese e lipogênese, o que o caracteriza como um obesogênico (GRÜN *et al.*, 2006). Sendo ele capaz de ativar a adipogênese em todas as idades e ambos os sexos (PENZA *et al.*, 2011). Além disso, o TBT é capaz de causar inflamação e esteatose no fígado, aumentar os níveis de insulina, causar resistência à insulina e diminuir a tolerância a glicose, além de aumentar a

adiposidade, com hipertrofia do tecido adiposo e inflamação neste, que caracterizam um quadro de obesidade (BERTULOSO et al., 2015).

Justificativa

Apesar de haver estudos relacionados tanto à alterações metabólicas e da reprodução, ainda existem poucos estudos que avaliam a atividade tóxica dos OTs em relação ao eixo HPA de mamíferos (FUNAHASHI; IWASAKI; IDE, 1980; KRAJNC et al., 1984; WESTER et al., 1990). Em especial, embora já se tenha comprovado a ação tóxica do TBT sobre diferentes glândulas do sistema endócrino, se comportando como um EDC, a sua ação sobre o eixo HPA foi vagamente avaliada. Trabalhos *in vitro* com células adrenais bovinas demonstraram que o TBT afeta a biossíntese de hormônios adrenais, suprimindo a secreção de cortisol e androstenediona e induzindo a secreção de hidroxiprogesterona (YAMAZAKI et al., 2005). Estudos usando o modelo do “zebrafish”, em larvas e na forma de vida adulta, demonstraram que a exposição ao TBT afetou a sinalização dos GC, atuando como antagonista de seus receptores (WEGER et al., 2012).

Apesar destas descobertas de ações desreguladoras endócrinas do TBT e da alta susceptibilidade da adrenal a agentes tóxicos, como o próprio TBT, poucos estudos avaliaram a relação entre a exposição ao TBT e a função do eixo HPA de mamíferos (WESTER et al., 1990; YAMAZAKI et al., 2005).

No presente estudo, foi avaliado se o TBT, mesmo em dose abaixo do limite preconizado pela EPA-USA, 300 ng/kg, (EPA, 1997), interfere na morfonfuncionalidade do eixo HPA causando uma provável alteração do *feedback* do mesmo, que pode como consequência levar tanto a alterações metabólicas, como obesidade ou diabetes, e problemas reprodutivos, como síndrome do ovário policístico e infertilidade.

OBJETIVOS

Geral

Investigar a possível ação tóxica do composto TBT sobre o perfil hormonal e mecanismo de *feedback* do eixo HPA em ratas férteis.

Específicos

Avaliar os efeitos da exposição ao TBT sobre os seguintes parâmetros do eixo HPA:

- Morfometria da hipófise e adrenal;
- Resposta imunológica;
- Acúmulo de lipídios na adrenal;
- Balanço redox e morte celular;
- Esteroidogênese do córtex adrenal;
- Produção hormonal;
- Mecanismo de *feedback*.

MÉTODOS

Composto

Utilizou-se o Cloreto de tributilestanho – TBT - (96%; Sigma), o qual foi dissolvido em 0,4% de etanol, baseado em protocolos de estudos prévios (BERTULOSO *et al.*, 2015; PODRATZ *et al.*, 2012). O reagente usado era de grau analítico.

Animais experimentais

Ratas Wistar adultas (12 semanas de idade) foram mantidas em temperatura controlada entre 23-25°C com um ciclo de claro-escuro de 12/12h. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos protocolos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (106/2011). No estudo foram usados 138 animais. Estes foram divididos em 3 grupos: controle (CON; n = 22), tratados diariamente com veículo (0,4% etanol); TBT15 (TBT15; n = 22) e TBT30 (TBT30; n = 22) tratados diariamente com TBT (100 ng/kg/dia) por 15 e 30 dias respectivamente, por gavagem. Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (91 e 9,1 mg/kg, ip) antes da eutanásia, e os órgãos úmidos foram pesados. A dose e via de exposição foram escolhidas baseadas em protocolos prévios pelo laboratório (RODRIGUES *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2012) para estabelecer níveis séricos de estanho (BERTULOSO *et al.*, 2015). Além disso, a dose de TBT utilizada neste estudo (100 ng/kg) foi 3 vezes menor que o limite diário tolerável de 300 ng/kg para humanos estabelecido pela EPA-USA (EPA, 1997).

Preparação de tecidos

As adrenais e hipófise foram removidas e fixadas em paraformaldeído tamponado (4%; pH 7,4) por 24-48h a temperatura ambiente. Os órgãos preparados em parafina forma seccionados em cortes de 7 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) (PEREIRO *et al.*, 2014; XIA *et al.*, 2014). A adenohipófise e a glândula adrenal foram referenciadas como hipófise e adrenal, respectivamente, ao longo deste estudo.

Processamento do tecido e análise microscópica foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Antônio Redins, UFES.

Histomorfometria

O sistema de análise de imagem histomorfométrica era composto de uma câmera digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc) acoplada a um microscópio de luz (Olympus AX70; Olympus). Imagens de alta resolução (2048-1536 pixels) foram obtidas usando Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8. Fotomicrografias foram obtidas usando objetiva de 10x, e a área do córtex e da medula adrenal foram mensuradas usando a ferramenta de medida de área do Axio Vision Rel. 4.8. (DOMENICI LOMBARDO; CORTESINI, 1990).

Avaliação de mastócitos

Cortes de hipófise e adrenal foram corados com Alcian Blue de acordo com o protocolo padrão (Sigma-Aldrich Co, LLC). Cada corte de 7 μm foi usado para obter 20 fotomicrografias (objetiva 40x). O número de células com coloração positiva (ie. Células contendo grânulos citoplasmáticos roxos) no tecido foi avaliado. As áreas analisadas foram selecionadas aleatoriamente, com exceção de campos contendo vasos sanguíneos de tamanho médio foram evitadas. O número de células coradas foi expresso por unidade de área (mm^2), como descrito em estudos prévios (BERTULOSO et al., 2015).

Avaliação da densidade de superfície de colágeno

Cortes de hipófise e adrenal foram corados com Tricrômio de Masson (TM) e usados para obter 15 fotomicrografias usando a objetiva de 20x. As áreas da hipófise foram selecionadas aleatoriamente e as áreas contendo a neurohipófise foram evitadas. Os

campos aleatórios de cada órgão foram analisados usando ImageJ. As imagens foram convertidas em imagens de alto contraste preta e brancas para visualizar as áreas coradas de colágeno. Os resultados representam a porcentagem de colágeno depositado na área total de córtex adrenal e hipófise (RODRIGUES et al., 2014).

Avaliação de atividade de mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-β-d-glicosaminidase (NAG)

O número de neutrófilos na hipófise e adrenal foram mensurados pela avaliação de atividade de MPO, como previamente descrito (ARAÚJO et al., 2010). Os órgãos foram pesados, homogeneizados em tampão pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄ e 0,015 M NaEDTA) e centrifugados. Os pellets foram então suspensos em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5%, seguido por 3 ciclos de congelamento e descongelamento usando N₂(l) e centrifugados. Atividade de MPO no sobrenadante das amostras foi avaliada pela medida da mudança de absorção óptica (OD) em 450 nm usando tetrametilbenzeno (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM). A reação foi terminada pela adição de 50 mL de H₂SO₄ (4 M). Os resultados são expressos como mudança de OD/μg de proteína.

A infiltração de células mononucleares na hipófise e adrenal foi quantificada pela medida do nível da enzima lisossomal NAG, a qual está presente em altos níveis em macrófagos ativados (BARCELOS et al., 2005). A hipófise e adrenal foram homogeneizadas em salina 0,9% contendo Triton X-100 0,1% vol/vol (Promega) e depois centrifugados. Uma amostra do sobrenadante foi incubada por 10 minutos com 100 mL de p-nitrofenil-n-acetil-β-d-glicosamida (Sigma-Aldrich Co, LLC) que foi preparada em tampão citrato/fosfato (0,1M ácido cítrico e 0,1 M Na₂HPO₄; pH 4,5) para atingir uma concentração final de 2,24 mM. A reação foi terminada adicionando 100 mL de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6). Hidrólise do substrato foi determinado pela mensuração da absorção em 400 nm. Os resultados são expressos como nmol/μg de proteína.

RT-PCR quantitativo (qPCR)

qPCR em tempo real foi realizado para determinar o nível de expressão de mRNA de CRH no hipotálamo e mRNA da proteína reguladora de estereidogênese aguda (StAR) nas adrenais. Os animais foram decapitados, seus cérebros dissecados e armazenados a -80°C até a quantificação seguindo o protocolo descrito por Quennell et al (2011).

Resumidamente, o hipotálamo inteiro foi dissecado seguindo os limites: lateralmente 2 mm de cada lado do terceiro ventrículo do quiasma óptico até a borda posterior dos corpos mamilares e do tálamo dorsal.

RNA foi isolado dos tecidos usando TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo do fornecedor. Um micrograma de RNA foi reversamente transcrito usando um iScript kit (Bio-Rad Laboratories). qPCR em tempo real foi realizado em triplicata usando o SYBR Green MasterMix (Bio-Rad Laboratories). Os primers usados para amplificar o CRH foram: sense primer 5'-TGAGGGAAGTCTTGGAATGG-3', e antisense primer, 5'-CAGAGCTGCAGTATGGTACAG-3'. Os primers usados para amplificar a StAR foram: sense primer 5'-AAGGTTTCATAGATA CCTGTCCCTTAA-3', e antisense primer, 5'-AGGAAAACAGAACTGAGGCTTAGAATA-3'. β -actin RNA foi usada como controle interno para cDNA, sense primer 5'-ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3', e antisense primer 5'-GCCGTGTTCAATGGGGTACT-3'. A quantificação relativa da expressão de mRNA foi analisada via método de ciclo de limiar $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Avaliação hormonal

Para quantificar os níveis basais de ACTH e corticosterona, amostras de plasma foram obtidas de ratos os quais foram eutanaziados por decapitação sem anestesia entre 08:00 e 09:00h (VAHL et al., 2005). Níveis de ACTH foram quantificados usando kit de ELISA (2244 EIA-3647; DRG Instruments GmbH) em um leitor de absorção de microplaca Elx808 (BioTek Instruments, Inc). Uma curva padrão foi gerada usando 5 diluições seriadas do hormônio de referência fornecidas pela DRG Instruments GmbH. Baixo e alto controles de qualidade foram usados em cada leitura para calcular o coeficiente de variação. O limite de detecção para ACTH era de 0,22 pg/mL. O coeficiente de variação inter-ensaio para cada ensaio foi entre 2,3% e 6,7%. O

coeficiente de variação entre ensaios para cada ensaio foi entre 6,9% e 7,1%. Níveis de corticosterona foram avaliados usando o kit de Radioimunoensaio (07-120102 ICN corticosterona RIA; MP Biomedical) com o limite de detecção de 7.7 ng/mL. O coeficiente de variação inter-ensaio para cada ensaio foi entre 4,4% e 10,3%. O coeficiente de variação entre ensaios para cada ensaio foi entre 6,5% e 7,1%.

Avaliação de colesterol total

Para avaliar o colesterol total sérico e na adrenal, amostras de soro e adrenal foram obtidas e os níveis de colesterol foram quantificados usando um kit colorimétrico de acordo com o protocolo do fabricante (Bioclin).

Avaliação de deposição de lipídios

Adrenais foram dissecadas, embebidas em Tissue-Tek CRYOOCT (Fisher Scientific), congeladas e cortadas na espessura de 7 μ m usando um criostato (Jug CM1800; Leica). Para cada animal, as adrenais foram montadas em lâminas revestidas com gelatina e coradas usando Oil Red O (Sigma-Aldrich). Gotículas de lipídios foram quantificadas usando um microscópio Olympus acoplado a uma câmera Evolution e um sistema de análise de imagens (ImageJ, domínio público). A área das gotículas de lipídios por secção é expressa como a porcentagem da área do córtex adrenal que foi analisada (BERTULOSO et al., 2015).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Amostras de adrenal foram prefixadas em fixador de glutaraldeído 2% (em PBS pH 7,4 por 10h a 4°C) e pósfixadas em fixador tetróxido de ósmio 1% (em PBS pH 7,4 por 30 min em 4°C). Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries graduadas de acetona e embebidas em epon. Seções ultrafina, 50-60 nm, foram cortadas no micrótomo Power Tomex (RMC product). As seções foram montadas numa grade de cobre e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As seções de tecido foram examinadas usando um JEOL (JEM-1400) (PEREIRO et al., 2014).

Extração de proteínas e imunoblotting

O hipotálamo, hipófise e adrenal foram homogeneizadas em tampão de lise e proteína total foi obtida (BERTULOSO et al., 2015). Resumidamente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de tris-glicina (Bio-Rad Laboratories). As membranas foram incubadas por uma noite com bloqueador contendo leite em pó desnatado 5% em tampão tris com 0,1% de Tween 20 e anticorpos específicos (Bio-Rad Laboratories). Os anticorpos primários foram anticaspase-3 (sc7148, 1:500; SCBT, Inc), anti-ACTH (AB902, 1:800; Chemicon International), anti- β -actina (sc130657, 1:1000; SCBT, Inc), anti-PPAR γ (sc7273, 1:500; SCBT, Inc), anti-CYP11B1/2 (sc28205, 1:500, SCBT, Inc), anti-óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (BD-610329; BD Transduction Laboratories), e antigliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (sc25778, 1:1000; SCBT, Inc). Anticorpo de cabra anti-coelho IgG conjugada a fosfatase alcalina (A3687, 1:1000; Sigma-Aldrich Co, LLC) foi usado como anticorpo secundário para todos os ensaios de imunoblotting exceto por PPAR γ e iNOS que foram detectados usando o anticorpo secundário anti-camundongo IgG conjugado a fosfatase alcalina (A3562, 1:1000; Sigma-Aldrich Co, LLC). As membranas para iNOS, ACTH, CYP11B1/2, PPAR γ e caspase-3 e seus respectivos β -actina e GAPDH controles foram visualizados usando uma reação colorimétrica contendo cloreto de tetrazolio nitroazul e sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfatase-*p*-toluidina (sc24981; SCBT, Inc). As bandas de iNOS, ACTH, CYP11B1/2, PPAR γ , caspase-3, GAPDH e β -actina foram analisadas por densitometria usando o software ImageJ. Expressão relativa foi normalizada pela divisão dos valores da proteína de interesse pelo valor do controle interno correspondente.

Ensaio de ânion superóxido

Para detectar os níveis do ânion superóxido (O_2^-), criosecções (8 μ m) do tecido da hipófise e da adrenal embebidos em OCT foram descongelados e incubados com o corante fluorescente sensível a O_2^- dihidroetídio (DHE) a 37°C por 30 minutos no

escuro (RODRIGUES et al., 2014). Imagens foram obtidas usando um microscópio Leica com detector de fluorescência a 585 nm (DM 2500). A intensidade do sinal, indicando a produção de O_2^- , foi analisada na área de interesse em 20 secções do órgão por um estudo cego. Processamento e análise microscópica foram realizados no Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica, UFES. Os níveis de O_2^- indicam estresse oxidativo.

Avaliação de estresse de contenção

Estresse de contenção foi realizado entre 08:00 e 09:00h por até 30 minutos. Outro conjunto de ratos dos grupos CON, TBT15 e TBT30 (n = 20 por grupo) foram colocados individualmente num tubo horizontal perfurado Plexiglas com movimento parcial permitido (FELSZEGHY; BAGDY; NYAKAS, 2000). Amostras de sangue foram coletadas antes do processo de estresse para estimar os níveis basais de ACTH (tempo 0, n = 5 por grupo). Amostras de sangue também foram coletadas nos tempos de 15 (n = 5 por grupo) e 30 (n = 5 por grupo) minutos de estresse e 30 minutos após o termino do procedimento de estresse (n = 5 por grupo). Para quantificar os níveis de ACTH, amostras de plasma foram coletadas dos ratos submetidos ao processo de estresse; os animais foram eutanasiados por decapitação sem anestesia (VAHL et al., 2005). Para análise do mRNA de CRH por RT-qPCR no hipotálamo, os cérebros foram obtidos dos ratos submetidos a 30 minutos de estresse; animais foram decapitados e dissecados seguindo o protocolo descrito acima (QUENNELL et al., 2011).

Avaliação do *feedback* negativo por glicocorticoides

Para avaliar a *feedback* negativa por GC outro conjunto de ratas de 12 semanas de idade foram anestesiadas por ketamina e xylazina, e uma bilateral adrenalectomia (ADX) (n = 12) foi realizada por uma incisão dorsal (SPANSWICK; EPP; SUTHERLAND, 2011). Imediatamente após a cirurgia, todos ratos foram tratados com penicilina (0,2 mL, 300.000 UI im) e buprenorfina (0,05 mg/kg, ip) profilaticamente para infecção e dor pós-cirúrgica. Para manter o equilíbrio eletrolítico, ratos ADX receberam salina 0,9% para beber pelo restante do experimento. Após um período de 7 dias para recuperação, os ratos ADX foram tratados como os grupos CON, TBT15 e TBT30

citados acima (n = 4 por grupo). Sangue foi coletado por decapitação sem anestesia e amostras de plasma foram coletadas e armazenadas em -80°C até a quantificação de ACTH foi realizada como descrita acima. Em adição, avaliação de mRNA CRH hipotalâmico foi realizada usando RT-qPCR como descrito anteriormente. Os animais considerados intactos não sofreram qualquer tipo de manipulação cirúrgica,

Análise estatística

Todos dados foram expressos como a média \pm EPM. O teste de normalidade usado para avaliar os dados foi o D'Agostino e Pearson omnibus. Comparações entre grupos foram realizadas usando ANOVA de uma e duas vias para dados Gaussianos (teste de comparação múltipla Tukey). Para dados não Gaussianos nós usamos o teste de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Dunn. $p < 0,5$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Morfologia da hipófise alterada pela exposição ao TBT

Para caracterizar os efeitos da exposição ao TBT, foram avaliadas a anatomia e histologia da hipófise (Figura 3). Um pequeno aumento no tamanho da hipófise foi observado em ratas expostas ao TBT (Figura 3A, n = 5). O peso da hipófise aumentou 14 e 37% nos grupos TBT15 e TBT30, respectivamente. Esse aumento observado no grupo TBT30 foi significativamente diferente somente comparado aos ratos CON (CON: $11,08 \pm 0,74$; TBT15: $12,64 \pm 0,80$; TBT30: $15,12 \pm 1,40$ mg, n=5, $p < 0,05$, Figura 3B). A análise histológica da hipófise demonstrou que as ratas do grupo CON apresentaram todos os tipos de células cromófilas (acidófilas e basófilas) e células intercaladas com capilares (Figura 3C e C1, n = 5). A presença de células cromóforas é indicada na figura pela ponta de flecha. A hipófise de ambos os grupos TBT exibiram anormalidades morfológicas, como a presença de hiperplasia, mitose (indicado pela seta na figura 3), e desorganização das células (Figura 3D, D1, E e E1, n = 5).

TBT causa inflamação na hipófise de ratas tratadas

Capilares intensamente corados rodeados por infiltrados de células inflamatórias entre o ácino da hipófise foram observadas nas hipófises de ambos grupos TBT (indicado com um asterisco na figura 3). Um aumento na atividade de MPO na hipófise foi observado em ratos TBT30 em comparação com CON (CON: $3,03 \pm 0,53$; TBT15: $4,02 \pm 0,31$; TBT30: $5,23 \pm 0,16$ OD/ μ g, n=5, $p < 0,01$, Figura 3F). Atividade de MPO na hipófise foi similar entre ratos CON e TBT15, e ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$). Atividade de NAG na hipófise foi maior em ratos TBT30 comparada com ratos CON (CON: $1,25 \pm 0,10$; TBT15: $1,60 \pm 0,35$; TBT30: $3,19 \pm 0,72$ nmol/ μ g, n=5, $p < 0,05$, Figura 3G), e também foi maior quando comparado entre ratos TBT30 e TBT15. Atividade de NAG na hipófise foi similar nos ratos CON e TBT15 ($p > 0,05$). Em adição, mastócitos na hipófise foram observados em ratos CON, TBT15 e TBT30 usando a coloração de *Alcian Blue* (Figura 3H, H1, I, I1, J e J1). Entretanto, observou-se aumento de mastócitos na hipófise de ratos de ambos grupos TBT. O número de mastócitos na hipófise foi maior nos ratos de ambos grupos TBT em comparação com os ratos do grupo CON (CON: $0,31 \pm 0,03$; TBT15: $0,40 \pm 0,02$; TBT30: $0,45 \pm 0,02$

mastócitos/mm², n=5, p < 0,05, Figura 3H, H1, I, I1, J, J1 e K, seta). Não foi encontrado diferença no número de mastócitos na hipófise dos ratos TBT15 e TBT30 (p > 0,05).

A deposição de colágeno foi maior na hipófise de ratos TBT

A avaliação da deposição de colágeno da hipófise também foi realizada em ratos CON, TBT15 e TBT30 utilizando a coloração TM (Figura 3L, M e N). A densidade de superfície do colágeno em ambos os grupos de ratos TBT foi maior que a densidade em ratos CON (CON: 7,23 ± 0,34; TBT15: 9,23 ± 0,64; TBT30: 9,37 ± 0,62%, n = 5, p < 0,05, Figura 3O). Não houve diferença significativa na densidade superficial de colágeno na hipófise entre ratos TBT15 e TBT30 (p > 0,05).

Expressão hipotalâmica de mRNA de CRH está aumentada em ratos TBT

O mRNA de CRH foi avaliado em amostras de tecido hipotalâmico do grupo CON e em ambos os grupos de ratos tratados com TBT (Figura 4). O mRNA de CRH foi aproximadamente 70-90% maior no tecido hipotalâmico de ratos tratados com TBT em comparação com o tecido de ratos de controle (n = 4, p < 0,05, Figura 4A). Não foram observadas diferenças significativas no mRNA hipotalâmico de CRH entre ratos TBT15 e TBT30 (p > 0,05).

TBT aumenta a expressão hipotalâmica de iNOS

A expressão da proteína iNOS foi avaliada no hipotálamo de ratos controle e em ambos os grupos de ratos TBT. Observou-se um aumento na expressão da proteína iNOS em ratos TBT30 em comparação com ratos CON (CON: 1,00 ± 0,04, TBT15: 1,11 ± 0,09, TBT30: 1,28 ± 0,07, n = 5, p < 0,05, Figura 4B). Não foram detectadas diferenças significativas na expressão da proteína iNOS hipotalâmica entre os ratos CON e os ratos TBT15 ou entre ratos TBT15 e TBT30 (p > 0,05).

Os ratos TBT apresentaram baixa expressão de ACTH e ACTH plasmático basal

Determinou-se a expressão de ACTH hipófise utilizando a análise de Western Blot (Figura 4). A expressão de ACTH na hipófise foi menor em ratos TBT15 e TBT30 do que em ratos CON (CON: $1,03 \pm 0,03$; TBT15: $0,84 \pm 0,06$; TBT30: $0,79 \pm 0,08$, $n = 5$, $p < 0,05$, Figura 4). Não houve diferença significativa na expressão da hipófise entre os ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$). Foi realizado um ensaio ELISA e foram avaliados os níveis plasmáticos de ACTH. Observou-se uma redução dos níveis plasmáticos basais de ACTH nos ratos TBT15 e TBT30 em comparação com os níveis nos ratos CON (CON: $34,54 \pm 3,69$, TBT15: $22,10 \pm 2,96$, TBT30: $14,28 \pm 1,59$ pg/mL, $n = 5$, $p < 0,01$, Figura 4D). Não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de ACTH entre os ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$).

Expressão aumentada de mRNA de StAR na adrenal em ratos TBT

O mRNA de StAR foi avaliado em amostras de tecido de córtex adrenal de ratos de controle e tratados com TBT. O mRNA de StAR no tecido adrenal foi maior em ambos os grupos de ratos expostos ao TBT do que nos ratos CON ($n = 4$, $p < 0,05$, Figura 4E). Não foram detectadas diferenças significativas no mRNA de StAR adrenal entre ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$).

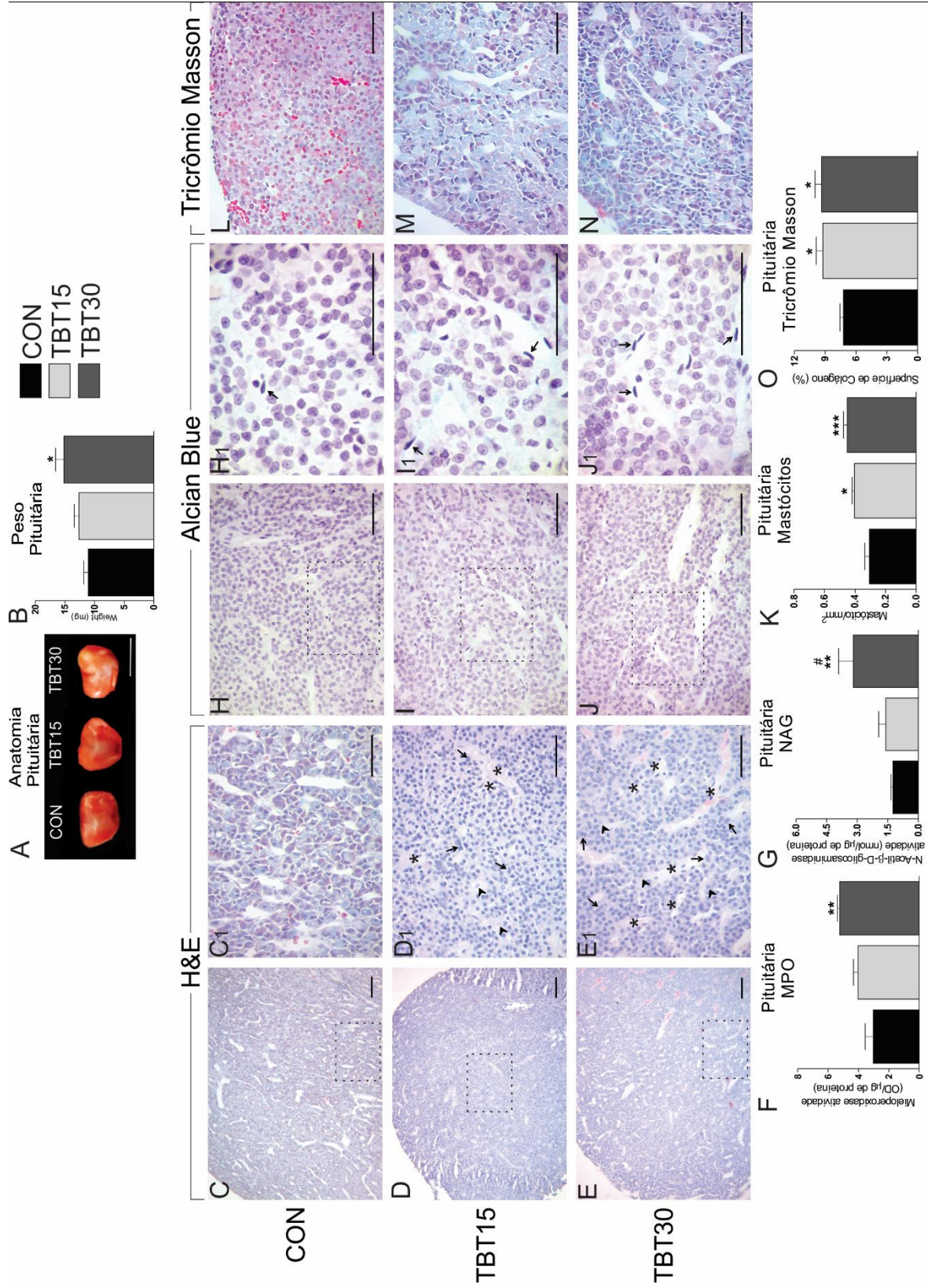


Figura 3. Histomorfometria e perfil inflamatório da hipófise de ratos CON, TBT15 e TBT30. (A) Anatomia da pituitária; (B) Efeito do TBT no peso da pituitária; Fotomicrografia da pituitária. Coloração H&E (C e C1) Controle; (D e D1) TBT 15; (E e E1) TBT 30; (F) Efeito do TBT sobre a atividade de MPO na pituitária; (G) Efeito do TBT sobre a atividade de NAG pituitária; Coloração Alcian Blue (H e H1) Controle; (I e I1) TBT 15; (J e J1) TBT 30; (K) Efeito do TBT sobre a presença de mastócitos na pituitária; Coloração TM (L) Controle. (M) TBT 15; (N) TBT 30; (O) Efeito do TBT sobre a deposição de colágeno na pituitária. Dados foram expressos como Média \pm EPM. $n = 4$. $p < 0,05$. Barra: 50 μm . Asterisco: célula inflamatória; Ponta de flecha: célula cromófoba; Seta: binucleação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle, ## $p < 0,01$ vs TBT15.

Expressão semelhante da proteína CYP11B1/2 e aumento dos níveis plasmáticos basais de corticosterona em ratos TBT

A análise de Western blot foi realizada e a expressão da proteína CYP11B1/2 foi avaliada nas glândulas adrenais (Figura 4). Não houve diferença significativa na expressão da proteína CYP11B1/2 nas adrenais entre ratos TBT e ratos CON ou entre os dois grupos de ratos TBT (CON: $1,00 \pm 0,02$; TBT15: $1,01 \pm 0,01$; TBT30: $1,04 \pm 0,04$, $n = 5$, $p > 0,05$, Figura 4F). Foi também realizado um ensaio de RIA, e foram avaliados os níveis plasmáticos de corticosterona. Observou-se aumento dos níveis basais de corticosterona plasmática em ambos os grupos de ratos TBT em comparação com os níveis nos ratos CON (CON: $285,08 \pm 23,36$; TBT15: $717,67 \pm 66,47$; TBT30: $851,68 \pm 87,14$ ng/mL, $n = 5$, $p < 0,001$, Figura 4G). Não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de corticosterona entre os ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$).

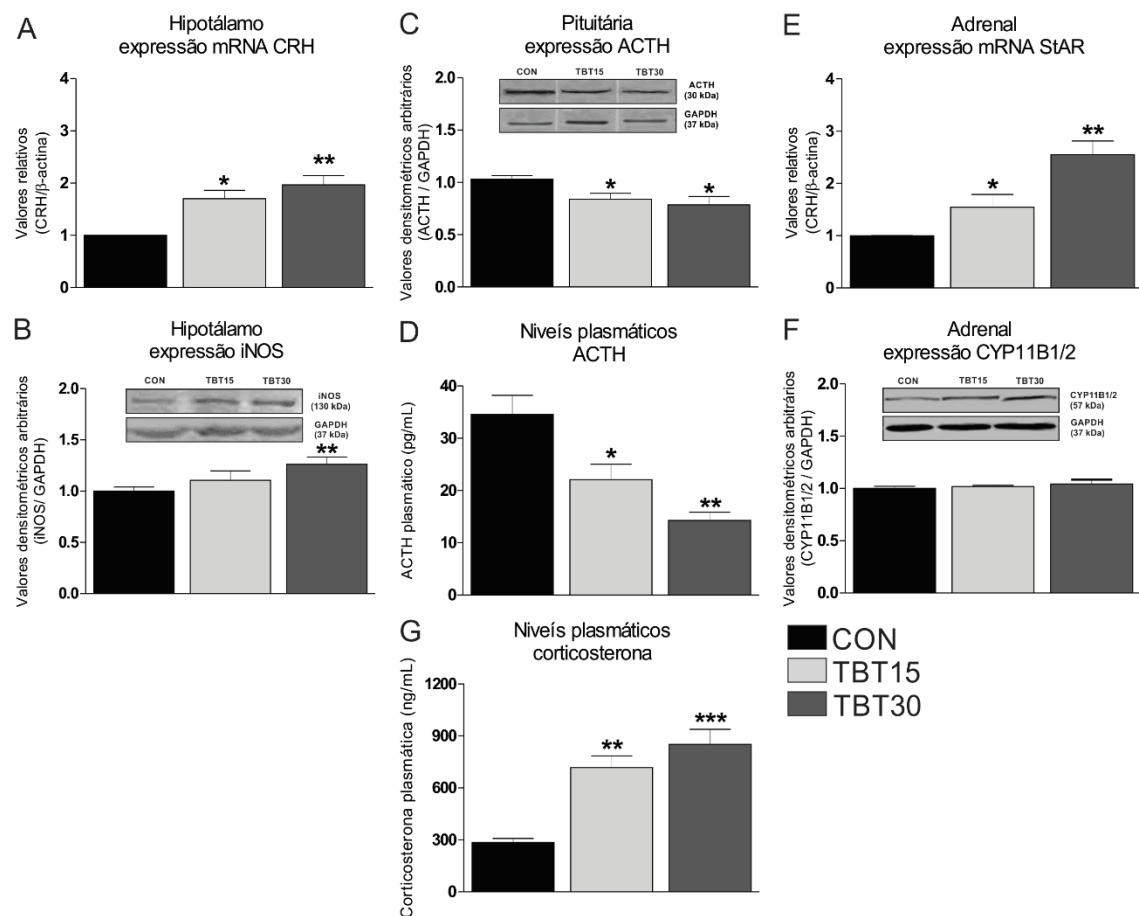


Figura 4. Avaliação da expressão do CRH e iNOS no hipotálamo, expressão ACTH pituitária, expressão de StAR e CYP11B1/2 na adrenal e os níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona. (A) Análise de qPCR de mRNA de CRH extraído de hipotálamo de rato fêmea. (B) Um aumento na proteína iNOS no hipotálamo de ratos TBT30 foi observada. (C) Uma redução na expressão ACTH nas hipófises de ratos TBT15 e TBT30 foi observada. (D) A diminuição dos níveis de ACTH no plasma em ratos TBT15 e TBT30 foi observada. (E) Análise qPCR de mRNA de StAR extraído de adrenal de rato fêmea. (F) Similar expressão de CYP11B1/2 foi observada nas glândulas adrenais de ratos TBT15 e TBT30. (G) Aumento dos níveis de corticosterona no plasma foram observados em ratos TBT15 e TBT30. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

TBT induziu anormalidades morfológicas na adrenal

Para caracterizar os efeitos do TBT sobre as adrenais, sua histologia foi avaliada utilizando coloração de H&E (Figura 5). As adrenais apresentaram características normais no córtex adrenal, suas zonas adrenais e medula (Figura 5A e A1). O córtex adrenal em ambos os grupos de ratos TBT exibiu anormalidades morfológicas, tais como hiperplasia do córtex adrenal e atividade mitótica (seta). A área cortical foi aumentada em aproximadamente 15% nos ratos TBT15 e TBT30 em comparação com os ratos CON (CON: $4,06 \pm 0,08$, TBT15: $4,67 \pm 0,11$, TBT30: $4,71 \pm 0,38$ mm², n = 5, p < 0,05, Figura 5D), mas não houve diferença significativa na área do córtex adrenal entre os ratos TBT30 e TBT15 (p ≥ 0,05). Não foram observadas diferenças significativas na área da medula adrenal ou no peso adrenal entre os ratos CON e qualquer grupo de ratos TBT (p > 0,05, dados não apresentados).

Presença de inflamação nas adrenais de ratos TBT

As células inflamatórias rodeavam os cordões das células da ZF e zona reticular (asterisco) (Figura 5B, B1, C e C1). Observou-se um aumento da atividade da MPO na adrenal em ratos TBT30 em comparação com ratos CON (CON: $1,06 \pm 0,09$, TBT15: $2,56 \pm 0,74$, TBT30: $3,40 \pm 0,48$ OD/μg, n = 5, p < 0,01, Figura 5E). A atividade da MPO adrenal foi semelhante entre os ratos CON e TBT15 (p > 0,05). A atividade de NAG na adrenal foi maior em ratos TBT30 em comparação com os ratos CON (CON: $0,57 \pm 0,02$, TBT15: $0,63 \pm 0,06$, TBT30: $0,81 \pm 0,07$ nmol/μg, n = 5, p < 0,05, Figura 5I). A atividade de NAG adrenal foi semelhante entre ratos CON e TBT15 (p > 0,05). Não houve diferença significativa na atividade de NAG e MPO nas adrenais entre ratos TBT15 e TBT30 (p > 0,05). Além disso, observou-se acúmulo intenso de gotículas lipídicas em ambos os grupos de ratos TBT (Figura 5B, B1, C e C1, ponta de flecha). Os mastócitos foram identificados no córtex adrenal em ratos CON, TBT15 e TBT30 (Figura 5F, G e H). Contudo, observou-se um grande número de mastócitos nas adrenais de ambos os grupos de ratos TBT (Figura 5G1 e H1, seta). O número de mastócitos foi maior nos dois grupos de ratos TBT do que o número observado nos ratos CON (CON: $0,39 \pm 0,01$, TBT15: $0,49 \pm 0,02$, TBT30: $0,52 \pm 0,02$ Mastócitos/mm², n = 5, p < 0,05, Figura 5J). Nenhuma diferença significativa no número de mastócitos foi observada entre ratos TBT15 e TBT30 (p > 0,05).

A deposição de colágeno foi maior em adrenais de ratos TBT

No córtex adrenal de ratos TBT15 ($p < 0,05$) e TBT30 ($p < 0,001$), houve maior densidade de colágeno superficial do que a observada nos ratos CON (CON: $4,60 \pm 0,52$, TBT15: $6,65 \pm 0,46$, TBT30: $12,87 \pm 1,11\%$, $n = 5$, $p < 0,05$, Figura 5K, L, M e N). Além disso, a densidade também foi maior nos ratos TBT30 do que nos ratos TBT15 ($p < 0,001$).

Aumento dos níveis de colesterol no soro em ratos TBT

A quantificação de colesterol foi realizada e os níveis de colesterol sérico foram avaliados. Os níveis de colesterol no soro foram maiores em ratos TBT30 do que em ratos de controle (CON: $48,00 \pm 1,00$; TBT15: $46,30 \pm 4,90$; TBT30: $69,30 \pm 6,30$ mg / dL, $n = 8$, $p \leq 0,05$) e os níveis séricos de colesterol foram maiores em TBT30 ratos do que nos ratos TBT15 ($p < 0,05$) (Dados não apresentados).

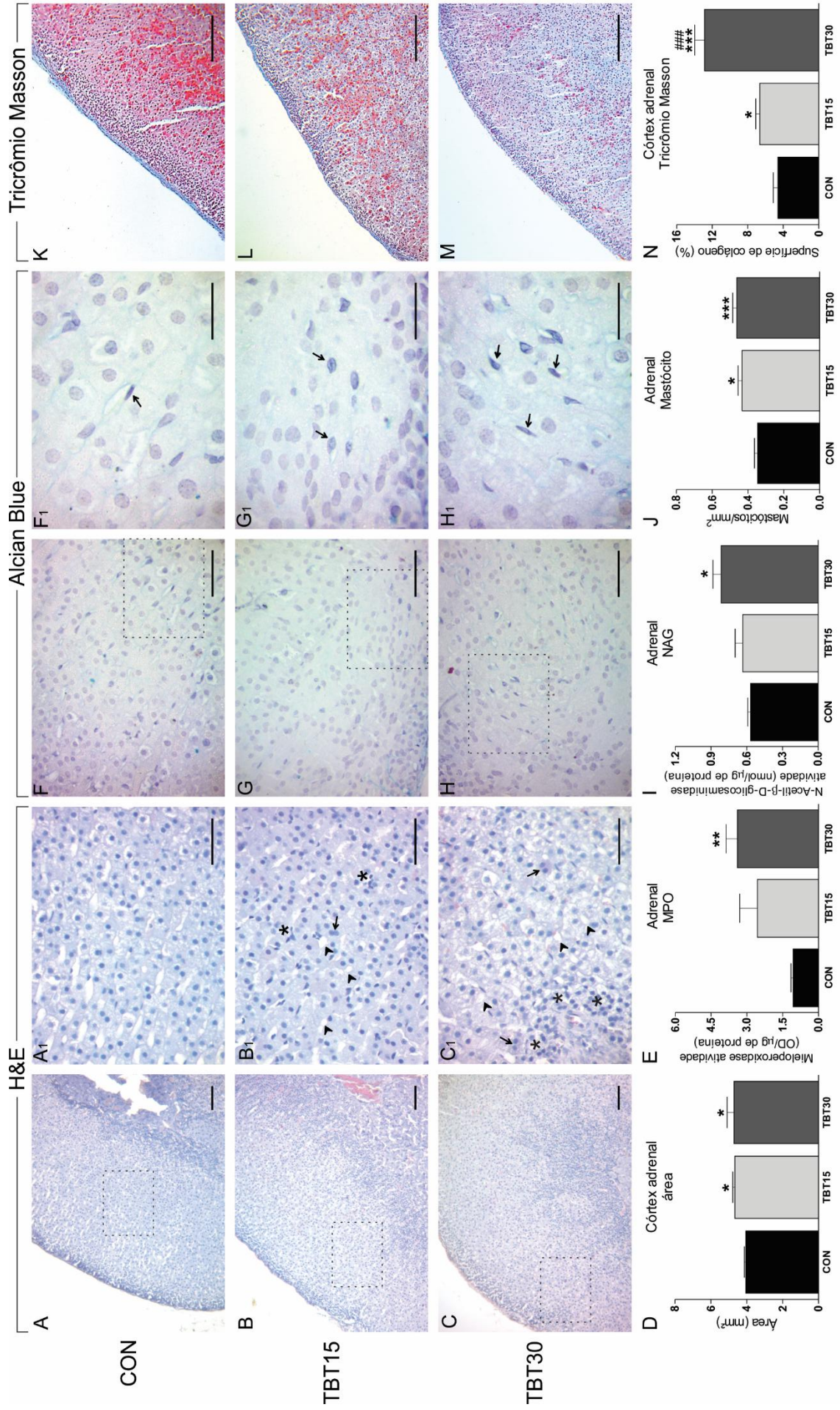


Figura 5. Histomofometria e perfil inflamatório da adrenal de animais CON, TBT15 e TBT30. Fotomicrografia da adrenal. Coloração H&E (A e A1) Controle; (B e B1) TBT 15; (C e C1) TBT 30; (D) Efeito do TBT sobre a área do córtex da adrenal; (E) Efeito do TBT sobre a atividade de MPO na adrenal; Coloração Alcian Blue (F e F1) Controle; (G e G1) TBT 15; (H e H1) TBT 30; (I) Efeito do TBT sobre a atividade de NAG na adrenal; (J) Efeito do TBT sobre a presença de mastócitos na adrenal. Coloração TM (K) Controle. (L) TBT 15; (M) TBT 30; (N) Efeito do TBT sobre a deposição de colágeno na adrenal. Dados foram expressos como Média \pm EPM. n = 4. $p < 0,05$. Barra: 50 μ m. Asterisco: célula inflamatória; Ponta de flecha: gotículas lipídicas; Seta: binucleação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle, ### $p < 0,001$ vs TBT15.

Nível de colesterol, a deposição lipídica e expressão de PPAR γ aumentaram nas adrenais de ratos TBT

O acúmulo de gotículas lipídicas no córtex adrenal foi analisada utilizando o corante Óleo Red O e MET (Figura 6). Observou-se um acúmulo de gotículas lipídicas nas adrenais de ratos TBT em comparação com as adrenais de ratos CON (CON: $4,95 \pm 0,22$, TBT15: $6,88 \pm 0,39$, TBT30: $6,73 \pm 0,36\%$, n = 5, $p < 0,001$, 5A, C, E e G). De forma semelhante, a avaliação de MET revelou um no acúmulo de gotículas de lipídeos nas adrenais em ambos os grupos de ratos tratados com TBT (Figura 6B, D e F, n = 4). Não houve diferença significativa no acúmulo de gotículas lipídicas adrenais entre os ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$). Além disso, os níveis de colesterol na adrenal foram maiores nos ratos TBT30 do que nos ratos controle (CON: $35,58 \pm 2,27$, TBT15: $57,29 \pm 7,52$, TBT30: $69,76 \pm 69,63$ mg/dL, n = 8, $p < 0,05$, Figura 6H). O PPAR γ é um regulador nuclear da diferenciação de adipócitos, e o TBT demonstrou induzir a perturbação metabólica modulando a atividade de PPAR γ . A expressão de PPAR γ nas glândulas adrenais foi determinada utilizando a análise de Western blot. A expressão de PPAR γ adrenal foi maior tanto nos ratos TBT15 como TBT30 comparado aos ratos CON (CON: $1,00 \pm 0,03$, TBT15: $1,25 \pm 0,02$, TBT30: $1,36 \pm$

0,59, $n = 5$, $p < 0,01$, Figura 6I). A expressão de PPAR γ adrenal foi semelhante entre os ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$).

Os níveis de O $_2^-$ na hipófise e nas adrenais e os marcadores apoptóticos foram altamente expressos em ratos TBT

Para analisar a produção de O $_2^-$ na hipófise e adrenais, a marcação DHE foi realizada (Figura 7). Na hipófise, detectamos um aumento nos níveis de O $_2^-$ nos ratos TBT15 e TBT30 em comparação com os ratos CON (CON: $8,95 \pm 0,56$, TBT15: $15,54 \pm 1,14$, TBT30: $12,83 \pm 0,63$, $n = 5$, $p < 0,001$, Figura 7A, C, E e G). Não houve diferença significativa nos níveis de O $_2^-$ na hipófise entre ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$). Além disso, foi determinada a expressão da proteína caspase-3 da hipófise. A expressão da caspase-3 hipofisária foi maior nos dois grupos de ratos TBT do que nos ratos CON (CON: $1,00 \pm 0,04$, TBT15: $1,22 \pm 0,04$, TBT30: $1,35 \pm 0,09$, $n = 5$, $p < 0,05$, Figura 7I). A produção de O $_2^-$ do córtex adrenal foi maior nos dois grupos de ratos TBT do que nos ratos CON (CON: $0,09 \pm 0,01$, TBT15: $0,23 \pm 0,01$, TBT30: $0,38 \pm 0,01$, $n = 5$, $p < 0,001$, Figura 7D, F e H). Um aumento na produção de O $_2^-$ adrenal foi também observado em ratos TBT30 comparados com ratos TBT15 ($p < 0,05$). Além disso, a expressão de caspase-3 adrenal foi maior em ambos os grupos de ratos TBT do que nos ratos CON (CON: $1,02 \pm 0,02$, TBT15: $1,34 \pm 0,11$, TBT30: $1,51 \pm 0,23$, $n = 5$, $p < 0,05$, Figura 7J). A expressão da caspase-3 na hipófise e nas adrenais foi semelhante entre os ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$).

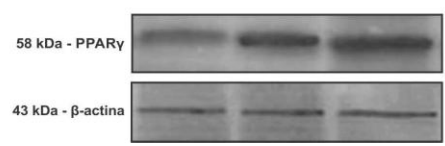
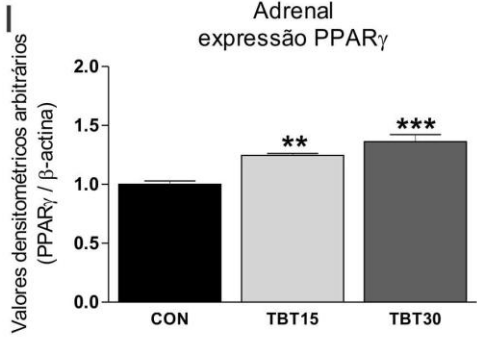
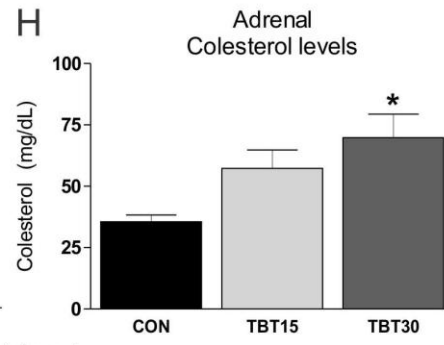
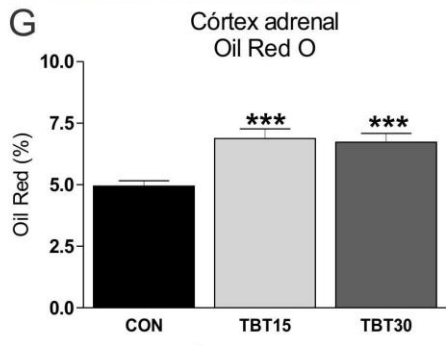
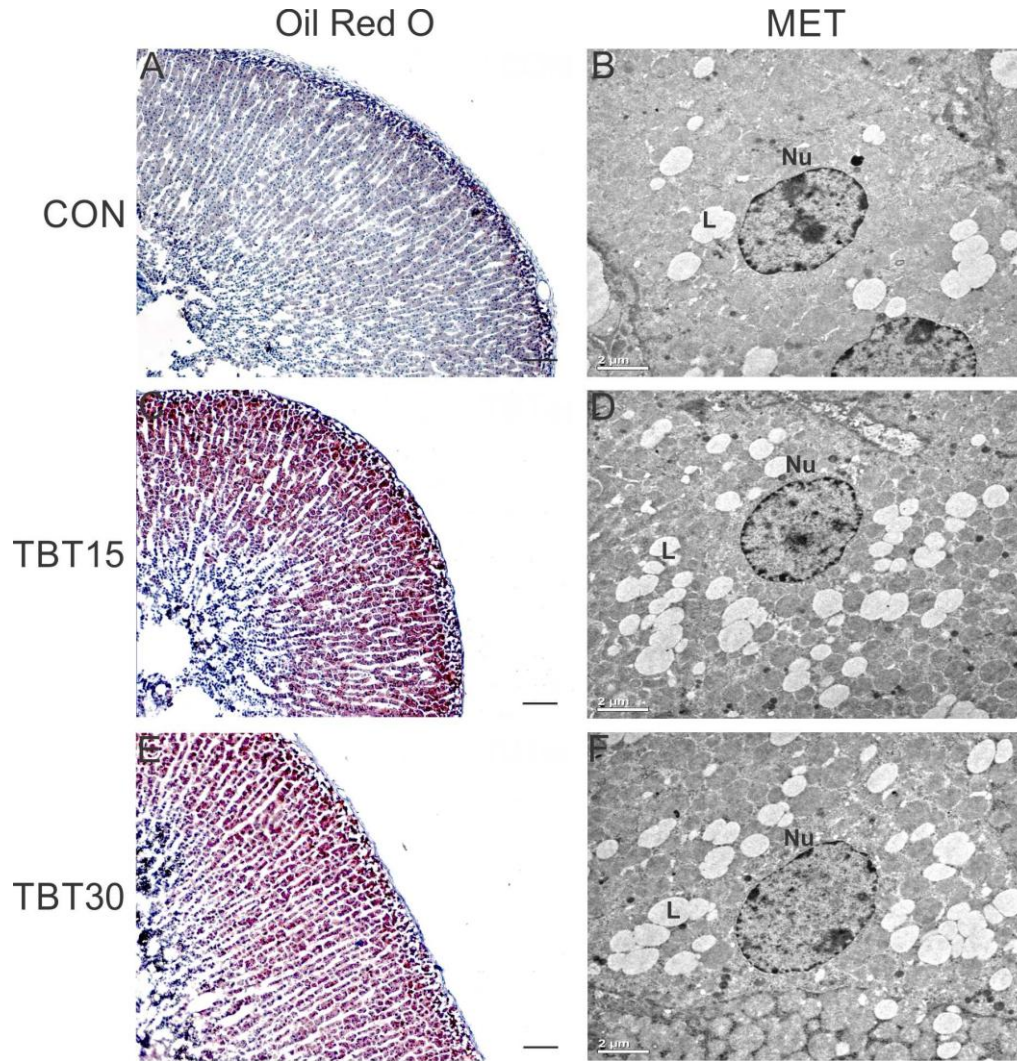


Figura 6. Avaliação da acumulação de gotículas de lipídios e análise de Western blot para a proteína PPAR γ nas glândulas adrenais de ratos CON, TBT15 e TBT30. Seções coradas de gotículas lipídicas representante de glândulas adrenais foram obtidos a partir de (A) CON, (C) TBT15 e (E) ratos TBT30 usando Oil Red O. (G) maior acúmulo de gotículas de gordura foi observado nas glândulas adrenais de ratos TBT15 e TBT30. (B) A MET mostrando a ZF normal de córtex adrenal em ratos CON. (D) e (F) acúmulo anormal de gotículas de lipídio na ZF do córtex adrenal em ratos TBT15 e TBT30. Foram observadas (H) os níveis de colesterol adrenais maior em ratos TBT. (I) A análise da expressão da proteína de PPAR γ nas adrenais de ratos TBT15 e TBT30. A, C, E (Barra = 200 μ m). B, D, F (Barra = 2 μ M). Nu: núcleo. L: gotículas de gordura. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Níveis de CRH e ACTH se mantem elevados em ratos TBT durante estresse de contenção

O estresse de contenção de 30 min foi associado com um aumento significativo nos níveis plasmáticos de ACTH em todos os grupos, que retornaram aos valores basais 30 minutos após o término do estresse (Figura 8). O estresse de contenção evocou uma resposta significativamente maior em ambos os grupos de ratos TBT em comparação com os ratos controle, o que foi evidente 30 min após o início do estresse de contenção (CON: $66,16 \pm 11,41$; TBT15: $141,33 \pm 10,66$; TBT30: $116,50 \pm 10,50$; 5, $p < 0,01$, Figura 8A). O mRNA de CRH hipotalâmico foi avaliado nos ratos CON e ambos os grupos de ratos TBT submetidos a 30 min de stress de contenção. O mRNA de CRH foi aproximadamente 40 a 70% maior em amostras de tecido hipotalâmico de ambos os grupos de ratos tratados com TBT em comparação com ratos de controle ($n = 4$, $p < 0,05$, Figura 8B). Não foram observadas diferenças significativas no mRNA hipotalâmico de CRH em ratos TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$).

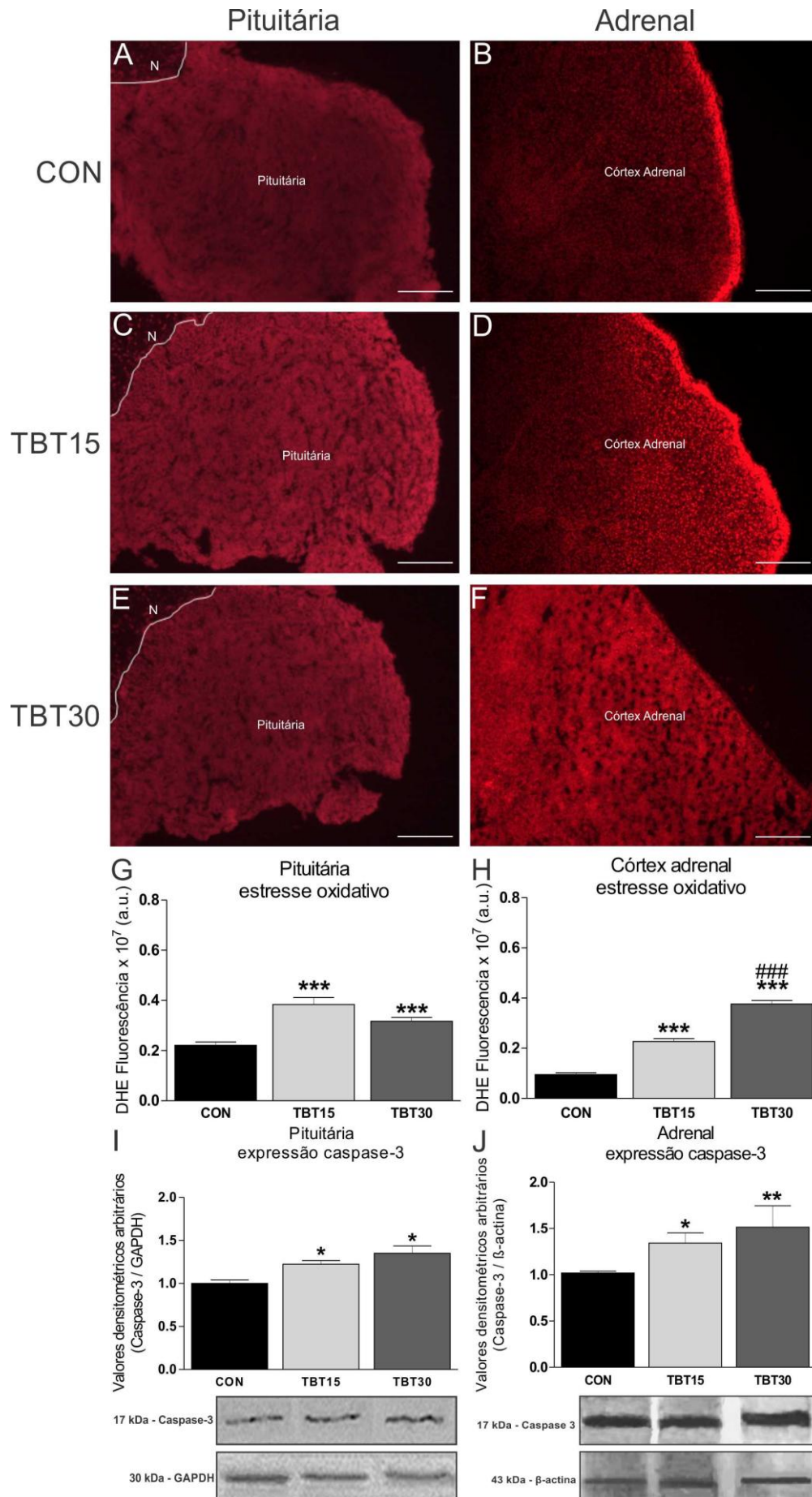


Figura 7. Análise de estresse oxidativo e apoptose na hipófise e adrenal nos animais CON, TBT15 e TBT30. Coloração DHE (A) Controle; (C) TBT 15; (E) TBT 30; (B) Controle; (D) TBT 15; (F) TBT 30; (G) Efeito do TBT sobre a produção de estresse oxidativo da pituitária; (H) Efeito do TBT sobre a produção de estresse oxidativo da adrenal (I) Efeito do TBT sobre a expressão de caspase-3 na pituitária. (J) Efeito do TBT sobre a expressão de caspase-3 na adrenal. Dados foram expressos como Média \pm EPM. n = 4. p < 0,05 . Barra: 100 μ m. Pituitária = adenohipófises; N = neurohipófise. * p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs controle, ### p < 0,001 vs TBT15.

Animais ADX tratados com TBT apresentam diferentes níveis de ACTH de acordo com tempo de tratamento

Os níveis plasmáticos de ACTH em ratos ADX controle foram significativamente mais elevados do que aqueles em ratos de controle intactos (ADX controle: $106,67 \pm 8,81$ ng/mL, n = 4 vs controle intacto: $34,54 \pm 3,69$ pg/mL, n = 5, p < 0,001) (Figura 8C). Os níveis plasmáticos de ACTH em ambos os grupos de ratos ADX TBT foram significativamente mais elevados do que os dos ratos TBT intactos (ADX TBT15: $160,50 \pm 4,91$ ng/mL, n = 4 vs TBT15 intacto: $22,10 \pm 2,96$; ADX TBT30: $69,40 \pm 7,70$ pg/mL, n = 4 vs intacto TBT30: $14,28 \pm 1,59$ ng/mL, n = 5, p < 0,001, Figura 8C). Curiosamente, os níveis plasmáticos de ACTH no grupo ADX TBT15 foram aproximadamente 50% mais elevados do que os níveis de ACTH em ratos de controle ADX (p < 0,001). Os níveis plasmáticos de ACTH foram reduzidos em aproximadamente 30% em ratos ADX TBT30 em comparação com ratos ADX controle (p < 0,001). Adicionalmente, os níveis plasmáticos de ACTH foram aproximadamente 50% mais baixos nos ratos ADX TBT30 do que nos ratos ADX TBT15 (p < 0,001), possivelmente devido ao comprometimento do feedback negativo por GC em ratos fêmeas tratadas com TBT. O mRNA de CRH hipotalâmico foi avaliado intacto e com ADX controle e ambos os grupos de ratos TBT. A expressão de mRNA de CRH hipotalâmico em ratos de ADX controle foi significativamente mais elevada do que a expressão de mRNA de CRH em ratos de controle intactos (p < 0,05, Figura 8D). No entanto, ambos os ratos ADX TBT15 e TBT30 apresentaram um aumento semelhante nos níveis de mRNA de CRH quando comparados com os respectivos grupos intactos

($p \geq 0,05$, $n = 4$). Os níveis de mRNA de CRH não foram significativamente diferentes entre os ratos de ADX controle, TBT15 e TBT30 ($p > 0,05$).

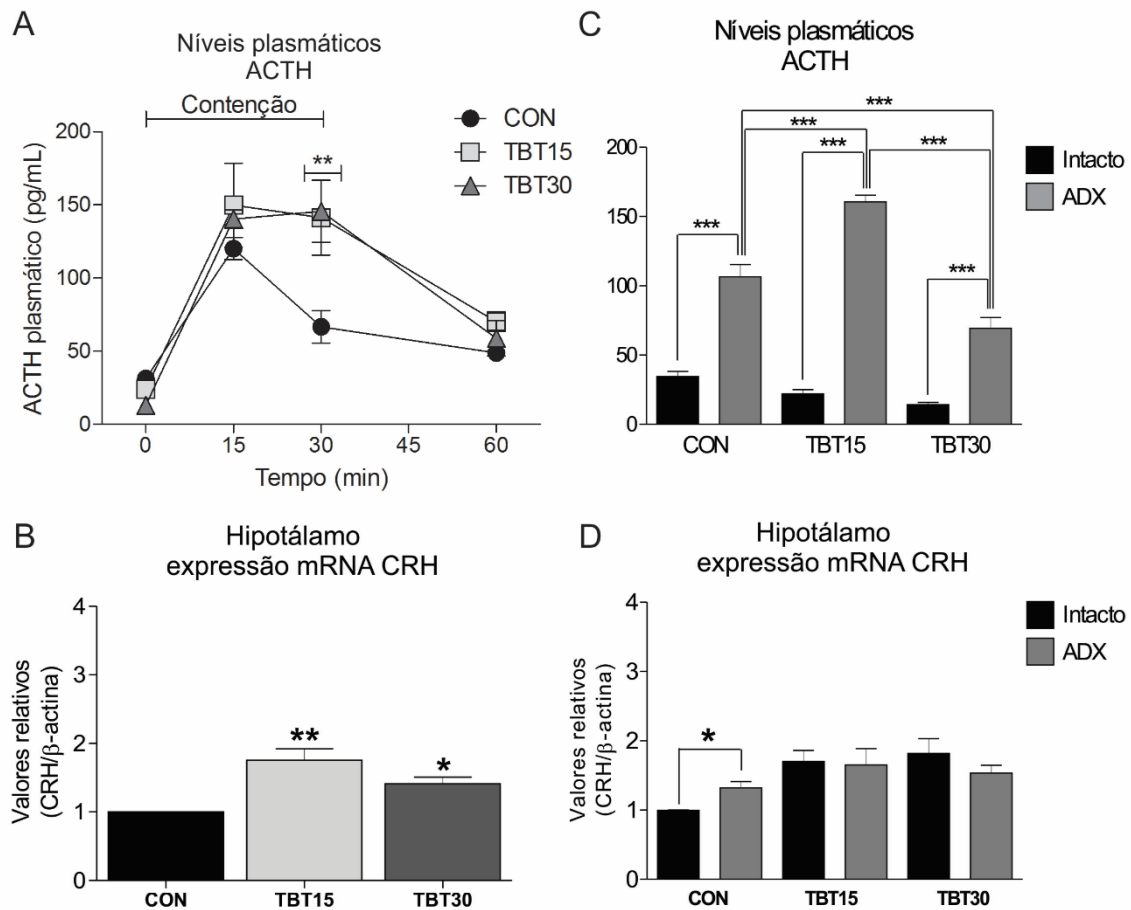


Figura 8. Estresse de contenção e avaliação feedback negativo de glicocorticoides em ratos CON, TBT15 e TBT30. (A) Os níveis plasmáticos de ACTH em ratos controle, TBT15 e TBT30 antes (0 min), 15 min e 30 min de um stress de imobilização e 30 min depois. (B) A análise qPCR de mRNA de CRH extraído do hipotálamo de ratos do sexo feminino submetidos a 30 min de estresse de contenção. (C) Níveis plasmáticos de ACTH no controle intactos e ratos TBT15 e TBT30 em comparação com ratos de controle ADX e ratos ADX TBT15 e TBT30, respectivamente. (D) mRNA de CRH no hipotálamo de ratos intactos controle e ratos

TBT15 e TBT30 em comparação com ratos de controle ADX e ratos ADX TBT15 e TBT30, respectivamente. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

DISCUSSÃO

Neste estudo fornecemos provas que demonstram que o TBT perturba a organização morfofuncional do eixo HPA de ratas, levando a um aumento na expressão de mRNA de CRH, diminuição na liberação de ACTH e aumento nos níveis de corticosterona. Esta dissociação hormonal pode ser associada à inflamação e à expressão de iNOS no hipotálamo. Além disso, um aumento na inflamação, estresse oxidativo, apoptose e deposição de colágeno na hipófise e adrenal, e deposição lipídica aumentada na adrenal, foram observados nos animais tratados com TBT.

Estudos anteriores relataram que os OTs desempenham um papel direto no funcionamento impróprio do eixo HPA (FUNAHASHI; IWASAKI; IDE, 1980; KRAJNC et al., 1984; MORITA et al., 2006; WEGER et al., 2012; WESTER et al., 1990; YAMAZAKI et al., 2005) (Tabela 1). Wester e colab. (WESTER et al., 1990) relataram que a exposição ao óxido de bis (tri-n-butilestanho) (TBTO) a 50 mg / kg durante 106 semanas aumentou o peso da hipófise em ratos fêmeas. Nossos resultados concordam com essas descobertas anteriores. Observamos um pequeno aumento no tamanho da hipófise e um aumento do peso da hipófise nos ratos TBT30. Krajnc e colab. (KRAJNC et al., 1984) não encontraram alteração no peso pituitário de ratos após exposição a 80 mg / Kg de TBTO por 28 dias, o que contrasta com os resultados em nosso modelo. Esta exposição pode não resultar em estimulação do eixo pituitária-adrenal (KRAJNC et al., 1984).

A inflamação é capaz alterar a regulação hormonal na pituitária (ARZT et al., 1999; ROTONDO et al., 2010; VIDAL et al., 2002). Uma característica comum da inflamação na hipófise de mamíferos é a presença de diferentes células inflamatórias, como os macrófagos e neutrófilos (ROTONDO et al., 2010). Os mastócitos também são parte das respostas imunes e estão envolvidos em distúrbios inflamatórios inespecíficos e remodelação tecidual, tendo papel importante na resposta inflamatória na hipófise (ARZT et al., 1999; GORDON; BURD; GALLI, 1990; VIDAL et al., 2002). Em nosso estudo, os ratos TBT mostraram evidências distintas de inflamação na hipófise. Apenas a hipófise do grupo TBT30 apresentou maior atividade das enzimas MPO e NAG, sugerindo a presença de neutrófilos e macrófagos neste órgão. Podemos observar também aumento da atividade de NAG do grupo TBT30 em relação ao grupo TBT15, demonstrando assim um possível efeito tempo-dependente da exposição ao TBT, que pode caracterizar um estado de maior gravidade da inflamação nesse grupo.

Tabela 1. Sumário de efeitos no eixo HPA causados por OTs

Parâmetros eixo HPA	Modelo animal/OTs/Dose						
	Rato/ TBTO (100- 1560mg/kg)	Rato/ TBTO (20-80mg/kg)	Rato/ TBTO (50mg/kg)	Célula adrenal bovina/ TBT (3.52-3520 x 10 ⁻⁴ mg/L)	Camundongo/ TMT (3mg/kg)	Zebrafish/ TBT (105.6-1760 x 10 ⁻⁴ mg/L)	Rato/ TBT (10 ⁻⁴ mg/kg)
Tempo de exposição	Crônico	Crônico	Crônico	Agudo	Agudo	Agudo	Sub-crônico
<i>Hipófise</i>							
Peso do órgão	NR	↔	↑	NA	NR	NR	↑
Morfometria	Alterada	NR	NR	NA	NR	NR	Alterada
Processo inflamatório	NR	NR	NR	NA	NR	NR	↑
Deposição de colágeno	NR	NR	NR	NA	NR	NR	↑
Desenvolvimento de estresse oxidativo	NR	NR	NR	NA	NR	NR	↑
Marcador de apoptose	NR	NR	NR	NA	NR	NR	↑
Expressão de ACTH	↓	↔	NR	NA	NR	NR	↓
<i>Adrenal</i>							
Morfometria	Alterada	↔	Alterada	NR	NR	NR	Alterada
Processo inflamatório	NR	NR	NR	NA	NR	NR	↑
Deposição de colágeno	NR	NR	NR	NR	NR	NR	↑
Desenvolvimento de estresse oxidativo	NR	NR	NR	NR	NR	NR	↑
Marcador de apoptose	NR	NR	NR	NR	NR	NR	↑
Acúmulo gotículas de lipídios/ expressão PPAR γ	↑/NR	NR	NR	NR	NR	NR	↑ / ↑
Sinalização GC	NR	NR	NR	↔ / ↓	NR	↔ / ↓	Alterada
<i>Eixo HPA</i>							
ACTH plasmático	NR	NR	NR	NA	NR	NR	↓
Níveis GC	↑	↔	NR	↔ / ↓	↑	NR	↑
Controle <i>feedback</i>	NR	NR	NR	NA	NR	NR	NR
Função eixo HPA	↓	↔	NR	NA	NR	NR	↓
Referência	Funahashi et al. 1980	Krajnc et al. 1984	Wester et al. 1990	Yamazaki et al. 2005	Morita et al. 2006	Weger et al. 2012	Este estudo

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; OTs: organoestânicos; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; TBTO: óxido de bis (tri-n-butilestanho); TBT: cloreto de tributilestanho; TMT: trimetilestanho. ↑: aumentado; ↓: diminuiu; ↔: inalterado ou similar ao controle; NR: não relatado; NA: não aplicável

Além disso, as hipófises de ambos os ratos TBT mostraram um aumento no número de mastócitos, caracterizando um quadro inflamatório na hipófise dos ratos TBT. Esta inflamação pode estar associada à dissociação hormonal do eixo HPA após exposição ao TBT.

Estudos relacionaram a deposição anormal de colágeno com a presença de inflamação na adenohipófise (IUCHI et al., 1998; NAGANUMA; SATOH; NUKUI, 2002). Do mesmo modo, Rotondo e colab. (ROTONDO et al., 2010) relataram o acúmulo de colágeno em um modelo de inflamação de hipófise de ratos. Nossos resultados concordam com esses achados anteriores, na medida em que mostram um aumento na deposição de colágeno na pituitária de ambos os grupos TBT. Dessa forma é demonstrado que o TBT desencadeia um quadro inflamatório na hipófise de ratas, o qual culmina na deposição anormal de colágeno.

Como previamente exposto, a atividade do eixo HPA pode ser influenciada por sinais inflamatórios (ARZT et al., 1999; MARIC; ADZIC, 2013). Em pacientes com inflamação grave, baixos níveis plasmáticos de ACTH e níveis normais ou elevados de cortisol são observados no período inicial após a admissão em uma unidade de cuidados intensivos (BORNSTEIN *et al.*, 2008). Foi proposto que o aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral α e Interleucina-1 β , podem prejudicar diretamente a liberação de ACTH estimulada por CRH (GAILLARD et al., 1990). O interferon- γ , outro mediador pró-inflamatório, causou a inibição dose-dependente da secreção de ACTH estimulada por CRH em células hipofisárias de ratos (VANKELECOM et al., 1990). Polito e colab. (POLITO et al., 2011) descreveram redução na expressão de ACTH e aumento na expressão de CRH e iNOS, enzima que sintetiza óxido nítrico (NO), no hipotálamo de um modelo de sepse em ratos. Nosso estudo está de acordo com esses achados anteriores, revelando que o tratamento com TBT levou ao aumento da expressão hipotalâmica de CRH e iNOS, redução da expressão de ACTH na hipófise, redução da concentração plasmática de ACTH e aumento corticosterona plasmática circulante.

Foi demonstrado que o NO estimulou a expressão de CRH e suprimiu os efeitos estimuladores da vasopressina na secreção de ACTH em um modelo de sepse em ratos (RIVIER, 2003). No entanto, outros estudos sugeriram que a diminuição da secreção de ACTH pode ser o resultado de um efeito regulatório negativo induzido por níveis de GC cronicamente elevados, como foi observado em pacientes com

inflamação sistêmica (KANCZKOWSKI et al., 2015; PRIGENT; MAXIME; ANNANE, 2004; SILVERMAN et al., 2005), e como foi encontrado nos animais tratados com TBT. Assim, um aumento na inflamação e na expressão da proteína iNOS em ratos TBT pode estar associado ao comprometimento da liberação de ACTH estimulada por CRH, levando a dissociação hormonal. Além disso, o aumento concentração plasmática de corticosterona pode estar associada a redução nos níveis de ACTH em ratos TBT, devido ao *feedback* negativo exercido pela corticosterona.

Os neurônios CRH são encontrados principalmente no núcleo paraventricular hipotalâmico (CHEN et al., 1993; NICOLAIDES et al., 2015). No entanto, a expressão de CRH está presente em outras regiões cerebrais, incluindo sistema límbico, o núcleo da estria terminalis, o núcleo central da amígdala, e outros (SAWCHENKO; SWANSON, 1985). O CRH nesses locais desempenha um papel importante em resposta ao estresse, como mostrado no núcleo amigdalóide central em ratos submetidos ao estresse (MAKINO et al., 1999). Assim, um aumento na inflamação e na expressão da proteína iNOS em ratos TBT pode estar associado ao comprometimento da liberação de ACTH estimulada por CRH, levando a dissociação hormonal. Outros fatores, como uma exposição repetida ao mesmo estressor, podem ser associados à dissociação hormonal e é possível que o mRNA do CRH não reflita os níveis de CRH da veia porta (AGUILERA; LIU, 2012; BORNSTEIN *et al.*, 2008).

De estudos anteriores, aprendemos que CRH e ACTH desempenham papéis críticos na função adequada do eixo HPA (AGUILERA, 2011; CALOGERO et al., 1988). Além disso, estudos mostraram que os EDCs podem modular o eixo HPA (MORITA et al., 2006; ZHANG et al., 2014). Chen e colab. (CHEN et al., 2014) relataram um aumento na expressão de mRNA de CRH e nos níveis de ACTH na prole masculina de ratas grávidas que haviam sido expostas ao bisfenol A (2 µg / kg) desde o dia 10 de gestação até o dia 7 da lactação. Em contraste, Pereiro e colab. (PEREIRO et al., 2014) relataram uma regulação negativa dos hormônios do eixo HPA em ratos tratados com 0,5, 1,0, 3,0 e 6,0 mg de perfluorooctano sulfonato / kg / dia durante 28 dias. Funahashi e colab. (FUNAHASHI; IWASAKI; IDE, 1980) relataram que o TBTO reduziu a quantidade de coloração imuno-histoquímica positiva de ACTH em corticotrofos e aumentou os níveis séricos de corticosterona em ratos. Portanto, a exposição a diferentes compostos pode desencadear diferentes reações do eixo HPA

em modelos animais como demonstrado acima. Deste modo nossos dados apresentam uma ação de dissociação do eixo HPA frente a exposição ao TBT.

O eixo HPA é responsável pela manutenção da homeostasia, dessa forma este eixo é ativado por fenômenos de estresse (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Para avaliar a função hipotalâmica e hipofisária um teste de estresse de restrição foi realizado, a fim de se observar os efeitos do TBT sobre a produção de CRH e ACTH após um estímulo por estresse. Semelhante às descobertas de Stinnett e colab. (STINNETT; WESTPHAL; SEASHOLTZ, 2015) e Felszeghy e colab. (FELSZEGHY; BAGDY; NYAKAS, 2000), observamos que o estresse de restrição foi associado a aumento na expressão de CRH e nos níveis plasmáticos de ACTH em todos os ratos analisados. No entanto, ambos os grupos TBT apresentaram elevada expressão de CRH e níveis de ACTH aumentados em resposta ao estresse em 30 minutos, em comparação com os animais CON, demonstrando assim que a atividade do eixo HPA está exacerbada frente a um estímulo após exposição ao TBT. Além disso, Dhabhar e colab. (DHABHAR; MCEWEN; SPENCER, 1997) sugeriram que uma exposição repetida e crônica ao mesmo estresse pode resultar na habituação da resposta do eixo HPA, caracterizada por uma diminuição da resposta do eixo HPA ao longo do tempo, como mostrado aparentemente em ratos TBT30.

Para determinar a funcionalidade do *feedback* negativo do eixo HPA em ratos TBT, a ADX foi realizada em animais de ambos os grupos. Todos os grupos responderam com aumento nos níveis plasmáticos de ACTH e apenas os animais CON tiveram aumento na expressão de CRH após a ADX. De maneira interessante o grupo TBT15 apresentou níveis de ACTH, após a ADX, maiores que os grupos CON e TBT30, o que pode indicar que o *feedback* negativo do eixo neste grupo não está comprometido. Contudo os animais TBT30 não apresentaram o mesmo comportamento, sendo seus níveis de ACTH menores que o grupo CON, o que indica que a exposição continuada ao TBT pode prejudicar o mecanismo de *feedback* do eixo HPA. A habituação do eixo HPA pode ser associada a uma diminuição da resposta do eixo HPA nos ratos TBT30, assim como a presença de processo inflamatório mais acentuado na hipófise desses animais, devido a falta do efeito anti-inflamatório da corticosterona. Além disso, a função de eixo HPA anormal em ratos ADX tratados com TBT pode envolver outros fatores, poderia associar-se a uma dissociação hormonal, como doença metabólica e inflamação (BORNSTEIN *et al.*, 2008; LAMOUNIER-ZEPTER; EHRHART-

BORNSTEIN, 2006), como resultado da exposição TBT (BERTULOSO et al., 2015; GRÜN et al., 2006). Esses dados sugerem um *feedback* negativo central aos GC anormal na secreção de ACTH.

Além disso, o TBT alterou a esteroidogênese em modelos *in vitro* e *in vivo* (GROTE et al., 2004; PODRATZ et al., 2012; SAITOH et al., 2001). Yamazaki e colab. (YAMAZAKI et al., 2005) relataram uma redução nos níveis de expressão de mRNA P450c21 e CYP11B1 em células bovinas adrenais que foram tratadas com TBT durante 48 h (10 e 100 nM). No entanto, o mesmo estudo não relatou diferença significativa nos níveis de expressão de mRNA adrenal StAR, P450scc e P4503 β -HSD. Mitra e colab. (MITRA et al., 2014) descreveram um aumento na expressão de StAR em células de Leydig de rato expostas a TBT 600 nM durante 1 h. Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de mRNA de StAR adrenal em ambos os grupos de ratos tratados com TBT e nenhuma diferença significativa na expressão proteica de CYP11B1/2 adrenal em todos os grupos. O principal passo regulatório da esteroidogênese é o transporte de colesterol para a membrana interna mitocondrial, realizado pela StAR (JEFCOATE, 2002). Portanto, o aumento de corticosterona plasmática pode estar associada ao aumento na expressão de StAR na adrenal dos animais TBT. No entanto, o controle da expressão de StAR é complexo e envolve várias etapas, tanto na transcrição quanto pós-transcricionais (CLARK; RANGANATHAN; COMBS, 2001). Assim, os efeitos da esteroidogênese no córtex adrenal de ratos TBT podem estar alterados devido a outras vias de controle de síntese hormonal.

As glândulas adrenais são órgãos-alvo comum entre o estresse e os modelos de exposição a EDC (HARVEY, 2016; HARVEY; EVERETT; SPRINGALL, 2007; ROSOL et al., 2001). Assim, a exposição ao TBT pode estar associada diretamente a disfunção adrenal. Várias interações entre os sistemas imunológico e endócrino foram descritas em células imunes nas adrenais, como ativação de macrófagos e mastócitos (KIM et al., 2000; SCHOBER et al., 1998; WOLKERSDÖRFER et al., 1999). Durante a inflamação sistêmica, as células imunes desempenham um papel relevante na função adrenal (BORNSTEIN; CHROUSOS, 1999; KANCZKOWSKI et al., 2015). Kanczkowski e colab. (KANCZKOWSKI et al., 2013), usando um modelo de camundongo exposto a lipopolissacarídeo, demonstraram que a infiltração rápida de neutrófilos nas adrenais foi induzida pelo aumento da atividade da MPO. Em nosso

estudo, as adrenais dos ratos TBT30 apresentaram maior atividade de MPO e NAG, sugerindo um papel para neutrófilos e macrófagos na inflamação adrenal. Além disso, Kim e colab. (KIM et al., 1997) descreveram um papel para os mastócitos na hiperplasia adrenal em diferentes cepas de camundongos. Em nosso estudo, as adrenais de ambos os grupos TBT mostraram um maior número de mastócitos, sugerindo que os mastócitos também desempenham um papel na inflamação adrenal. Além disso, em nosso estudo os ratos TBT15 e TBT30 mostraram um aumento na área do córtex adrenal, que pode ser consequência da inflamação presente neste órgão.

Entre outras anormalidades, o TBT foi relatado como indutor de danos celulares que podem alterar a composição da matriz extracelular com a deposição de fibras de colágeno (PODRATZ *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2013). Em concordância com estes achados anteriores, ambos os grupos TBT mostraram um aumento na deposição de colágeno no córtex adrenal de uma maneira tempo-dependente, o que demonstra o maior efeito do TBT ao longo do tempo de exposição e condiz com o processo inflamatório mais acentuado nos ratos TBT30 do que nos ratos TBT15. Reed e colab. (REED; ADAMS; SHENOY, 2015) relataram que a fibrose adrenal foi associada à inflamação adrenal em um homem de 55 anos de idade. Assim, as alterações morfofuncionais das adrenais observadas em ambos os grupos de ratos TBT podem estar associadas aos efeitos tóxicos diretos do TBT ou sua indução de inflamação nas adrenais.

Em um estudo anterior em nosso laboratório (BERTULOSO et al., 2015), ratos TBT15 não apresentaram alteração nos níveis de colesterol no soro. No entanto, nos ratos TBT30 deste estudo, observaram-se níveis elevados de colesterol no soro e na adrenal. Similar aos nossos dados, Xia e colab. (XIA et al., 2014) observaram redução dos níveis séricos de ACTH e aumento dos níveis séricos de colesterol em filhotes de ratas gestantes que foram expostos a 4 g de etanol / kg / dia por 10 dias. Um fornecimento constante de colesterol é necessário para a esteroidogênese na adrenal, o qual é modulado pela função da StAR (CHENG et al., 1998; JEFCOATE, 2002; STOCCO; CLARK, 1996). Nossos dados demonstraram aumento dos níveis circulantes de corticosterona, que pode estar associado a um padrão anormal de expressão de StAR e acúmulo de lipídios no córtex adrenal de ratos TBT, por ter uma maior oferta de precursor para a esteroidogênese.

Além disso, a exposição ao TBT resulta no aumento da adiposidade e induz distúrbios metabólicos através da modulação da atividade de PPAR γ (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013; GRÜN et al., 2006; KIRCHNER et al., 2010; PENZA et al., 2011; ZUO et al., 2011). De acordo com estes achados, ambos os grupos TBT apresentaram evidências distintas de um aumento do acúmulo de gotículas lipídicas e níveis de expressão proteica de PPAR γ na adrenal. Na glândula adrenal, o colesterol livre é derivado a partir de duas fontes, síntese *de novo* a partir de acetil-coenzima A ou, em maior extensão, a hidrólise de ésteres de colesterol armazenados em gotículas lipídicas (LI et al., 2002; NISHIKAWA et al., 1981). Portanto, a estimulação do PPAR γ pelo TBT nas glândulas adrenais é capaz de alterar a lipogênese e levar ao acúmulo de lipídio nesta glândula. A produção de corticosterona independente de ACTH pode envolver caminhos de sinalização de PPAR γ e outros receptores nucleares, como mostrado em outros efeitos do TBT (BERTULOSO et al., 2015; PENZA et al., 2011). Desta forma a dissociação periférica do eixo HPA pode ser relacionada a capacidade do TBT de ativar PPAR γ , além da indução do processo inflamatório.

Estudos relataram que o desequilíbrio no balanço redox, com consequente formação de ERO, são responsáveis por disfunções em diferentes sistemas (NORDBERG; ARNÉR, 2001; SIES, 1997; SPIERS et al., 2015). O TBT desregula o equilíbrio redox celular em áreas cerebrais, como o hipotálamo, resultando em um aumento de ERO e danos celulares (MITRA et al., 2013, 2014). Kaida e colab. (KAIDA et al., 2010) e Brown e colab. (BROWN et al., 2006) relataram que a ativação de mastócitos e neutrófilos levam a formação de ERO em tecido adrenal de ratos e outros tecidos. Nossos resultados concordam com esses achados prévios, mostrando níveis mais altos de ERO nas hipófises e adrenais em ambos os grupos TBT, os quais como demonstrados acima podem ser formados por ação direta do TBT sobre os órgãos e/ou pela inflamação desencadeada devida a exposição a este EDC.

Sabe-se que o excesso de ERO está associado à apoptose, pela ativação da via da caspase, o que pode levar a alterações no funcionamento celular (BUTTKE; SANDSTROM, 1994; CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; HADDAD, 2004). Estudos relataram que o TBT induz apoptose em diferentes modelos celulares, como timócitos de ratos, células T humanas e células Jurkat (GENNARI et al., 2000; NAKATSU; KOTAKE; OHTA, 2007; STRIDH et al., 1998, 2001). Nossos resultados concordam com esses achados prévios, mostrando maior expressão da proteína

caspase-3 na hipófise e nas glândulas adrenais em ambos os grupos TBT. Portanto o TBT induziu a apoptose na hipófise e adrenais dos ratos expostos por diretamente ativar a via das caspases e indiretamente pela formação de ERO.

O tratamento com TBT causou alterações morfológicas tanto na hipófise quanto na adrenal, como o aumento de estresse oxidativo, presença de células inflamatórias e deposição de colágeno. Na adrenal também houve aumento da deposição de lipídeos e aumento da expressão proteica de PPAR γ devido a exposição ao TBT, além de maior expressão do mRNA de StAR. Conseqüentemente houve uma desregulação hormonal do eixo HPA nos animais tratados com TBT, demonstrado nos experimentos de estresse de contenção e ADX, que pode ser explicada pela exposição ao TBT e também pela presença de inflamação no eixo, representada no hipotálamo como aumento na expressão de iNOS no grupo TBT (Figura 9).

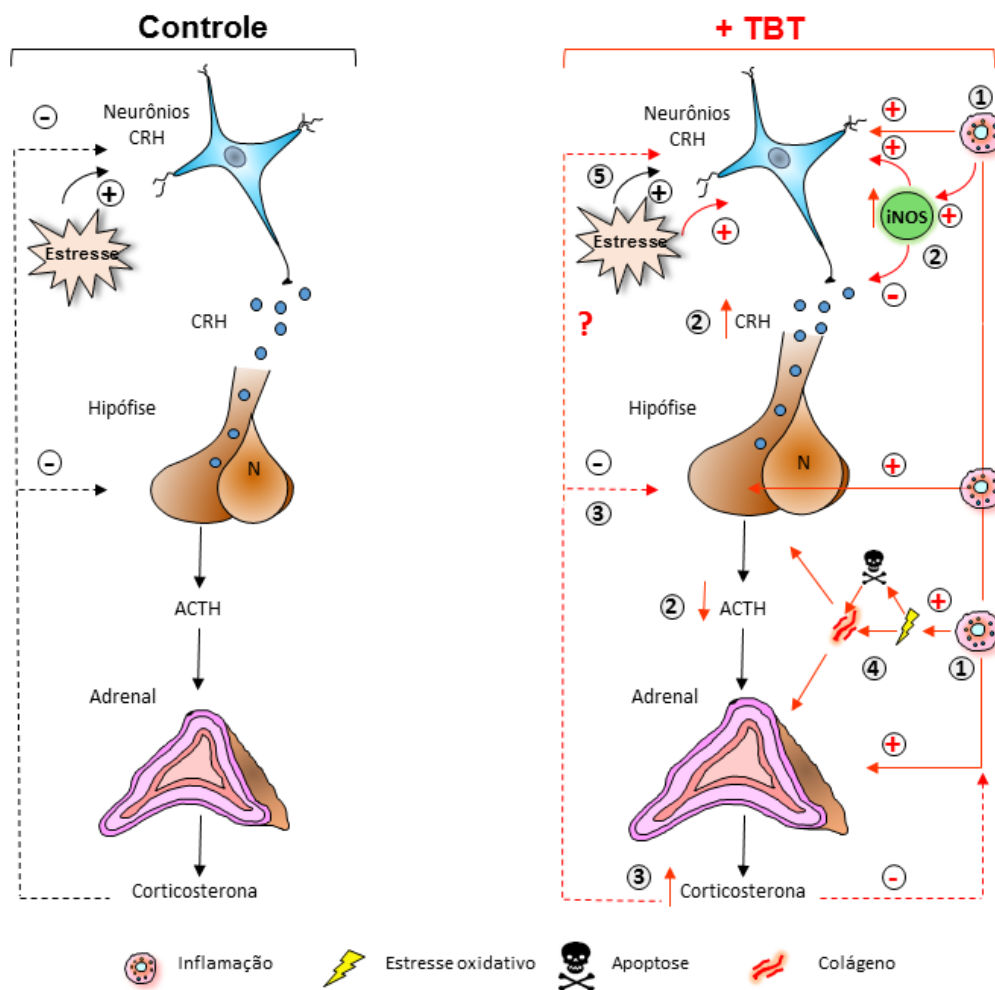


Figura 9. Modelo do potencial mecanismo de modulação do eixo HPA pelo TBT.

TBT leva a anormalidades morfofisiológicas (linha vermelha), tais como: (1) TBT leva à inflamação que estimula expressão hipotalâmica de mRNA de CRH e proteína iNOS. (2) A expressão da proteína iNOS hipotalâmica poderia estar associada com o comprometimento da liberação de ACTH estimulada por CRH. (3) A diminuição da secreção de ACTH também pode ser o resultado de um efeito regulador negativo induzido por níveis elevados de corticosterona. (4) TBT leva à inflamação que estimula o estresse oxidativo adrenal, apoptose e deposição de colágeno. (5) O TBT causou estresse e aumentou a expressão do mRNA de CRH no hipotálamo de ratas.

CONCLUSÃO

Como demonstrado, a exposição de ratas ao TBT foi responsável por alterações na morfofuncionalidade do eixo HPA. O TBT induziu hipertrofia da hipófise e adrenal, além de provocar um processo inflamatório em todo o eixo HPA, caracterizado pela presença de diferentes células inflamatórias e enzimas envolvidas nesse processo. Por consequência da ação direta do TBT ou ação indireta através da inflamação, foi observado aumento de ERO na hipófise e adrenal, além do aumento da expressão proteica da caspase-3 e da deposição de colágeno, que podem estar relacionadas com as alterações funcionais do eixo HPA. Além disso, o TBT como ativador do PPAR γ induziu aumento da sua expressão proteica na adrenal, a qual apresentou acúmulo de lipídios e alteração da expressão proteica da StAR, enzima da esteroidogênese. Esses efeitos culminaram na dissociação hormonal do eixo HPA, que se apresentou por aumento da expressão de CRH, redução de ACTH plasmático e aumento dos níveis de corticosterona, e com prejuízo do mecanismo de *feedback* no eixo.

Em conclusão, nosso modelo demonstrou que a função anormal do eixo HPA é atribuível aos efeitos disruptivos do TBT. Induzindo uma dissociação entre CRH, ACTH e corticosterona, que pode ser um efeito indireto causado pela inflamação no eixo. Além de alterações ao nível tecidual da hipófise e adrenais. Este trabalho aumenta a nossa compreensão dos efeitos tóxicos do TBT em diferentes níveis no eixo HPA. Portanto concluímos que o TBT age como um interferente do eixo HPA o qual altera os níveis hormonais e altera o processo de *feedback* deste, desta forma sendo uma potencial via para complicações metabólicas e reprodutivas em indivíduos expostos.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, G. HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 2–3, p. 90–95, fev. 2011.
- AGUILERA, G.; LIU, Y. The molecular physiology of CRH neurons. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 67–84, jan. 2012.
- ALZIEU, C. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & Coastal Management**, v. 40, n. 1, p. 23–36, 1998.
- ARAÚJO, F. A. et al. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- β 1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 29–34, jan. 2010.
- ARZT, E. et al. Pathophysiological Role of the Cytokine Network in the Anterior Pituitary Gland. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, n. 1, p. 71–95, jan. 1999.
- ATTINA, T. M. et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: a population-based disease burden and cost analysis. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 12, p. 996–1003, dez. 2016.
- BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 525–557, 10 fev. 2004.
- BARCELOS, L. S. et al. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 2, p. 352–8, ago. 2005.
- BERTULOSO, B. D. et al. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**, v. 235, n. 1, p. 45–59, maio 2015.
- BLABER, S. J. M. THE OCCURRENCE OF A PENIS-LIKE OUTGROWTH BEHIND THE RIGHT TENTACLE IN SPENT FEMALES OF *NUCELLA LAPILLUS* (L.). **Journal of Molluscan Studies**, v. 39, n. 2–3, p. 231–233, dez. 1970.
- BORNSTEIN, S. R. et al. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. **Trends in**

endocrinology and metabolism: TEM, v. 19, n. 5, p. 175–80, jul. 2008.

BORNSTEIN, S. R.; CHROUSOS, G. P. Adrenocorticotropin (ACTH)- and Non-ACTH-Mediated Regulation of the Adrenal Cortex: Neural and Immune Inputs. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 5, p. 1729–1736, maio 1999.

BOYER, I. J. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. **Toxicology**, v. 55, n. 3, p. 253–298, maio 1989.

BROWN, K. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157–169, jul. 2006.

BRYAN, G. W. et al. The Decline of the Gastropod *Nucella Lapillus* Around South-West England: Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 66, n. 3, p. 611, 11 ago. 1986.

BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunology Today**, v. 15, n. 1, p. 7–10, jan. 1994.

CALOGERO, A. E. et al. Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 3, p. 767–774, 1 set. 1988.

CASTRO, Í. B. DE et al. Imposex in endemic volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1065–1069, out. 2008.

CHAMORRO-GARCÍA, R. et al. Transgenerational Inheritance of Increased Fat Depot Size, Stem Cell Reprogramming, and Hepatic Steatosis Elicited by Prenatal Exposure to the Obesogen Tributyltin in Mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 3, p. 359–366, 15 jan. 2013.

CHAMP, M. A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 8, p. 935–940, ago. 2003.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis

by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3–4, p. 323–333, ago. 2000.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 259–284, 17 mar. 2005.

CHEN, F. et al. Sex differences in the adult HPA axis and affective behaviors are altered by perinatal exposure to a low dose of bisphenol A. **Brain Research**, v. 1571, p. 12–24, jul. 2014.

CHEN, R. et al. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 19, p. 8967–8971, 1 out. 1993.

CHENG, B. et al. Effects of prolonged ACTH-stimulation on adrenocortical cholesterol reserve and apolipoprotein E concentration in young and aged Fischer 344 male rats. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, n. 5–6, p. 335–345, set. 1998.

CLARK, B. J.; RANGANATHAN, V.; COMBS, R. Steroidogenic acute regulatory protein expression is dependent upon post-translational effects of cAMP-dependent protein kinase A. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 173, n. 1–2, p. 183–92, 28 fev. 2001.

COSTA, M. B. et al. *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda: Ranellidae): A New Bioindicator of Organotin Compounds Contamination? **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 65–69, 2008.

COSTA, M. B. et al. Assessing the Continuous Impact of Tributyltin from Antifouling Paints in a Brazilian Mangrove Area Using Intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as Biomarker. **International Journal of Oceanography**, v. 2013, n. Figure 1, p. 1–8, 2013.

CRISTALE, J. et al. Tributyltin in crustacean tissues: analytical performance and validation of method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 39–45, jan. 2012.

DE CASTRO, Í. B.; PERINA, F. C.; FILLMANN, G. Organotin contamination in South American coastal areas. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 3, p. 1781–1799, 5 mar. 2012.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 13 jun. 2005.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 65, n. 5, p. 360–8, maio 1997.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, jun. 2009.

DOMENICI LOMBARDO, L.; CORTESINI, C. The zona glomerulosa of the adrenal gland in rats with portacaval shunt. An ultrastructural and morphometric study. **International journal of experimental pathology**, v. 71, n. 5, p. 639–46, out. 1990.

DORNELES, P. R. et al. Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 1268–1276, dez. 2008.

DOS SANTOS, R. L. et al. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 β -estradiol in isolated rat heart. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 948–59, 2012.

EPA, U. S. E. P. A. Tributyltin oxide: Toxicological review. **Environmental Protection Agency**, n. 56, 1997.

FELSZEGHY, K.; BAGDY, G.; NYAKAS, C. Blunted pituitary-adrenocortical stress response in adult rats following neonatal dexamethasone treatment. **Journal of neuroendocrinology**, v. 12, n. 10, p. 1014–21, out. 2000.

FERNANDEZ, M. A. et al. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 463–476, abr. 2002.

FERNANDEZ, M. A. et al. Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro,

Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 59, n. 5, p. 435–452, jun. 2005.

FOWDEN, A. L.; LI, J.; FORHEAD, A. J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, n. 1, p. 113–122, 28 fev. 1998.

FUNAHASHI, N.; IWASAKI, I.; IDE, G. EFFECTS OF BIS (TRI-N-BUTYLTIN) OXIDE ON ENDOCRINE AND LYMPHOID ORGANS OF MALE RATS. **Pathology International**, v. 30, n. 6, p. 955–966, nov. 1980.

GAILLARD, R. C. et al. Tumor Necrosis Factor α Inhibits the Hormonal Response of the Pituitary Gland to Hypothalamic Releasing Factors*. **Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 101–106, jul. 1990.

GENNARI, A. et al. Organotins Induce Apoptosis by Disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ and Mitochondrial Activity, Causing Oxidative Stress and Activation of Caspases in Rat Thymocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 185–190, dez. 2000.

GORDON, J. R.; BURD, P. R.; GALLI, S. J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunology today**, v. 11, n. 12, p. 458–64, dez. 1990.

GORE, A. C. Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. **Hormones (Athens, Greece)**, v. 9, n. 1, p. 16–27, jul. 2008.

GRACELI, J. B. et al. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 40–52, 2013.

GROTE, K. et al. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, n. 3, p. 145–58, 1 out. 2004.

GRÜN, F. et al. Endocrine-Disrupting Organotin Compounds Are Potent Inducers of Adipogenesis in Vertebrates. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 9, p. 2141–2155, set. 2006.

GUÉRIN, T. et al. Organotin levels in seafood and its implications for health risk in high-seafood consumers. **Science of The Total Environment**, v. 388, n. 1–3, p. 66–77, dez. 2007.

- HADDAD, J. J. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 4, p. 475–493, abr. 2004.
- HARVEY, P. W. Adrenocortical endocrine disruption. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 1, p. 199–206, jan. 2016.
- HARVEY, P. W.; EVERETT, D. J.; SPRINGALL, C. J. Adrenal toxicology: a strategy for assessment of functional toxicity to the adrenal cortex and steroidogenesis. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 27, n. 2, p. 103–15, 2007.
- HENSON, P. M.; HUME, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 244–250, maio 2006.
- HOCH, M. Organotin compounds in the environment — an overview. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 7–8, p. 719–743, jun. 2001.
- IMO. Sistemas antiincrustantes: hacia una solución no tóxica. **La OMI al día**, v. 44, n. 0, p. 1–32, 1999.
- IMO. Status of multilateral Conventions and instruments in respect of which the International Maritime Organization or its Secretary - General performs depositary or other functions. n. May, p. 526, 2017.
- ISHIHARA, Y. et al. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochemistry International**, v. 60, n. 8, p. 782–790, jun. 2012.
- IUCHI, T. et al. MRI Prediction of Fibrous Pituitary Adenomas. **Acta Neurochirurgica**, v. 140, n. 8, p. 779–786, 7 set. 1998.
- JEFCOATE, C. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 881–890, 1 out. 2002.
- JENKINS, S. et al. Oral Exposure to Bisphenol A Increases Dimethylbenzanthracene-Induced Mammary Cancer in Rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 6, p. 910–915, jun. 2009.

KAIDA, S. et al. Compound 48/80 causes oxidative stress in the adrenal gland of rats through mast cell degranulation. **Free Radical Research**, v. 44, n. 2, p. 171–180, 3 jan. 2010.

KANCZKOWSKI, W. et al. Characterization of the LPS-induced inflammation of the adrenal gland in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 371, n. 1–2, p. 228–235, maio 2013.

KANCZKOWSKI, W. et al. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 408, p. 241–248, jun. 2015.

KIM, J. S. et al. Correlation of mast cells with spindle cell hyperplasia in the adrenal cortex of IQI/Jic mice. **Experimental animals**, v. 46, n. 2, p. 103–9, abr. 1997.

KIM, J. S. et al. Expression of cytokines and proteases in mast cells in the lesion of subcapsular cell hyperplasia in mouse adrenal glands. **Toxicologic pathology**, v. 28, n. 2, p. 297–303, 2000.

KINO, T.; CHROUSOS, G. P. Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. **The Journal of endocrinology**, v. 169, n. 3, p. 437–45, jun. 2001.

KIRCHNER, S. et al. Prenatal Exposure to the Environmental Obesogen Tributyltin Predisposes Multipotent Stem Cells to Become Adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 3, p. 526–539, mar. 2010.

KRAJNC, E. I. et al. Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 363–386, set. 1984.

LAMOUNIER-ZEPTER, V.; EHRHART-BORNSTEIN, M. Fat tissue metabolism and adrenal steroid secretion. **Current hypertension reports**, v. 8, n. 1, p. 30–4, abr. 2006.

LATINI, G. Monitoring phthalate exposure in humans. **Clinica Chimica Acta**, v. 361, n. 1–2, p. 20–29, nov. 2005.

LI, H. et al. Hormone-Sensitive Lipase Deficiency in Mice Causes Lipid Storage in the Adrenal Cortex and Impaired Corticosterone Response to Corticotropin Stimulation. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3333–3340, set. 2002.

LIU, L. L. et al. Organotin concentrations in three intertidal neogastropods from the coastal waters of Taiwan. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 1, p. 113–118, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MAKINO, S. et al. Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **Brain Research**, v. 850, n. 1–2, p. 136–143, dez. 1999.

MARIC, N. P.; ADZIC, M. Pharmacological modulation of HPA axis in depression - new avenues for potential therapeutic benefits. **Psychiatria Danubina**, v. 25, n. 3, p. 299–305, set. 2013.

MATTHIESSEN, P. Detection, monitoring, and control of tributyltin-an almost complete success story. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 487–489, mar. 2013.

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P. E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 37–43, jan. 1998.

MITRA, S. et al. Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood–brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: An in vivo and in vitro study. **Toxicology**, v. 310, p. 39–52, ago. 2013.

MITRA, S. et al. Consequences of tributyltin chloride induced stress in Leydig cells: An ex-vivo approach. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 850–860, mar. 2014.

MITRA, S.; SIDDIQUI, W. A.; KHANDELWAL, S. Differential susceptibility of brain regions to tributyltin chloride toxicity. **Environmental Toxicology**, v. 30, n. 12, p. 1393–1405, dez. 2015.

MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 7, p. 391–402, 27 maio 2014a.

MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 2:

- Mechanisms. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 7, p. 403–11, 27 jul. 2014b.
- MORITA, Y. et al. Lack of trimethyltin (TMT)-induced elevation of plasma corticosterone in PACAP-deficient mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1070, n. 1, p. 450–6, 1 jul. 2006.
- MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions*. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 25–44, jan. 1984.
- NAGANUMA, H.; SATOH, E.; NUKUI, H. Technical considerations of transsphenoidal removal of fibrous pituitary adenomas and evaluation of collagen content and subtype in the adenomas. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 42, n. 5, p. 202–12; discussion 213, maio 2002.
- NAGATA, S.; HANAYAMA, R.; KAWANE, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 619–30, 5 mar. 2010.
- NAKATSU, Y.; KOTAKE, Y.; OHTA, S. Concentration dependence of the mechanisms of tributyltin-induced apoptosis. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 438–47, jun. 2007.
- NICOLAIDES, N. C. et al. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 1–2, p. 6–19, 2015.
- NISHIKAWA, T. et al. Studies on Cholesterol Esterase in the Rat Adrenal*. **Endocrinology**, v. 108, n. 3, p. 932–936, mar. 1981.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology & medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–312, 1 dez. 2001.
- PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. Transcriptional regulation of the adrenal steroidogenic enzymes. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 4, n. 2, p. 46–50, mar. 1993.
- PÄTH, G. et al. Interleukin-6 and the Interleukin-6 Receptor in the Human Adrenal Gland: Expression and Effects on Steroidogenesis 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 7, p. 2343–2349, jul. 1997.

- PENZA, M. et al. The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 255, n. 1, p. 65–75, 15 ago. 2011.
- PEREIRO, N. et al. Regulation of corticosterone secretion is modified by PFOS exposure at different levels of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult male rats. **Toxicology letters**, v. 230, n. 2, p. 252–62, 15 out. 2014.
- PODRATZ, P. L. et al. Tributyltin Impairs the Reproductive Cycle in Female Rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 1035–1046, 15 ago. 2012.
- PODRATZ, P. L. et al. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 57, p. 29–42, nov. 2015.
- POLITO, A. et al. Changes in CRH and ACTH Synthesis during Experimental and Human Septic Shock. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e25905, 3 nov. 2011.
- PRIGENT, H.; MAXIME, V.; ANNANE, D. Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 4, p. 243–52, ago. 2004.
- QUENNELL, J. H. et al. Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1541–50, abr. 2011.
- RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, maio 2012.
- REED, C. T.; ADAMS, K.; SHENOY, V. Xanthogranulomatous Adrenalitis: A Case Report of a Diabetic, 55-Year-Old Male. **Endocrine Pathology**, v. 26, n. 3, p. 229–231, 5 set. 2015.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–23, 20 out. 2005.
- RIVIER, C. Role of nitric oxide in regulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal

- axis response to endotoxemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 992, p. 72–85, maio 2003.
- RODRIGUES, S. M. L. et al. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicology letters**, v. 225, n. 3, p. 378–85, 21 mar. 2014.
- ROSEN, E. D. et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes & development**, v. 14, n. 11, p. 1293–307, 1 jun. 2000.
- ROSENBERG, E. Organotin compounds in foods. In: **Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 430–475.
- ROSOL, T. J. et al. Adrenal Gland: Structure, Function, and Mechanisms of Toxicity. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 41–48, 2 jan. 2001.
- ROTONDO, F. et al. Adenohypophysitis in rat pituitary allografts. **International journal of experimental pathology**, v. 91, n. 5, p. 445–50, out. 2010.
- SAITOH, M. et al. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 1, p. 198–204, 23 nov. 2001.
- SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 443–6, 14 nov. 1997.
- SANTOS, D. M. DOS et al. CONTAMINATION AND IMPACT OF ORGANOTIN COMPOUNDS ON THE BRAZILIAN COAST. p. 31–59, 2011.
- SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. **Federation proceedings**, v. 44, n. 1 Pt 2, p. 221–7, jan. 1985.
- SCHOBBER, A. et al. Distinct populations of macrophages in the adult rat adrenal gland: a subpopulation with neurotrophin-4-like immunoreactivity. **Cell and tissue research**, v. 291, n. 3, p. 365–73, mar. 1998.
- SENA, G. C. et al. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 319, p. 22–38,

mar. 2017.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–5, mar. 1997.

SILVERMAN, M. N. et al. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. **Viral immunology**, v. 18, n. 1, p. 41–78, 2005.

SONAK, S. et al. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of environmental management**, v. 90 Suppl 1, n. SUPPL. 1, p. S96-108, fev. 2009.

SOUSA, A. C. A. et al. History on organotin compounds, from snails to humans. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 117–137, 11 mar. 2014.

SPANSWICK, S. C.; EPP, J. R.; SUTHERLAND, R. J. Time-course of hippocampal granule cell degeneration and changes in adult neurogenesis after adrenalectomy in rats. **Neuroscience**, v. 190, p. 166–76, 8 set. 2011.

SPIERS, J. G. et al. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 456, 19 jan. 2015.

STINNETT, G. S.; WESTPHAL, N. J.; SEASHOLTZ, A. F. Pituitary CRH-binding protein and stress in female mice. **Physiology & behavior**, v. 150, p. 16–23, 15 out. 2015.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells*. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 3, p. 221–244, jun. 1996.

STRIDH, H. et al. Corrigendum to: Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis (FEBS 20394). **FEBS Letters**, v. 437, n. 1–2, p. 163–163, 16 out. 1998.

STRIDH, H. et al. Organotin-Induced Caspase Activation and Apoptosis in Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 7, p. 791–798, jul. 2001.

SWENNEN, C. et al. Imposex in Sublittoral and Littoral Gastropods from the Gulf of Thailand and Strait of Malacca in Relation to Shipping. **Environmental Technology**,

v. 18, n. 12, p. 1245–1254, dez. 1997.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147–56, 30 dez. 1994.

TRASANDE, L. et al. Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 4, p. 1245–1255, 2015.

TURNER, A.; GLEGG, G. TBT-based antifouling paints remain on sale. **Marine pollution bulletin**, v. 88, n. 1–2, p. 398–400, 15 nov. 2014.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 13 jun. 2009.

VAHL, T. P. et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 289, n. 5, p. E823-8, nov. 2005.

VAL, P.; SWAIN, A. Gene dosage effects and transcriptional regulation of early mammalian adrenal cortex development. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 105–14, 8 jul. 2010.

VANKELECOM, H. et al. Interferon-gamma inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures. **Endocrinology**, v. 126, n. 6, p. 2919–26, jun. 1990.

VIDAL, S. et al. Immunocytochemical localization of mast cells in lymphocytic hypophysitis. **American journal of clinical pathology**, v. 117, n. 3, p. 478–83, mar. 2002.

WEGER, B. D. et al. A chemical screening system for glucocorticoid stress hormone signaling in an intact vertebrate. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 7, p. 1178–83, 20 jul. 2012.

WESTER, P. W. et al. Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in the rat. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 28, n. 3,

p. 179–96, mar. 1990.

WHALEN, M. M.; LOGANATHAN, B. G.; KANNAN, K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. **Environmental research**, v. 81, n. 2, p. 108–16, ago. 1999.

WOLKERSDÖRFER, G. W. et al. Lymphocytes stimulate dehydroepiandrosterone production through direct cellular contact with adrenal zona reticularis cells: a novel mechanism of immune-endocrine interaction. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 11, p. 4220–7, nov. 1999.

XIA, L. P. et al. Prenatal ethanol exposure enhances the susceptibility to metabolic syndrome in offspring rats by HPA axis-associated neuroendocrine metabolic programming. **Toxicology letters**, v. 226, n. 1, p. 98–105, 7 abr. 2014.

YAMAZAKI, T. et al. Tributyltin disturbs bovine adrenal steroidogenesis by two modes of action. **Steroids**, v. 70, n. 14, p. 913–21, 15 dez. 2005.

ZEIDAN, G. C.; BOEHS, G. Assessment of tributyltin contamination based on imposex in *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) along southern Bahia coast, northeastern Brazil. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 77, n. 1, p. 185–190, mar. 2017.

ZHANG, C. et al. Prenatal xenobiotic exposure and intrauterine hypothalamus–pituitary–adrenal axis programming alteration. **Toxicology**, v. 325, n. 5, p. 74–84, nov. 2014.

ZHIVOTOVSKY, B. et al. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 230, n. 3, p. 481–8, 23 jan. 1997.

ZHOU, C. et al. Reduction of fibrosis in dibutyltin dichloride-induced chronic pancreatitis using rat umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly. **Pancreas**, v. 42, n. 8, p. 1291–302, nov. 2013.

ZHU, L. et al. PPAR γ co-activator-1 α co-activates steroidogenic factor 1 to stimulate the synthesis of luteinizing hormone and aldosterone. **The Biochemical journal**, v. 432, n. 3, p. 473–83, 15 dez. 2010.

ZUO, Z. et al. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice.

Environmental toxicology, v. 26, n. 1, p. 79–85, fev. 2011.

ANEXOS

ORIGINAL RESEARCH



The Environmental Pollutant Tributyltin Chloride Disrupts the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis at Different Levels in Female Rats

Eduardo Merlo, Priscila L. Podratz, Gabriela C. Sena, Julia F. P. de Araújo, Leandro C. F. Lima, Izabela S. S. Alves, Letícia N. Gama-de-Souza, Renan Pelição, Lívia C. M. Rodrigues, Poliane A. A. Brandão, Maria T. W. D. Carneiro, Rita G. W. Pires, Cristina Martins-Silva, Tamara A. Alarcon, Leandro Miranda-Alves, Ian V. Silva, and Jones B. Graceli

Department of Morphology (E.M., P.L.P., G.C.S., J.F.P.d.A., I.S.S.A., L.N.G.-d.S., I.V.S., J.B.G.), Federal University of Espírito Santo, Vitória ES, 29040090 Brazil; Department of Biophysics and Physiology (L.C.F.L.), Federal University of Minas Gerais, Vitória ES, 29040090 Brazil; Department of Physiological Sciences (R.P., L.C.M.R., R.G.W.P., C.M.-S., T.A.A.), Federal University of Espírito Santo, Vitória ES, 29040090 Brazil; Department of Chemistry (P.A.A.B., M.T.W.D.C.), Federal University of Espírito Santo, Vitória ES, 29040090 Brazil; Experimental Endocrinology Research Group (L.M.-A.), Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Vitória ES, 29040090 Brazil; and Postgraduate Program in Endocrinology (L.M.-A.), School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Vitória ES, 29040090 Brazil

Tributyltin chloride (TBT) is an environmental contaminant that is used as a biocide in antifouling paints. TBT has been shown to induce endocrine-disrupting effects. However, studies evaluating the effects of TBT on the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis are especially rare. The current study demonstrates that exposure to TBT is critically responsible for the improper function of the mammalian HPA axis as well as the development of abnormal morphophysiology in the pituitary and adrenal glands. Female rats were treated with TBT, and their HPA axis morphophysiology was assessed. High CRH and low ACTH expression and high plasma corticosterone levels were detected in TBT rats. In addition, TBT leads to an increased in the inducible nitric oxide synthase protein expression in the hypothalamus of TBT rats. Morphophysiological abnormalities, including increases in inflammation, a disrupted cellular redox balance, apoptosis, and collagen deposition in the pituitary and adrenal glands, were observed in TBT rats. Increases in adiposity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ protein expression in the adrenal gland were observed in TBT rats. Together, these data provide *in vivo* evidence that TBT leads to functional dissociation between CRH, ACTH, and corticosterone, which could be associated an inflammation and increased of inducible nitric oxide synthase expression in hypothalamus. Thus, TBT exerts toxic effects at different levels on the HPA axis function. (*Endocrinology* 157: 2978–2995, 2016)

The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis is one of the most important neuroendocrine axes, and it plays a key role in stress processes, which is critical for normal physiology (1, 2). The hypothalamic CRH plays a

pivotal role in regulating the cascade of hormonal events that is necessary for adrenal maturation. CRH is synthesized and released by parvocellular neurons and stimulates the production and secretion of ACHT in corticotrophs

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in USA
Copyright © 2016 by the Endocrine Society
Received October 22, 2015. Accepted May 31, 2016.
First Published Online June 7, 2016

For News & Views see page 2996

Abbreviations: ADX, adrenalectomy; CON, control; CYP11B, steroid 11 β -hydroxylase; D, days; DHE, dihydroethidium; EDC, endocrine-disrupting chemical; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; H&E, hematoxylin and eosin; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MPO, myeloperoxidase; NAG, n-acetyl- β -d-glucosaminidase; OS, oxidative stress development process; OT, organotin; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; qPCR, quantitative PCR; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; TBT, tributyltin chloride; TBTO, bis (trin-butyltin) oxide; TEM, transmission electron microscopy; TM, trichrome; UFES, Federal University of Espírito Santo.