

**Efeitos da Exposição Pré-gestacional à Moluscos
Contaminados com Organoestânicos sobre a
Morfofisiologia Reprodutivo-Placentária, os Substratos
Energéticos e a Herança aos Fetos em Ratas**

Priscila Lang Podratz

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, outubro de 2018

Priscila Lang Podratz

**Efeitos da Exposição Pré-gestacional à Moluscos
Contaminados com Organoestânicos sobre a
Morfofisiologia Reprodutivo-Placentária, os Substratos
Energéticos e a Herança aos Fetos em Ratas**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli

Coorientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, outubro de 2018



REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº Matrícula do^(a) Candidato^(a): 2014230815

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "Efeitos da Exposição Pré-gestacional Materna a Moluscos Contaminados com Organoestânicos sobre a Morfofisiologia Reprodutivo-Placentária e a Herança Multigeracional Fetal de Ratos", apresentada e defendida publicamente pela aluna **Priscila Lang Podratz**, no dia 11 de outubro de 2018, às 13h30, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 11 de outubro de 2018.


Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli
(Orientador)


Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
(Membro Externo)


Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
(Coorientador)


Profª Drª Girandira Alexandre Brasil Amorim
(Membro Externo)


Profª Drª Livia Carla de Melo Rodrigues
(Membro Interno)


Profª Drª Sonia Alves Gouvea
(Membro Interno)

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

Podratz, Priscila Lang, 1991 -
P742e Efeitos da exposição pré-gestacional à moluscos contaminados com
organoestânicos sobre a morfofisiologia reprodutivo-placentária, os
substratos energéticos e a herança aos fetos em ratas / Priscila Lang
Podratz – 2018.
160 f. : il.

Orientador: Jones Bernardes Graceli.
Coorientador: Elisardo Corral Vasquez.

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

1. Reprodução. 2. Metabolismo Energético. 3. Placenta. 4. Ratos.
I. Graceli, Jones Bernardes. II. Vasquez, Elisardo Corral. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

Este trabalho foi realizado majoritariamente no Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, associado à Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, e no Laboratório multiusuário de Histotécnicas da Universidade Federal do Espírito Santo, com apoio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada aos meus pais, Dirce e Ademar.

“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.” (Cora Carolina)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **Deus**, pela dádiva da vida e por ter me iluminado nesta caminhada, fornecendo muita força e perseverança na luta por este objetivo, e sabedoria e crescimento diante das dificuldades.

Aos meus pais, **Dirce e Ademar**, que sempre se preocuparam com a minha formação pessoal e acadêmica, me passaram os valores que me fizeram a pessoa que sou, abdicaram muitas vezes de suas vontades para me dar suporte e demonstraram amor incondicional; aos meus irmãos, **Viviany e Flavio**, pelo apoio, carinho e por serem presentes nos momentos de realizações e fraquezas (agradeço por poder contar sempre com todos vocês); ao Flavio e a minha cunhada **Alessandra**, por terem nos presenteado com o **Miguel**, afilhado e sobrinho que se tornou a alegria das nossas vidas e que por tantas vezes me ajudou a sorrir e a brincar, mesmo quando as preocupações e chateações aparentavam ser maiores.

Ao meu namorado, **Fabricio**, companheiro nesses quase 4 anos, sempre disposto a me ouvir pacientemente e com uma piada na ponta da língua para me fazer rir e distrair. Agradeço por ter sido meu ombro amigo nos momentos de choro, desânimo e frustrações, e também durante as alegrias e reconhecimento. Por sempre buscar me ajudar e por entender os períodos de correria e de estresse.

A **tia Nair e tio Adolfo**, pelo grande incentivo, alegria, carinho e cuidado que sempre tiveram por mim; meus primos **Carol, Camila, Yasmin, Jean, Tiago e Lucas**, que, apesar da distância física (para alguns), seguimos juntos com boas recordações, saudade, apoio e carinho; meus avôs (*in memoriam*) **Flora e Abraão, Ledia e Martinho**, por serem grandes exemplos de luta pela vida.

Aos grandes amigos do curso de Farmácia: **Renatinha, Mari, Pati, Soni e Pedro**. Embora tenhamos seguido, profissionalmente, por caminhos diferentes, a amizade continua firme e sou muito grata por isso. Obrigada pelo apoio, por poder desabafar, e por terem me estimulado e encorajado a persistir. As minhas amigas de infância, **Lorena e Kárin**, pelo apoio, incentivo e pelos encontros sempre tão cheios de felicidade, luz e gargalhadas. As amigas que conheci no laboratório: a **May**, por me transmitir uma confiança inabalável e por sempre me dizer aquilo que eu preciso ouvir; a **Ju**, pelas inúmeras ajudas nos experimentos e por todo conhecimento intra- e extra-laboratório compartilhado, crescemos muito nas

nossas conversas, principalmente nos últimos 2 anos, e fui muito feliz por poder dividir contigo tantos sorrisos, choros, chocolates, cansaço, festas e viagens; a **Gabi**, pela companhia, alegria e viagens maravilhosas feitas juntas durante os vários anos de lab e, nestes 2 últimos, pelas conversas, desabafos e incentivo pela busca constante de coisas melhores.

A todos os **35 colegas e amigos** orientados pelo prof. Jones ao longo destes 8 anos e 4 meses que participei do laboratório, por transformarem muitas e cansativas horas de experimentos numa diversão, por termos criado uma convivência agradável e pelos ensinamentos. Em especial, aos atuais amigos e colegas de laboratório, **Oscar, Tiago, Eduardo e Charles**, e também aos alunos do prof. Ian, **Higor, Neuza, Maria, Ludmila e Nicole**, agradeço pela ajuda nos experimentos e empatia.

A todos os **colegas de pesquisa**, que me ajudaram com tanta presteza e carinho; a todos os **professores** do PPGCF, dos departamentos de Morfologia e de Ciências Farmacêuticas, que abriram suas portas e colaboraram para que esta tese pudesse ser concluída; e aos **laboratórios multiusuários** da UFES, em especial, ao Histotécnico e as meninas, **Luciene, Viviane e Rafaela**, que sempre foram muito solícitas e me deram tanto apoio e ajuda nestes últimos 2 anos.

A **Dr^a. Mércia da Costa** e sua aluna **Millena Araujo**, do Dept. de Ciências Biológicas, pela coleta e avaliações nos moluscos *Leucozonia nassa*; a **profa. Maria Tereza Carneiro** e a sua aluna **Poliane Brandão**, do Dept. de Química, pelas dosagens do estanho; ao **prof. Ian**, por ter me dado a primeira oportunidade de conhecer um laboratório de pesquisa; ao **Diego e Afrânio**, por terem me permitido acompanhá-los nos experimentos no período de adaptação ao laboratório; ao **prof. Vasquez**, pela ajuda com a escrita do projeto de doutorado e pelo respeito e educação que tem ao compartilhar o seu enorme conhecimento pessoal e científico.

Ao **prof. Jones**, por ter aberto portas para conhecermos outros centros científicos, pela oportunidade de realizar o doutorado e desenvolver esta pesquisa. Fico feliz de, após muita dedicação, ver o “trabalho de extrato” sendo reconhecido e concorrendo a prêmios em congressos internacional (ENDO 2017) e nacional (FESBE 2018).

Ao apoio financeiro da **UFES, CAPES, FAPES e CNPq**.

RESUMO

Compostos organoestânicos (OTs), como o tributilestanho (TBT), são poluentes ambientais e a principal via de exposição humana ocorre por ingestão de mariscos contaminados. Estes agentes químicos atuam como desreguladores endócrinos em invertebrados marinhos e também em roedores, afetando, principalmente, a função reprodutiva e o metabolismo de lipídios e carboidratos. OTs podem acumular-se na placenta e são transferidos aos fetos. No entanto, ainda não há um modelo de biotransferência dos OTs para mamíferos, e os dados sobre o período gestacional e prole são escassos. O objetivo deste estudo foi avaliar a gênese e os mecanismos envolvidos nas alterações reprodutivas e do estado energético em ratas adultas, na disfunção placentária e nos prejuízos aos fetos de ambos os gêneros induzidos pela exposição direta e por herança multigeracional materna de ingestão de moluscos contaminados com OTs. Ratas Wistar de 3 meses de idade foram divididas em três grupos: tratadas diariamente com veículo (água destilada, controle, CON), com os gastrópodes *Leucozonia nassa* sem OTs (LNN, 600 mg/dia, coletados na Praia de Aracruz, Espírito Santo, área sem contaminação com OTs) ou *Leucozonia nassa* imposexados (LNI, 600 mg/dia, coletados na Praia da Ilha do Frade, Vitória, Espírito Santo, área contaminada com OTs), por 15 dias, via gavagem. Parte das ratas foram utilizadas para a avaliação da morfofisiologia reprodutiva e a outra parte foi alocada com machos controle para o acasalamento e posterior cesariana no 20º dia gestacional, para a análise de parâmetros gestacionais e a coleta da placenta e dos fetos. Ratas adultas LNI apresentaram aumento da concentração sérica de estanho, evidenciando a transferência dos OTs a partir da ingestão de moluscos contaminados. Essas fêmeas LNI desenvolveram irregularidade no ciclo estral; elevação nos níveis séricos de estrogênio, progesterona e testosterona; distúrbios na foliculogênese ovariana e deposição de colágeno perifolicular; hipertrofia e pontos de pseudoestratificação de epitélio luminal, processo inflamatório, aumento na deposição de colágeno e maior expressão de ER α uterino. Na fertilidade do grupo LNI, foi observado o atraso no estabelecimento da gestação, redução na frequência de ninhadas, diminuição do número de implantações e consequente aumento de perdas pré-implantação embrionária. Grávidas LNI exibiram aumento do perfil lipídico, com acúmulo hepático de vacúolos lipídicos redondos, de limites nítidos e tamanhos variáveis. Placentas LNI apresentaram aumento do peso e da porcentagem de células de glicogênio, associado a maior expressão de GLUT1 e de transferência de glicose pelo cordão umbilical; acúmulo de lipídios (triglicerídeos e colesterol total), com maior fornecimento de colesterol aos fetos; processo inflamatório; maior expressão das proteínas reguladoras IR β , p-Akt e p-mTOR. Os fetos LNI, de ambos os gêneros, mostraram maior peso corporal; aumento de

megacariócitos, lipídios e estresse oxidativo hepáticos. Estes achados conferem às ratas expostas diretamente aos OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, características de síndrome do ovário policístico, e tal desregulação endócrina prejudica a formação da placenta e a expressão dos transportadores de nutrientes placentários, resultando em distúrbios antropométrico e hepático fetais, decorrentes de respostas adaptativas à influência materna.

Palavras-chave: biotransferência dos OTs, desregulador endócrino, reprodução, placenta, herança multigeracional.

ABSTRACT

Organotin compounds (OTs) such as tributyltin (TBT) are environmental pollutants, with human exposure occurring mainly through the ingestion of contaminated shellfish. These chemical agents act as endocrine disruptors in marine invertebrates and also in rodents, affecting mainly the reproductive function and the lipids and carbohydrates metabolism. OTs can accumulate in the placenta and be transferred to fetuses. However, there is still no biotransfer model of OTs for mammals and rather few data on the gestational period and offspring. This study aims to evaluate the genesis and mechanisms involved in the reproductive and energy status alterations in adult female rats, placental dysfunction and fetal impairment in both genders, induced by direct exposure and maternal multigenerational inheritance through the ingestion of OTs-contaminated molluscs. Three-months-old female Wistar rats were divided into three groups: daily treated with vehicle (distilled water, control, CON), with *Leucozonia nassa* molluscs without OTs (LNN, 600 mg / day collected at Aracruz Beach, Espírito Santo, area without OTs contamination), or *Leucozonia nassa* with imposex (LNI, 600 mg / day, collected at Ilha do Frade Beach, Vitória, Espírito Santo, area contaminated with OTs), for 15 days, via gavage. Some of the animals were used for the evaluation of reproductive morphophysiology, with the remaining ones being allocated with control males for mating and subsequent cesarean section on the 20th gestational day, for the analysis of gestational parameters and collection of the placenta and fetuses. Adult LNI rats showed increased serum tin concentration, evidencing the transfer of OTs through the intake of contaminated molluscs. LNI rats developed irregularities in the estrous cycle; elevation of estrogen, progesterone and testosterone levels; ovarian folliculogenesis disorders and deposition of perifollicular collagen; hypertrophy of the luminal epithelium with pseudostratified areas, inflammatory process, increased collagen deposition and increased expression of uterine ER α . Regarding fertility parameters of the LNI group, we observed delays in establishing pregnancy, reduction in litter frequency, decrease in the number of implantations and consequent increase in pre-implantation embryo losses. Pregnant LNIs showed increased lipid profile, with hepatic accumulation of round lipid vacuoles with clearly-defined boundaries and variable sizes. Placentas from LNIs displayed increases in weight and percentage of glycogen cells, which is associated with higher expression of GLUT1 and with glucose transfer through the umbilical cord; accumulation of lipids (triglycerides and total cholesterol), with higher cholesterol supply to the fetuses; inflammatory process; higher expression of the regulatory proteins IR β , p-Akt and p-mTOR. LNI fetuses of both genders exhibited higher body weight, increased megakaryocytes, lipids and oxidative stress in the liver. According to these findings, female rats directly exposed to OTs through the ingestion

of contaminated molluscs revealed features of polycystic ovary syndrome. This endocrine disruption impairs placental formation and the expression of placental nutrient transporter, resulting in fetal anthropometric and hepatic disorders, due to adaptive responses to maternal influence.

Key words: OTs biotransfer, endocrine disruptor, reproduction, placenta, multigenerational inheritance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural química dos OTs mais descritos na literatura	24
Figura 2: Variações hormonais e esfregaço vaginal das quatro fases do ciclo estral	32
Figura 3: Esteroidogênese ovariana	33
Figura 4: Imagem ilustrativa da organização e estrutura dos folículos ovarianos	35
Figura 5: Controle hormonal e adaptação uterina para a implantação de embriões em roedores.	37
Figura 6: Decidualização e placentação em roedores.....	38
Figura 7: Representação esquemática e histológica da placenta, suas camadas e estruturas circundantes ao sítio de desenvolvimento fetal	40
Figura 8: Mecanismo molecular de regulação dos transportadores de nutrientes placentários via IR/IGF1R/mTOR.....	43
Figura 9: Gastrópode <i>Leucozonia nassa</i>	49
Figura 10: Localização da área de coleta das amostras de <i>L. nassa</i> imposexadas	50
Figura 11: Modelo esquemático dos tratamentos e dos protocolos experimentais realizados em ratas adultas, grávidas e fetos	52
Figura 12: Imagens representativas do útero e ovários obtidos de ratas grávidas após cesariana, no 20º DG.....	60
Figura 13: Dosagem de Sn nos extratos de moluscos (A) e no soro das ratas (B).....	62
Figura 14: Avaliação do ciclo estral.....	63
Figura 15: Análise de peso dos órgãos reprodutivos femininos e dos hormônios gonadotróficos e sexuais	64
Figura 16: Análise histológica nos ovários, contagem dos folículos e corpo lúteo, e quantificação da deposição de colágeno	66
Figura 17: Histomorfometria uterina, detecção de células inflamatórias e quantificação da deposição de colágeno nos úteros.....	67
Figura 18: Análise proteica por western blot dos receptores de estrogênio e progesterona	68
Figura 19: Análise de ganho de peso corporal e perfis glicêmicos e lipídicos das ratas adultas e grávidas.....	70
Figura 20: Avaliação da fertilidade ao longo de 120 dias	71
Figura 21: Avaliação da implantação embrionária.....	72
Figura 22: Caracterização placentária	74
Figura 23: Análise proteica por western blot de proteínas regulatórias via IR/mTOR na placenta.....	75
Figura 24: Análise histológica dos fígados dos fetos.....	77

Figura 25: Análise da deposição lipídica e estresse oxidativo nos fígados dos fetos 79

Figura 26: Esquema resumindo os efeitos tóxicos dos OTs observados neste estudo.... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos usados na avaliação da expressão proteica.....	58
Tabela 2: % de fêmeas/machos e dados antropométricos dos fetos	76
Tabela 3: Estudos sobre os critérios de SOP em mulheres e roedores	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSVL	Acil-CoA sintetase da família de cadeia muito longa
AE-PCOS	<i>Androgen Excess and PCOS Society</i>
Akt/PKB	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteínas quinases ativadas por adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
At	Folículo atrésico
ATAT	Acil coenzima A aciltransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt</i>
BMP15	Proteína Morfogenética Óssea 15
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
CL	Corpo lúteo
CON	Controle
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYP11A1	Colesterol desmolase
CYP17A1	17 α -mono-oxigenase de esteroide ou 17 α -hidroxilase
CYP19A1	Aromatase
DBT	Dibutilestanho
De	Decídua
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DEPTOR	Proteína que interage com mTOR contendo domínio DEP
DG	Dia gestacional / dias gestacionais
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
DPhT	Difenilestanho
E	Estro
EL	Epitélio luminal
eIF4E	Fator de iniciação eucariótico 4E
END	Endométrio
EPA-USA	Agência de Proteção Ambiental Americana
EPM	Erro padrão de média
ER-α	Receptor de estrogênio alfa
ER-β	Receptor de estrogênio beta

ERK 1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1/2
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FGFs	Fatores de crescimento de fibroblastos
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	Glândula da cápsula
GDF9	Fator de crescimento e diferenciação-9
GH	Hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador de GH
GLUT	Transportador de glicose
GM	Glândulas metriais
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPER	Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
GSH	Glutathiona reduzida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H&E	Hematoxilina e Eosina
HSD3B	3 β -Hidroxiesteróide desidrogenase
HSD17B	17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado
IDA	Ingestão diária aceitável
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IgG	Imunoglobulina G
ip	Intraperitoneal
IRβ	Receptor de insulina beta
IRS	Substrato do receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LNI	<i>Leucozonia nassa</i> impositada –contaminada com OTs
LNN	<i>Leucozonia nassa</i> normal – não contaminada com OTs
<i>L. nassa</i>	<i>Leucozonia nassa</i>
LOAEL	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
LOD	Nível de detecção
MBT	Monobutilestano
M-D	Metaestro-diestro
mLST8	Proteína 8 Sec13 mamífero letal
MMPs	Metaloproteinases de matriz

MPhT	Monofenilestanho
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC	Complexo mTOR
MYO	Miométrio
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NBT	<i>nitroblue tetrazolium chloride</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NORMAM	Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações
NPY	Neuropeptídeo Y
OD	Absorção ótica
Oo	Oócito intacto
OMI	Organização Marítima Internacional
OTs	Organoestânicos
P	Proestro
p-Akt	Akt fosforilada
p-ERK 1/2	ERK 1/2 fosforilada
p-mTOR	mTOR fosforilada
PDZ	Zona decídua avascular primária
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
P.p	Pré-pênis
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PR	Receptor de progesterona
PRAS40	Substrato de Akt rico em prolina, 40 kDa
PVC	Cloreto de polivinila
4E-BP1	Proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótico 4E 1
Raf	Quinase de fibrossarcoma rapidamente acelerado
RAPTOR	Proteína associada-regulatória da mTOR
Ras	GTPase descoberta no sarcoma de rato (<i>rat sarcoma</i>)
Rheb	Homólogo Ras enriquecido no cérebro
RXR	Receptor X retinóide
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecilsulfato de sódio
Sn	Estanho
SOP	Síndrome do Ovário Policístico

S6K	Proteína quinase S6 ribossômica
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogênica
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBS-T	Tampão tris-salina e tween
TBT	Tributilestanho
TCA	Ácido tricloroacético
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TPhT	Trifenilestanho
TSC	Complexo de esclerose tuberosa
TSI	Teste de sensibilidade insulínica
TTG	Teste de tolerância a glicose
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
V	Vulva
VD	Vaso deferente
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
ZB	Zona basal
ZL	Zona labiríntica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Compostos organoestânicos	23
1.1.1 <i>Propriedades químicas</i>	24
1.1.2 <i>Toxicidade em invertebrados marinhos</i>	25
1.1.3 <i>Regulamentações para o uso de OTs</i>	26
1.2 Transferência trófica dos OTs e a exposição de humanos	27
1.3 Toxicidade dos OTs em mamíferos roedores	29
1.4 Sistema endócrino reprodutivo feminino	31
1.4.1 <i>Eixo hipotálamo-hipófise-ovários</i>	31
1.4.2 <i>Ciclo reprodutivo de ratas</i>	31
1.4.3 <i>Esteroidogênese ovariana</i>	33
1.4.4 <i>Foliculogênese ovariana</i>	34
1.4.5 <i>Fertilidade e implantação embrionária</i>	36
1.5 Placenta: órgão endócrino temporário	38
1.5.1 <i>Crescimento fetal</i>	40
1.5.2 <i>Transporte de nutrientes placentários</i>	41
1.6 Estado energético materno: perfis lipídicos e glicêmicos	44
1.7 Toxicidade dos OTs nos sistemas reprodutivo feminino e placentário, estado energético materno e transferência de efeitos à prole	45
2 JUSTIFICATIVA	46
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4 MÉTODOS	48
4.1 Descrição do gastrópode	48
4.2 Coleta dos moluscos e análise do <i>Imposex</i>	49
4.3 Dosagem de Sn nos extratos	51
4.4 Animais e grupos experimentais	51
4.5 Avaliação do ciclo estral nas adultas (Set 1)	53
4.6 Protocolo de TSI e TTG nas adultas e grávidas (Set 1 e 2)	53
4.7 Avaliação dos níveis séricos hormonais e de Sn nas adultas (Set 1), dosagem de lipídios nas adultas e grávidas (Set 1 e 3), e de glicose e colesterol no sangue do cordão umbilical (Set 3)	54
4.8 Análise dos pesos corporal e dos órgãos (Set 1 e 3)	55

4.9 Análises histomorfométricas	55
4.9.1 Avaliação histológica dos ovários, útero e fígado das adultas (Set 1), da placenta e fígado das grávidas e dos fetos (Set 3).....	55
4.9.2 Avaliação da deposição de colágeno no ovário e útero das adultas (Set 1).....	56
4.9.3 Avaliação de mastócitos nos úteros das adultas (Set 1)	56
4.9.4 Avaliação da deposição de lipídios no fígado dos fetos (Set 3).....	56
4.10 Avaliação da atividade de MPO (Mieloperoxidase) – presença de neutrófilos – nos úteros das adultas (Set 1) e placenta (Set 3).....	56
4.11 Atividade de NAG (N-acetil-β-D-glicosaminidase) – presença de macrófagos – nos úteros das adultas (Set 1) e placenta (Set 3).....	57
4.12 Avaliação proteica, por western blot, dos ovários e útero (Set 1), placenta e fígado dos fetos (Set 3).....	57
4.13 Avaliação da fertilidade (Set 2).....	59
4.14 Avaliação dos fetos e das implantações embrionárias (Set 3).....	59
4.15 Avaliação de triglicerídeos e colesterol total na placenta e fígado dos fetos (Set 3).....	60
4.16 Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na placenta e fígado dos fetos (Set 3).....	61
4.17 Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na placenta e fígado dos fetos (Set 3).....	61
4.18 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Aumento dos níveis de Sn nos gastrópodes e no soro das ratas LNI	62
5.2 Ratas LNI apresentaram irregularidade no ciclo estral	62
5.3 OTs aumentaram os níveis séricos de estrogênio, progesterona e testosterona.....	64
5.4 OTs induziram atresia ovariana, aumento de folículos primário, atrésico, císticos e de corpo lúteo, e maior deposição de fibras colágenas nos ovários	65
5.5 OTs geraram o espessamento e pontos de pseudoestratificação no epitélio luminal, inflamação e deposição de colágeno nos úteros	66
5.6 OTs aumentaram a expressão do ERα no útero	68
5.7 OTs promoveram dislipidemia e o aumento da deposição de triglicerídeos e colesterol total no fígado das ratas grávidas.....	69
5.8 OTs reduziram a frequência de ninhadas.....	71
5.9 OTs reduziram o n° de implantações embrionárias e, assim, aumentaram a % de perdas pré-implantação	72

5.10	Caracterização placentária: OTs induziram aumento do peso, da deposição e transporte de glicose e lipídios, e de inflamação na placenta.....	73
5.11	OTs induziram maior expressão placentária do IR β , p-Akt e p-mTOR.....	75
5.12	Exposição materna pré-gestacional aos OTs gerou aumento no peso e comprimento corporal de fetos.....	76
5.13	Exposição materna pré-gestacional aos OTs promoveu inflamação e aumento de megacariócitos hepáticos.....	76
5.14	Exposição materna pré-gestacional aos OTs gerou deposição lipídica e estresse oxidativo no fígado dos fetos.....	78
6	DISCUSSÃO.....	80
6.1	Validação da contaminação dos moluscos com OTs e a biotransferência aos roedores.....	80
6.2	Morfofisiologia ovariana e uterina.....	81
6.3	Síndrome do Ovário Policístico (SOP).....	85
6.4	Estado energético das adultas e grávidas.....	86
6.5	Fertilidade e implantação embrionária.....	89
6.6	Placenta.....	92
6.7	Herança fetal.....	95
7	CONCLUSÃO.....	99
8	REFERÊNCIAS.....	100
9	ANEXOS.....	145
9.1	Artigo publicado vinculado à tese.....	145
9.2	Outras produções.....	146
9.3	Certificados da CEUA.....	158

1 INTRODUÇÃO

1.1 Compostos organoestânicos

Desde a antiguidade, o estanho (Sn) metálico tem sido importante para a humanidade. Devido à sua capacidade de endurecer o cobre, a liga de Sn-cobre (bronze) foi utilizada para produzir armas e utensílios (OMAE, 1989; RUDEL, 2003). No entanto, o primeiro estudo sobre os compostos orgânicos de Sn (OTs- organoestânicos; do inglês *organotins*) foi realizado por Edward Frankland, que em 1853 sintetizou o diodeto de dietilestanho e, em 1859, o tetraetilestanho (BLUNDEN; EVANS, 1990). Desde então, outras descobertas foram realizadas e atualmente são conhecidos mais de 800 OTs, sendo a maioria deles, de origem antropogênica (GUARD; COBERT; COLEMAN, 1981).

Após a primeira síntese, os OTs não tiveram muita notoriedade por quase 90 anos, devido à inexistência de aplicações comerciais. No entanto, em 1940 a indústria de plásticos iniciou a sua expansão, especialmente com a produção de cloreto de polivinila (PVC). Este polímero tornava-se instável sob a influência de luz e calor, resultando na descoloração e enfraquecimento do material, e a adição de OTs promovia uma poderosa ação estabilizante. A partir de então, os OTs foram introduzidos com este propósito nos Estados Unidos, no final dos anos 40, e na Europa, em meados dos anos 50, quando a produção mundial de OTs era inferior a 5000 toneladas/ano (BLUNDEN; EVANS, 1990; GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003; HOCH, 2001).

Paralelamente, as propriedades biocidas dos OTs, principalmente de espécies de OTs trissubstituídos como o tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPhT), foram descobertas na Holanda e estes compostos passaram a ser utilizados também como anti-fúngicos, algicidas, pesticidas, conservantes de madeira, repelentes de roedores e agentes anti-incrustantes em tintas usadas na pintura de cascos de navios, para evitar a colonização e o crescimento de uma grande diversidade de organismos (como algas, cracas, fungos, mexilhões e esponjas) em superfícies submersas (HOCH, 2001; LUDGATE, 1987).

Na década de 1980, os OTs chegaram a revestir 90% dos cascos dos navios em operação no mundo (FENT, 2003; FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007). Por causa de sua utilização, o intervalo entre docagens aumentou de 1 para cerca de 7 anos. Assim, os custos de manutenção com as embarcações diminuíram significativamente e o lucro das indústrias navais aumentou (HOCH, 2001; MENG; LIN;LIU, 2009). Em 1990, a produção de OTs era

estimada em cerca de 35.000 toneladas/ano, sendo que 20% da produção total anual de OTs correspondia a compostos com ação biocida (BENNETT, 1996). No início dos anos 2000, estimativas já apontavam para 50.000 toneladas/ano (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

1.1.1 Propriedades químicas

Os OTs apresentam a fórmula geral R_nSnX_{4-n} , onde R é um grupo alquila ou arila (dependendo do número desses grupos, os compostos são classificados em Monossustituídos, Dissustituídos, Trissustituídos ou Tetrassustituídos), X é uma espécie aniônica, como cloreto, óxido, hidróxido ou outro grupo funcional, e n varia de 1 a 4 (HOCH, 2001), como observado na Figura 1.

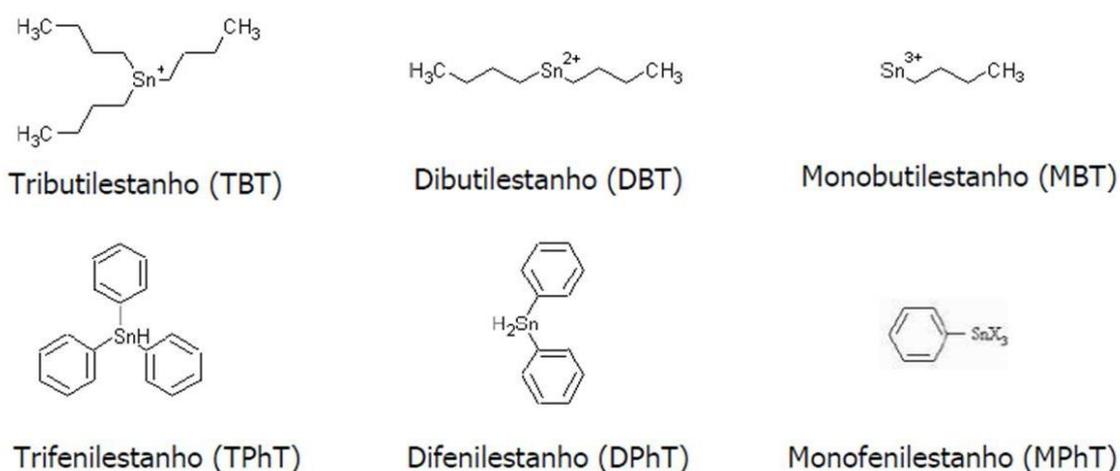


Figura 1: Fórmula estrutural química dos OTs mais descritos na literatura. OTs trissustituídos (TBT e TPhT), dissustituídos (dibutylestanho - DBT e difenilestanho - DPhT) e monossustituídos (monobutylestanho - MBT e monofenilestanho - MPhT). Adaptado de (SANTOS *et al.*, 2011).

Devido às cadeias orgânicas, os OTs são hidrofóbicos e este é, de fato, o principal parâmetro para a bioconcentração desses compostos (FENT, 1996). A ligação Sn-carbono é estável na presença da água, oxigênio atmosférico e calor (estável até 200°C), podendo ser quebrada através de radiação ultravioleta, ácidos fortes e agentes eletrofílicos. Além disso, o número dessas ligações tem um grande efeito sobre as propriedades dos OTs, já tendo sido proposto que a ação tóxica máxima ocorre nos OTs trissustituídos, principalmente, no TBT (HOCH, 2001).

1.1.2 Toxicidade em invertebrados marinhos

O primeiro registro dos efeitos nocivos do TBT foi obtido após observações na Baía de Arcachon, uma baía fechada na costa atlântica francesa com abundantes instalações de cultivo de ostras. A produção de ostras foi gravemente afetada na década de 1970 e início de 1980 devido a graves problemas de crescimento, que foram seguidos por uma completa falta de reprodução e o surgimento de anomalias de calcificação (ALZIEU, 2000).

Na mesma época, BLABER (1970) registrou o surgimento de pênis nas fêmeas do gastrópode *Nucella lapillus* coletado em Plymouth Sound, no Reino Unido. A gravidade dessa condição foi maior dentro dos portos, mas o agente causador não foi identificado. Um ano depois, SMITH (1971) também notou o aparecimento de pênis e ducto deferente em fêmeas *Nassarius obsoletus* nos Estados Unidos. Ele denominou o fenômeno de *imposex*, mas na época a causa ainda era desconhecida. Várias pesquisas foram conduzidas e com o trabalho de SMITH (1981A,B), a relação causal entre o *imposex* e o TBT foi finalmente estabelecida. Mais tarde, essa relação foi confirmada por Bryan e colaboradores por meio de uma série de experimentos de laboratório e de campo usando *N. lapillus* (BRYAN *et al.*, 1987).

O *imposex* é definido como o desenvolvimento sexual anormal e irreversível caracterizado pelo surgimento de órgãos sexuais masculinos em fêmeas de gastrópodes (FENT, 1996) e é considerado o melhor exemplo de perturbação endócrina na vida selvagem (MATTHIESSEN, 2013). Essa masculinização de gastrópodes é utilizada para o monitoramento da contaminação por TBT devido a facilidade na análise e quantificação (GARAVENTA *et al.*, 2006; GIBSON; WILSON, 2003; TERLIZZI *et al.*, 2004). Além disso, os gastrópodes caracterizam-se como excelentes bioindicadores da poluição pelo TBT, uma vez que possuem mecanismos limitados para metabolizar e excretar os OTs, e por isso, desenvolvem o *imposex* estando expostos a apenas alguns nanogramas de TBT por litro (ABIDLI *et al.*, 2012; ALZIEU *et al.*, 1991; BRYAN; GIBBS, 1991; BRYAN *et al.*, 1986; OBERDÖRSTER *et al.*, 1998).

Diversas hipóteses têm sido propostas para definir possíveis mecanismos pelos quais o TBT causa *imposex*. Entre elas, tem-se a de elevação da testosterona livre (SPOONER *et al.*, 1991), decorrente da inibição de enzimas, como o citocromo P450 aromatase-dependente, que converte testosterona em estradiol, ou o acil coenzima A:aciltransferase (ATAT), que é o responsável pela manutenção da homeostase da

testosterona a partir da transformação do hormônio livre em ésteres de ácidos graxos (GOODING; LEBLANC, 2001; MORCILLO; PORTE, 1998); a de ação neurotóxica do TBT, que causaria um aumento da secreção de neuro-hormônios que contribuem para a diferenciação sexual masculina em gastrópodes, como o neuropeptídeo APGWamida, um fator morfogênico do pênis (SANTOS *et al.*, 2006); e a de atuação do TBT como um agonista do receptor X retinóide (RXR), pelo qual poderia se ligar e ativar diretamente o RXR ou agir indiretamente através da inibição de ATAT (STENBERG *et al.*, 2010). Até o momento, nenhuma das especulações foi completamente comprovada. No entanto, já existe a confirmação da relação direta entre o *imposex* e o TBT, demonstrando que este é o agente químico indutor de tal distúrbio reprodutivo em invertebrados (BRYAN *et al.*, 1986).

Estudos mostram que o *imposex* afeta mais de 260 espécies de gastrópodes (STERNBERG *et al.*, 2010; TITLEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011) e é um fenômeno mundial, sendo relatado na Europa, América do Norte e do Sul, Ásia, África, Austrália, e mesmo em locais remotos como o Ártico e a Antártida (GIBSON; WILSON, 2003; HORIGUCHI, 2012; NEGRI; MARSHALL, 2009; SHI *et al.*, 2005; STRAND; GLAHDER; ASMUND, 2006; TALLMON, 2012).

1.1.3 Regulamentações para o uso de OTs

Com base nas pesquisas sobre a toxicidade dos OTs, regulamentos foram elaborados para evitar a continuidade da poluição ambiental provocada por estes biocidas. A primeira iniciativa restritiva foi adotada pela França em 1982, com a proibição do uso de TBT nas tintas aplicadas em pequenas embarcações (menores que 25 metros). Quatro anos depois, o Reino Unido proibiu a venda dessas tintas para pequenas embarcações e estruturas de aquicultura (ALZIEU, 1998). Restrições semelhantes foram adotadas por outros países, como EUA e Nova Zelândia em 1988, Austrália, Canadá e União Europeia em 1989, e Japão em 1990 (ALZIEU, 1998; BLANCK; DAHL, 1998; EVANS; LEKSONO; MCKINNEL, 1995; MINCHIN *et al.*, 1995; REES; BRADY; FABRIS, 2001).

No entanto, vários relatórios descreviam que os níveis de *imposex* e TBT em torno dos portos não estavam diminuindo (BAILEY; DAVIES 1989; MINCHIN *et al.*, 1995; MORGAN; MURPHY; LYONS, 1998; SMITH, 1996) e que a poluição do TBT não se restringia a áreas portuárias, atingindo inclusive populações do oceano aberto e de áreas de alto mar (BARREIRO *et al.*, 2001; MENSINK *et al.*, 1996; MICHEL *et al.*, 2001). Com isso, a Organização Marítima Internacional (OMI) adotou, em 2001, uma proibição total do uso de

tintas anti-incrustantes à base de TBT, durante a "Convenção Internacional sobre o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Nocivos em Navios" (Convenção AFS), e tal regulamentação passaria a valer a partir de 2003. Esta convenção, no entanto, só poderia entrar em vigor um ano depois que 25 estados, representando 25% da tonelagem mundial de navios mercantes, a ratificassem. Em 17 de setembro de 2008, a convenção AFS entrou em vigor e, a partir dessa data, os OTs foram banidos das formulações de tintas anti-incrustantes. Contudo, a produção e aplicação dessas tintas à base de TBT ainda é possível em alguns países que não são membros da OMI ou que possuem fiscalização inadequada (YI *et al.*, 2012).

No Brasil, a Marinha suspendeu o uso de TBT em seus navios em 2003, e promulgou o regulamento NORMAM 23 (Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações), em 2007, para restringir o uso de OTs como um sistema anti-incrustante (DPC, 2007). Apesar da restrição, os níveis de OTs em alguns compartimentos ambientais ainda não estão definidos na legislação brasileira. A exceção é a Resolução CONAMA 357 (Conselho Nacional do Meio Ambiente), de 2005, que prescreve diretrizes para os níveis de TBT nas amostras de água. No entanto, devido ao seu comportamento hidrofóbico, os OTs são geralmente associados a sedimentos, partículas suspensas e organismos no ambiente aquático. Portanto, as medições feitas apenas na coluna d'água podem produzir concentrações subestimadas de OTs no ambiente e, por isso, estes compostos continuam sendo um risco para toda a biota (CONAMA, 2005).

Além de ainda ocorrer a produção e utilização das tintas contendo TBT, os prejuízos relacionados ao uso desse biocida ainda são evidentes também devido a sua deposição nos sedimentos e lenta degradação no ecossistema aquático. Em ambientes de baixa salinidade, o tempo de meia-vida do TBT nos sedimentos (que varia entre 6 semanas e 5 meses) pode aumentar, particularmente sob condições anaeróbicas, onde a persistência estimada pode atingir dezenas de décadas (ANTIZAR-LADISLAO, 2008), como verificado por SCRIMSHAW e colaboradores (2005), que detectaram OTs em sedimentos profundos datados de 30 anos.

1.2 Transferência trófica dos OTs e a exposição de humanos

Após a introdução no meio aquático, os OTs podem entrar na cadeia alimentar, atingindo assim mamíferos e, inclusive, os seres humanos. Associado a essa biotransferência, os OTs também sofrem um processo de biomagnificação, isto é, a

concentração de OTs aumenta ao longo da cadeia alimentar, com maiores níveis nos predadores de topo do que nos animais no fundo da cadeia trófica (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003). STRAND e JACOBSEN (2005) analisaram as concentrações de OTs em espécies de algas marinhas, invertebrados, peixes, aves e mamíferos marinhos, obtidos de águas costeiras dinamarquesas, e confirmaram a bioacumulação em diferentes níveis tróficos, tendo sido detectado níveis de OTs mais elevados em linguado (peixe), patos e botos. Em humanos, estudos epidemiológicos avaliam os possíveis riscos à saúde decorrentes da exposição aos OTs através do consumo de mariscos contaminados, que é a via mais importante de exposição e acumulação destes agentes (RANTAKOKKO *et al.*, 2006; TOYODA *et al.*, 2000). Outras fontes de exposição incluem ingestão de água oriunda de tubulação de PVC (FORSYTH; JAY, 1997; FRISTACHI *et al.*, 2009;) e de outros alimentos, como vegetais, frutas e carne (QUNFANG *et al.*, 2004; RANTAKOKKO *et al.*, 2006; SCHER, 2006); exposição direta e/ou com a poeira proveniente da degradação de vários produtos de consumo que contém OTs, como roupas, calçados, implantes mamários e itens de casa, como papel de parede, cortina e travesseiro (FROMME *et al.*, 2005; KANNAN *et al.*, 2010; SANTILLO; JOHNSTON; BRIGDEN, 2001; SCHER 2006; SOUSA *et al.*, 2014); e a exposição de profissionais que realizam a manutenção de embarcações revestidas à base de TBT, para os quais os principais problemas à saúde registrados são inflamação crônica da pele, problemas respiratórios, dores de cabeça e no estômago, lacrimação e resfriados frequentes (REID, 1986).

A detecção de OTs em humanos foi registrada pela primeira vez por KANNAN e FALANDYSZ (1997) durante uma pesquisa de monitoramento realizada na costa polonesa do mar Báltico, em amostras de fígado, coletadas por necrópsia. Posteriormente, outros estudos corroboraram tal descoberta: KANNAN; SENTHILKUMAR e GIESY (1999) demonstraram que 70% das amostras de sangue proveniente de adultos na região central de Michigan, EUA, apresentavam concentrações próximas de 85 ng.mL^{-1} de TBT; NIELSEN e STRAND (2002) verificaram níveis de 0,3–4,7 e 0,8-28,3 ng.g^{-1} de MBT e DBT, respectivamente, no fígado de dinamarqueses; e RANTAKOKKO e colaboradores (2008) observaram, em amostras de sangue de pescadores finlandeses e suas famílias, níveis relativamente baixos para a maioria dos OTs, no entanto, foi possível notar que o consumo de peixe estava associado aos níveis de TPhT.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA-USA, 1997), a ingestão diária aceitável (IDA), que é a dose de exposição ao TBT considerada segura ou tolerável para humanos, é de 300 ng/kg por dia. Para chegar a essa dose foi feita a avaliação da

toxicidade do composto e a caracterização da exposição a qual o indivíduo é submetido. Dessa forma, estudos de dose-resposta são comumente realizados para se conhecer os parâmetros de NOAEL (do inglês *No Observed Adverse Effect Level*) e LOAEL (do inglês *Lowest Observed Adverse Effect Level*) de cada composto químico, ou seja, as doses de referências máxima e mínima, respectivamente, que podem ser administradas sem que haja efeitos adversos no indivíduo exposto ao contaminante. Países europeus, como Portugal e Itália, e a Coréia mostraram exposição ao TBT excedente à IDA (KEITHLY; CARDWELL; HENDERSON, 1999). No Brasil, estudos de biomonitoramento costeiro têm mostrado altos níveis de OTs em várias espécies de gastrópodes, como *Stramonita haemastoma* (Fortaleza, Ceará; FERNANDEZ *et al.*, 2002), *Leucozonia nassa* (Vitória, Espírito Santo; COSTA *et al.*, 2014) e *Thais deltoidea* (Vitória, Espírito Santo; COSTA *et al.*, 2008A). Além disso, estimativas de possíveis riscos à saúde de humanos em decorrência da ingestão de frutos do mar contaminados com OTs foram feitas baseando-se na frequência, na duração e na taxa de ingestão de mariscos, assim como na concentração dos OTs nos moluscos, na IDA e no peso corporal dos humanos, e foram encontrados valores próximos ao limite de risco (FERNANDEZ *et al.*, 2005).

1.3 Toxicidade dos OTs em mamíferos roedores

Além dos prejuízos reprodutivos detectados inicialmente nos organismos marinhos, anormalidades morfofuncionais sistêmicas também foram evidenciadas em diferentes espécies de mamíferos roedores (GROTE *et al.*, 2004; KEITHLY; CARDWELL; HENDERSON, 1999). Com todos estes achados negativos em diversos animais, os OTs foram incluídos na classificação de desreguladores endócrinos. A EPA-USA define como desregulador endócrino “um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamento” e desta forma, o desregulador endócrino tem o potencial de alterar o funcionamento do sistema endócrino como um todo (COLBORN; VOM SAAL; SOTO, 1993; EPA-USA, 1997). Em mamíferos, os OTs induzem alterações morfológicas e funcionais em diversos tecidos envolvidos no controle do metabolismo endócrino, como hipotálamo, hipófise, pâncreas, gônadas, adrenal e tecido adiposo (SANTOS-SILVA *et al.*, 2017; VOS *et al.*, 2000; WADA *et al.*, 1982).

Distúrbios endócrinos e metabólicos causados por OTs podem ocorrer por mecanismos centrais e periféricos (BRTKO; DVORAK, 2015; GRUN, 2014). Há evidências de que alterações morfofuncionais nos tecidos adiposos e no sistema nervoso central podem contribuir para os efeitos deletérios dos OTs relacionados à obesidade e às complicações da síndrome metabólica (KANAYAMA *et al.*, 2005; PENZA *et al.*, 2011; YANIK *et al.*, 2011). As vias centrais envolvem neurotoxicidade, com aumento de espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo associado à redução de reservas antioxidantes no sistema nervoso exposto aos OTs (MITRA *et al.*, 2013), e também mudanças no controle neuro-hormonal do metabolismo de alimentos, com aumento na expressão de neuropeptídeo Y (NPY) no cérebro e redução nos níveis circulantes de leptina, promovendo aumento da ingestão de alimentos e à diminuição do gasto energético (BO *et al.*, 2016; HE; ZHANG; CHEN, 2014; ROBERTSON; LEINNINGER; MYERS, 2008). Em relação aos mecanismos periféricos envolvidos no efeito obesogênico, está bem descrita a associação entre OTs e adipogênese, através da sinalização entre o RXR e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ) (GRUN *et al.*, 2006; KIRCHNER *et al.*, 2010; LE *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se que os OTs afetam as funções exócrina (HARA; YOSHIZUKA; FUJIMOTO, 1994) e endócrina do pâncreas (CHEN *et al.*, 2017; OGINO *et al.*, 1996; ZUO *et al.*, 2014). Assim, propõe-se que o comprometimento da homeostase da glicose ocorra provavelmente devido à capacidade dos OTs de reduzir a secreção e/ou sinalização da insulina, por inibição da proliferação de células β e aumento da apoptose, associadas ao estresse oxidativo local (BERTULOSO *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017; OGINO *et al.*, 1996; ZUO *et al.*, 2014).

OTs também exercem sua toxicidade no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e geram inflamação na zona fasciculada da adrenal, prejudicando o funcionamento das enzimas participantes na síntese dos hormônios corticóides, elevando, assim, os níveis de cortisol (MERLO *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que os impactos no controle neuroendócrino causados por OTs também interferem na função reprodutiva, levando a alterações morfológicas nos ovários e testículos (GROTE *et al.*, 2004; OGATA *et al.*, 2001), esteroidogênese anormal (SI *et al.*, 2015), irregularidade na ciclagem estral (PODRATZ *et al.*, 2012; SENA *et al.*, 2017) e comprometimento da fertilidade (EMA *et al.*, 1997; ITAMI *et al.*, 1990). Esses danos reprodutivos nas fêmeas podem ocorrer simultaneamente e, assim, caracterizar síndromes complexas, como a Síndrome do Ovário Policístico (SOP), cujo diagnóstico baseia-se na detecção de hiperandrogenismo, ciclos reprodutivos anormais e ovulação irregular (AZZIZ, 2006).

1.4 Sistema endócrino reprodutivo feminino

1.4.1 Eixo hipotálamo-hipófise-ovários

Entre as glândulas que compõem o sistema endócrino, o eixo hipotálamo-hipófise-ovários é que controla diretamente a reprodução e a fertilidade de mulheres ou animais fêmeas. Esta regulação envolve a produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo núcleo arqueado do hipotálamo, que através do sistema porta hipotalâmico-hipofisário atinge a hipófise anterior e regula a síntese e liberação das gonadotrofinas: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Estes hormônios atuam nos ovários, ajustando o processo de maturação dos gametas (oogênese) e a produção dos hormônios sexuais (andrógenos, estrógenos e progestinas). Eles também são responsáveis pela manutenção da estrutura glandular. O controle do eixo através do *feedback* negativo possibilita a modulação das etapas de síntese e liberação destes hormônios e, conseqüentemente, suas ações locais e sistêmicas (BULUN; ADASHI, 2010).

1.4.2 Ciclo reprodutivo de ratas

As ratas são um importante modelo experimental para estudos reprodutivos de mamíferos, uma vez que apresentam ovulação espontânea, evoluem com perfil de variações de gonadotrofinas e esteroides gonadais semelhantes ao da mulher, apresentam um ciclo estral de curta duração e anatomia que facilita os procedimentos experimentais (FREEMAN, 1994).

O ciclo reprodutivo em roedores é chamado de ciclo estral e tem duração média de quatro ou cinco dias. É caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal. O proestro caracteriza-se pela predominância de células epiteliais nucleadas; o estro é indicado pela presença de células epiteliais queratinizadas abundantes; o metaestro apresenta proporções equivalentes de leucócitos, células epiteliais nucleadas e queratinizadas, enquanto o diestro é caracterizado pela predominância de leucócitos (LONG; EVANS, 1922; MANDL, 1951), como observado na Figura 2.

O proestro dura de 12 a 14 horas, associado à maturação dos folículos e precede o estro (25 a 27 horas), único período em que a fêmea é receptiva ao macho. Se não há concepção, após o estro há um período de recuperação denominado metaestro, cuja

duração é de 24 a 48 horas, seguido pelo diestro, que dura cerca de 24 horas, quando a secreção de hormônios ovarianos é reiniciada para o próximo ciclo (FRANCI; ANSELMO-FRANCI, 2012).

Durante o ciclo estral, o LH e o FSH permanecem baixos e aumentam na tarde do proestro. O pico plasmático de LH é fundamental para o processo ovulatório, e a concentração de FSH apresenta um pico secundário no estro, que pode estar relacionado com o recrutamento de folículos para o próximo ciclo (SZAWKA; ANSELMO-FRANCI, 2004). As concentrações de estradiol começam a aumentar no metaestro, alcançando concentrações de pico durante o proestro e retornando para a linha de base no estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro e diestro, diminuindo logo após para depois alcançar seu maior pico no fim do proestro (MILLER; TAKAHASHI, 2014), como verificado na Figura 2.

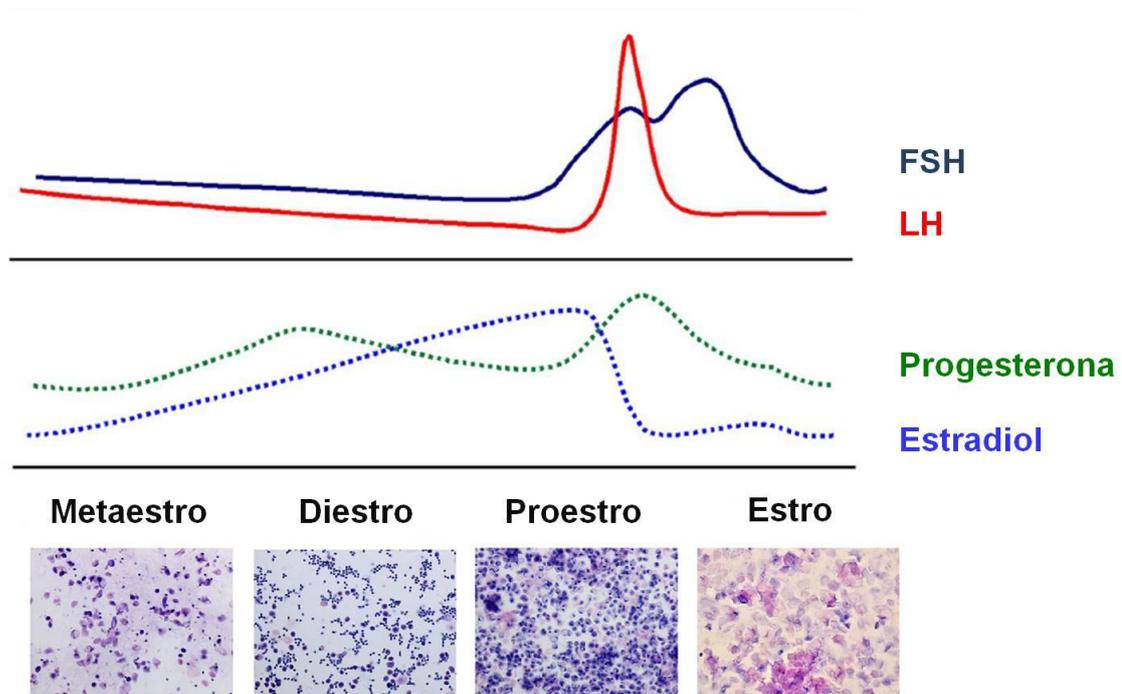


Figura 2: Variações hormonais e esfregaço vaginal das quatro fases do ciclo estral. Representação das flutuações séricas de FSH, LH, progesterona e estradiol ao longo do ciclo reprodutivo de ratas; e imagens representativas do esfregaço vaginal nas fases de proestro, estro, metaestro e diestro (Coloração Hematoxilina e Eosina - H&E). Adaptado de (LING *et al.*, 2017; MILLER; TAKAHASHI, 2014).

1.4.3 Esteroidogênese ovariana

A síntese de hormônios nos ovários ocorre, predominantemente, nas camadas de células da teca e da granulosa dos folículos. A porção interna da teca é altamente vascularizada, e após estimulação pelo LH, converte colesterol em androgênios. Estes se difundem para a camada da granulosa adjacente, onde serão convertidos em estrogênio, como verificado na Figura 3. Parte do estrogênio permanece no folículo, para a formação do antro ou para a estimulação da proliferação da granulosa, e outra parte do estrogênio é secretada na corrente sanguínea (BULUN; ADASHI, 2010).

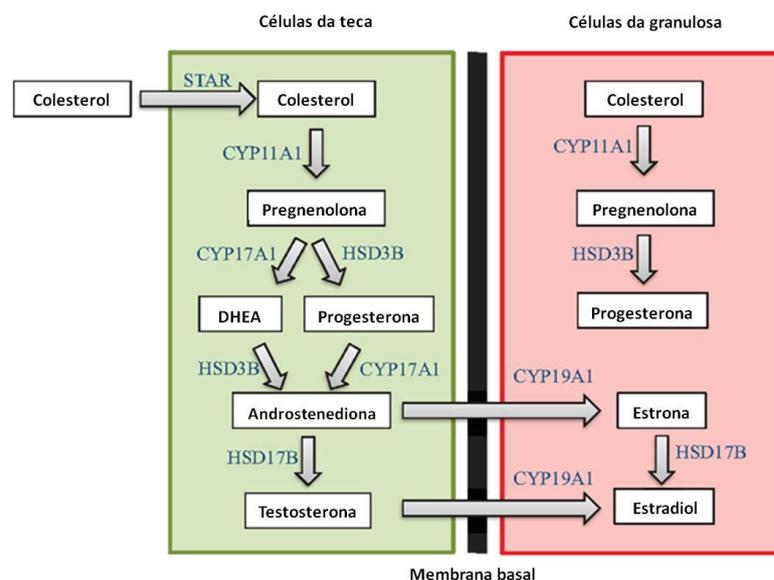


Figura 3: Esteroidogênese ovariana. O colesterol é transportado para a célula da teca pela StAR, onde se encontra a CYP11A1, que participa da conversão do colesterol em pregnenolona. Esta, por meio da CYP17A1 e HSD3B, será convertida em DHEA e progesterona, respectivamente, e, em seguida, em androstenediona, que seguirá duas vias: migrará para a célula da granulosa e será convertida em estrona por meio da CYP19A1 (e a estrona em estradiol, pela HSD17B) ou será convertida em testosterona pela HSD17B. A testosterona migrará para a célula da granulosa por meio da CYP19A1, que também participará da conversão em estradiol. StAR: Proteína reguladora aguda esteroidogênica; CYP11A1: colesterol desmolase; CYP17A1: 17 α -mono-oxigenase de esteroide ou 17 α -hidroxilase; HSD3B: 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase; HSD17B: 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase; CYP19A1: aromatase. Adaptado de (HANNON; FLAWS, 2015).

A regulação do estrogênio é feita via genômica através de receptores de estrogênio α (ER- α) e β (ER- β), e não-genômica, por meio da ligação ao receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) (GUSTAFSSON, 2003; KUIPER *et al.*, 1996; REVANKAR *et al.*, 2005). Já a progesterona tem ação modulada pelo receptor de progesterona (PR) (LEMALE *et al.*,

2008). GPER é uma proteína expressa na superfície celular. Com a ligação de agonistas, ocorre a ativação da proteína G, seguida de uma cascata de reação de proteínas reguladoras e efetoras (FILARDO *et al.*, 2002; PROSSNITZ, 2004; RAVANKAR *et al.*, 2005). Já os receptores nucleares, recebem a ligação de hormônios específicos, sofrem rearranjos conformacionais, levando à formação de homo ou heterodímeros. Quando em atividade, interagem diretamente com regiões específicas do material genético (elementos responsivos do estrogênio ou da progesterona), levando a um estímulo positivo e/ou negativo na expressão gênica de sua célula-alvo (LEMALE *et al.*, 2008).

1.4.4 Foliculogênese ovariana

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular. Os tipos de folículos ovarianos podem ser classificados em primordial, primário, pré-antral, antral e pré-ovulatório, além do corpo lúteo (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). O folículo primordial é constituído por um oócito imaturo, circundado por uma simples camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (HUTT; MCLAUGHLIN; HOLLAND, 2006). Quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico, o folículo é classificado como primário. A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas dessas células ao redor do oócito, formando o folículo pré-antral. Com a intensa proliferação das células da granulosa, uma área preenchida por fluido folicular é identificada na camada granulosa e, a partir de então, os folículos passam a ser classificados como antrais. A partir desse estágio, o diâmetro folicular aumenta acentuadamente, devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento da cavidade antral (folículo pré-ovulatório), como verificado na Figura 4. Após a ovulação, o remanescente do folículo se transforma em uma glândula endócrina, o corpo lúteo, que secreta quantidades consideráveis de progesterona e estradiol (PARROTT; SKINNER, 2000).

O desenvolvimento folicular nas fêmeas de roedores é muito semelhante ao de humanas. Uma diferença ocorre na formação dos folículos primordiais. Nas mulheres, estes folículos estão presentes desde a vigésima semana de vida fetal, enquanto nas fêmeas de roedores, formam-se nos primeiros três dias de vida após o nascimento. Além disso, em relação ao recrutamento e seleção do folículo antral, múltiplos folículos tornam-se dominantes a cada ciclo estral em roedores, porém na mulher, normalmente, somente um torna-se dominante para ovular (HIRSHFIELD, 1991).

O desenvolvimento dos folículos ovarianos é dividido nas fases folicular e lútea. Na fase folicular, o FSH atua nas células da granulosa promovendo seu crescimento. Posteriormente, os níveis de LH sobem, enquanto a secreção ovariana de estradiol se inicia. A elevação do nível sérico de estradiol é acompanhada por uma diminuição de FSH e induz a liberação do pico pré-ovulatório de LH, que promove a maturação do oócito e a consequente ruptura folicular. O pico pré-ovulatório de estradiol está relacionado com a rápida maturação folicular, refletindo no aumento da atividade funcional do folículo maduro, destinado a ovular (MAGIAKOU *et al.*, 1997). Na fase lútea, as células foliculares estão luteinizadas - sofrem hipertrofia, têm sua capacidade de síntese hormonal aumentada, apresentam aumento de grânulos lipídicos - e o folículo pós-ovulatório se torna cada vez mais vascularizado, transformando-se no corpo lúteo. O LH é necessário para a sobrevivência e manutenção das funções normais do corpo lúteo durante o ciclo reprodutivo. Há um discreto aumento no nível de estradiol. A característica mais importante desse período é o aumento acentuado da progesterona secretada pelo corpo lúteo, que ocasionará o declínio de LH e FSH durante a maior parte da fase lútea. Porém, o FSH começa a elevar-se no final da fase lútea para iniciar o crescimento folicular do ciclo seguinte (FILICORI *et al.*, 1986).

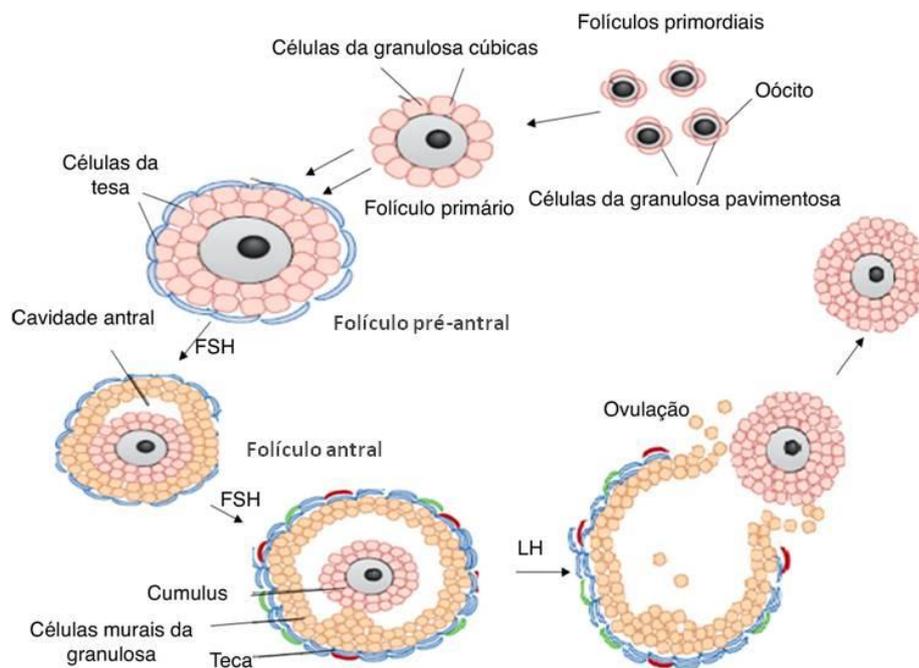


Figura 4: Imagem ilustrativa da organização e estrutura dos folículos ovarianos. Nota-se a seqüência evolutiva, desde os folículos primordiais até a formação da cavidade antral e ovulação. Adaptado de (GUERREIRO *et al.*, 2015).

1.4.5 Fertilidade e implantação embrionária

A fertilidade de animais fêmeas depende do desenvolvimento adequado das gônadas, da maturação do oócito, da proliferação e diferenciação das células da granulosa e da interação entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos que coordenam as alterações cíclicas do ovário durante a foliculogênese (ELVIN; MATZUK, 1998).

A implantação embrionária bem-sucedida requer a sincronização entre a ativação do blastocisto, que passa a expressar muitas microvilosidades na superfície e acúmulo de grânulos de glicogênio no citoplasma, associada ao estado receptivo no endométrio uterino, envolvendo alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias e fatores imunossupressores que regulam a transformação endometrial propícia à sobrevivência e crescimento embrionário (DEY *et al.*, 2004; WANG; DEY, 2006). Esses dois eventos fundamentais para a implantação são precisamente regulados pelos hormônios maternos, em particular, o estrogênio e a progesterona (CONNELLY *et al.*, 2002), como observado na Figura 5. A secreção de estrogênio é alta anteriormente ao surto do LH. Em seguida, a progesterona aumenta a partir do final do proestro. Se o acasalamento for bem sucedido, o corpo lúteo recém-formado, estimulado pelo comportamento de acasalamento, secretará progesterona a partir do 3º dia. No dia 4, uma pequena onda de estrogênio coopera com a progesterona para induzir a receptividade uterina. O implante de blastocisto ocorre à meia-noite do dia 4 (ZHANG *et al.*, 2013A).

O *crosstalk* entre o blastocisto e o útero só pode ocorrer durante um breve período chamado de "janela de implantação" (MA *et al.*, 2003; YOSHINAGA, 1980). Em roedores, esse período é limitado ao 4º dia gestacional (DG) (WANG; DEY, 2006). O útero não pode iniciar a implantação antes desse período (dias 1-3). Imediatamente após o estado receptivo, o útero entra espontaneamente em uma fase refratária (dia 5 em diante), onde o ambiente uterino é hostil à sobrevivência do blastocisto (CARSON *et al.*, 2000; YOSHINAGA, 1988). Em resposta à implantação, ocorre a diferenciação dos fibroblastos do estroma uterino em células decíduais, processo conhecido como decidualização, para acomodar o crescimento embrionário e a invasão, e altos níveis de progesterona são necessários nesta e nas etapas seguintes de placentação e conclusão da gestação (LIM; WANG, 2010), como verificado na Figura 5.

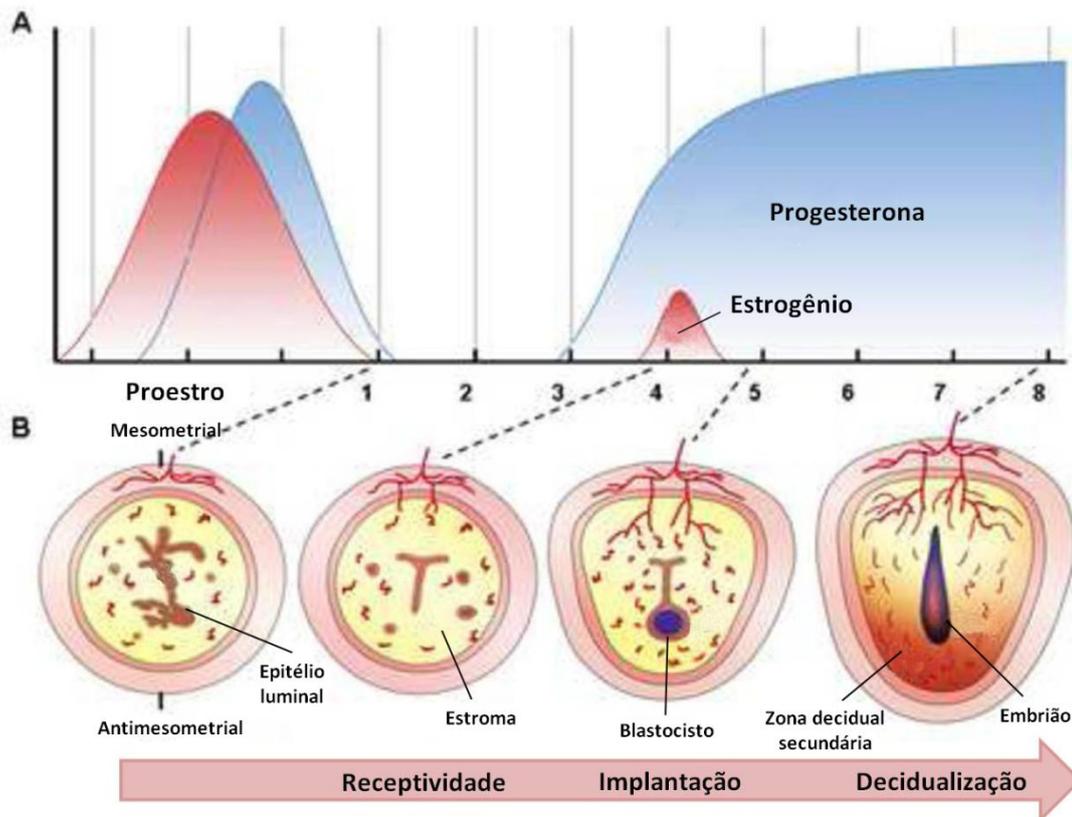


Figura 5: Controle hormonal e adaptação uterina para a implantação de embriões em roedores. (A) Padrões de hormônios esteroides ilustrados durante a fase de proestro, a receptividade uterina e o início de gravidez. Secreção de estrogênio (curva vermelha) e de progesterona (curva azul). (B) Diagramas mostrando secções transversais do útero pré-implantação (Dia 1, Dia 4) e locais de implantação (dia 5, dia 8). No dia 1, o epitélio luminal do útero não receptivo é altamente ramificado. No dia 4, o útero é receptivo com o epitélio luminal que se fecha ao redor de um blastocisto implantado. No dia 5, o trofocotoderma mural do blastocisto se liga ao epitélio luminal antimesometrial. As células estromais subjacentes ao embrião invasor proliferam e se diferenciam para formar uma zona decídua avascular primária (PDZ) na tarde do dia 5. As células estromais próximas à PDZ continuam a proliferação e diferenciação para formar uma zona decidual secundária bem vascularizada pelo dia 8. Adaptado de (ZHANG *et al.*, 2013A).

As evidências moleculares e genéticas indicam que a integração entre os hormônios ovarianos e as moléculas de sinalização produzidas localmente, incluindo citocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição, mediadores lipídicos e genes morfogênicos, promovem o complexo processo de implantação (DEY *et al.*, 2004). A decídua induzida localmente fornece um *feedback* positivo para apoiar a sobrevivência do embrião, e está envolvida na troca de gases, nutrientes, catabólitos, secreção de hormônios, fatores de

crescimento e citocinas que ajudarão a manter a gestação. Além disso, a decídua funciona como uma barreira contra as respostas imunológicas maternas ao embrião, e por ser um tecido transitente que se mantém até a instalação funcional da placenta, irá regredir em decídua basal e capsular, funcionando como uma barreira seletiva que protege o embrião (LIM; WANG, 2010), conforme Figura 6.

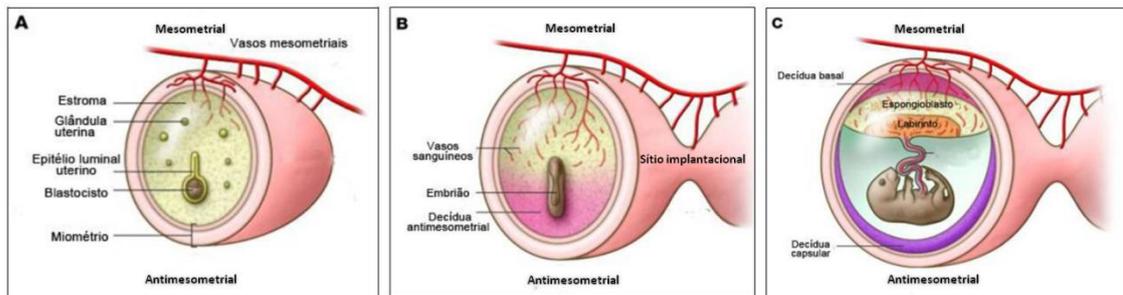


Figura 6: Decidualização e placentação em roedores. (A) No 4º DG, o blastocisto está em processo de implantação, aderido ao epitélio uterino. No lado antimesometrial do estroma inicia-se a resposta decidual. (B) No 7º DG, o embrião é maior e o cone ectoplacentário vai em direção mesometrial, rica em vasos sanguíneos. Nesta fase, a diferenciação decidual atinge quase todo o sítio implantacional. (C) No 13º DG, a placenta já está desenvolvida e a decídua aparece contida apenas por uma faixa de células em volta da placenta (decídua basal) e do embrião (decídua capsular). DG: dia gestacional. Adaptado de (LIM; WANG, 2010).

1.5 Placenta: órgão endócrino temporário

A placenta é um órgão endócrino temporário que atua como a interface entre a mãe e os embriões/fetos em desenvolvimento (JAYABALAN *et al.*, 2017). Desempenha várias funções ao longo da gestação, como a de fornecer nutrientes para o feto, permitir a troca de gases (oxigênio / gás carbônico), remover produtos residuais durante o desenvolvimento embrionário, mediar a tolerância imunológica materna e produzir hormônios metabolicamente importantes (BAUER *et al.*, 1998). Em roedores, já foi verificada a produção placentária de leptina (PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995) e grelina (TSCHOP; SMILEY; HEIMAN, 2000), hormônios que suprimem e estimulam o apetite, respectivamente, e também regulam outros processos metabólicos; GHRH, hormônio liberador de GH (hormônio do crescimento) (BAIRD *et al.*, 1985); lactogênios placentários (LINZER; FISHER, 1999), que atuam através do receptor de prolactina e podem mediar várias adaptações maternas que são atribuídas à prolactina, como desenvolvimento mamário e lactogênese

(GOFFIN *et al.*, 2002); e em estudos *in vitro* foi observada a produção e metabolização de androgênios (CHAN; LEATHERN, 1977; REMBIESA; MARCHUT; WARCHOL, 1972).

A placenta de roedores é classificada como hemotricorial, pois apresenta três camadas trofoblásticas adjuntas ao endotélio do capilar fetal separando os sistemas sanguíneos materno e fetal, e também como discóide, caracterizada por um único disco e a interação é confinada a uma área aproximadamente circular (CARTER, 2007; FURUKAWA *et al.*, 2011). Histologicamente, a placenta é composta pelas glândulas metriais, a decídua, a zona basal e a zona de labirinto (DAVIES; GLASSER, 1968; FURUKAWA *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2012), como observado na Figura 7. As glândulas metriais localizam-se no triângulo mesometrial do útero grávido desde o início da gestação e está totalmente desenvolvida entre o 10^o-12^o DG, levando à posterior regressão (FURUKAWA *et al.*, 2013; PEEL, 1989). São compostas por células estromais decidualizadas, células natural *killer* uterinas, artérias espinhais, trofoblastos originários de células de glicogênio e fibroblastos (CARTER *et al.*, 2006; VERCRUYSSSE *et al.*, 2006). A decídua é constituída pelas células deciduais mesometriais e desempenha um papel essencial no desenvolvimento da interface decidual-placentária vascularizada. A zona basal é composta por três tipos de células diferenciadas: espongiotrofoblastos, células gigantes trofoblásticas, e células de glicogênio. Os espongiotrofoblastos estão presentes imediatamente acima da camada de células gigantes trofoblásticas, localizada na interface placentária materno-fetal e que contém grande quantidade de organelas. As células de glicogênio formam múltiplas pequenas massas celulares e se desenvolvem até o 10^o-12^o DG, e, em seguida, a maioria delas desaparece (FURUKAWA *et al.*, 2013; PEEL, 1989). Na zona do labirinto, existem três camadas de trofoblastos, separando os espaços de sangue materno dos vasos sanguíneos fetais (ENDERS; BLANKENSHIP, 1999; TAKATA; FUJIKURA; SHIN, 1997). O trofotoderma externo, que entra em contato direto com o sangue materno, é chamado de citotrofoblasto com uma superfície microvilosa e é a maior fonte de hormônios luteotróficos e lactogênicos, além de promover a ativação das células natural *killer* uterinas. Sob este trofotoderma, existem duas camadas de sinciciotrofoblastos, onde há a expressão de proteínas transportadoras de nutrientes que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do feto (FURUKAWA *et al.*, 2013; FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014; PEEL, 1989).

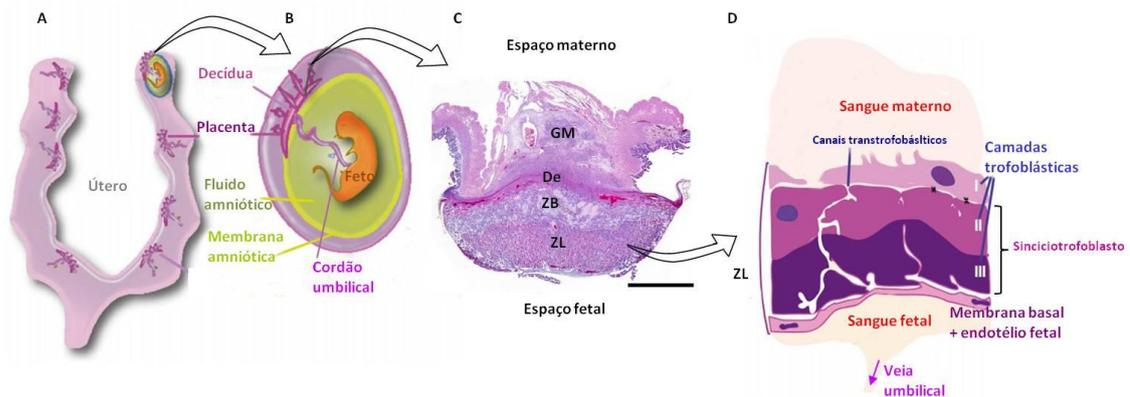


Figura 7: Representação esquemática e histológica da placenta, suas camadas e estruturas circundantes ao sítio de desenvolvimento fetal. (A) Ilustração do útero grávido, contendo várias placentas. (B) Membrana amniótica envolvendo o feto individual e tecidos adjacentes (decídua e cordão umbilical) (C) Seção histológica de baixa magnificação da placenta, possibilitando a distinção das suas camadas (coloração: H&E; escala: 2 mm). (D) Imagem ilustrativa da zona de labirinto, formada por três camadas trofoblásticas (placenta hemotricorial – citotrofoblasto e duas camadas de sinciotrofoblasto), separando o sangue materno do sangue fetal. De: decídua; GM: glândulas metriais; ZB: zona basal; ZL: zona labiríntica. Adaptado de (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014; SEMMLER-BEHNKE *et al.*, 2014).

1.5.1 Crescimento fetal

O crescimento fetal está diretamente relacionado à disponibilidade de nutrientes maternos e à capacidade da placenta de transportar esses nutrientes (glicose, aminoácidos e lipídios) da circulação materna para o feto (JANSSON; ILLSLEY, 1993). A glicose é o substrato energético primário necessário para o crescimento do feto e da placenta. A gliconeogênese fetal é mínima e o feto é quase inteiramente dependente da glicose da circulação materna. O transporte placentário de glicose ocorre por difusão facilitada ao longo de gradiente de concentração através de membros da família de transportadores de glicose (GLUT) (BAUMANN; DEBORDE; ILLSLEY, 2002). Os aminoácidos desempenham um papel crítico no desenvolvimento do tecido fetal e suas concentrações plasmáticas, geralmente, são mais altas na circulação fetal do que na materna (CETIN *et al.*, 1992). Os dois sistemas de transporte de aminoácidos na placenta são o Sistema A, que é dependente de sódio e facilita o transporte de pequenos aminoácidos neutros (JANSSON, 2001), e o Sistema L, que é independente de sódio e transporta grandes aminoácidos neutros (VERREY; SYSTEM, 2003). Já os lipídios são encontrados na circulação materna principalmente como triglicerídeos, fosfolípidos e ésteres de colesterol. Os triglicerídeos não podem atravessar o sinciotrofoblasto e são hidrolisados em ácidos graxos por lipases de triglicerídeos

placentários (KING, 2006). Os ácidos graxos são então disponíveis para absorção na placenta através de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP; nomenclatura atualizada e unificada para ACSVL: Acil-CoA sintetase da família de cadeia muito longa) (LARQUE *et al.*, 2006; MIHALIK *et al.*, 2002; STEINBERG *et al.*, 2000; WATKINS *et al.*, 2007) e participam do desenvolvimento do cérebro e acúmulo de gordura. O colesterol é um componente essencial das membranas celulares e um precursor para os hormônios esteróides. O feto pode sintetizar o colesterol, mas a placenta também transporta o colesterol da circulação materna para o feto, através de lipoproteínas transportadoras de colesterol, como as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (HERRERA, 2002; WOOLLETT, 2011).

1.5.2 Transporte de nutrientes placentários

O transporte de nutrientes placentários depende do tamanho da placenta, da morfologia (espessura do tecido), da capacidade/disponibilidade de transportadores de nutrientes e do fluxo sanguíneo útero e feto-placentário (FOWDEN *et al.*, 2006; HIGGINS *et al.*, 2011). O peso da placenta é um marcador da área de superfície disponível para troca de nutrientes materno-fetal e é um importante determinante tanto do peso ao nascer como do crescimento fetal (ROLAND *et al.*, 2012), sendo os pesos fetal e placentário correlacionados positivamente (WALLACE; HORGAN; BHATTACHARYA, 2012). Se a placenta não conseguir atingir um tamanho adequado, pode ser incapaz de suportar o desenvolvimento do feto. Pelo contrário, uma associação entre placentas grandes e resultados neonatais ruins, incluindo hipóxia (NAEYE, 1987) e macrosomia, que são fetos com peso ou tamanho elevados, também foi relatada (WALLACE; HORGAN; BHATTACHARYA, 2012). Além disso, as alterações no número, densidade, distribuição ou atividade dos transportadores específicos (JANSSON *et al.*, 2006; JOHANSSON *et al.*, 2003) representam um mecanismo de controle do crescimento fetal e são reguladas pela disponibilidade de nutrientes na circulação materna: há restrição do crescimento quando a nutrição é limitada e aceleração quando os nutrientes estão em excesso (JANSSON; POWELL, 2006).

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo transporte de nutrientes placentários envolvem vias de sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que serve como integrador de sinais de oferta materna e demanda fetal e, assim, funciona como um sensor de nutrientes (JANSSON; POWELL, 2013). A via de mTOR integra vários sinais para regular o crescimento, incluindo fatores de crescimento, estresse, estado energético,

oxigênio e aminoácidos (LAPLANTE; SABATINI, 2012). mTOR recebe sinais maternos (por exemplo, insulina, leptina, adiponectina) e transmite esta informação para alterar a transcrição de genes e a tradução de proteínas, resultando em *up/down regulation* de transportadores de nutrientes implicadas no crescimento fetal (JANSSON *et al.*, 2003). mTOR é uma proteína quinase atípica serina / treonina que interage com várias proteínas para formar dois complexos mTOR (mTORC): complexo mTOR 1, que atua na detecção de nutrientes na placenta, regulando o crescimento celular, a proliferação e o metabolismo, ou o complexo mTOR 2, que regula a organização do citoesqueleto. mTOR, via mTORC 1, é controlado pelo intermediário Rheb, que é regulado pelo complexo de esclerose tuberosa 1 e 2 (TSC 1 e 2). Várias quinases efetoras, tais como a proteína quinase B (Akt/PKB) e a quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) atuam no complexo TSC, afetando a atividade de mTOR. Por exemplo, fatores de crescimento, como insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), sinalizam através da via do substrato do receptor de insulina/ fosfoinosítideo 3-quinase (IRS/PI3K) e Akt/PKB, que inativa TSC, ativando mTORC1 e, assim, promovendo o crescimento, como observado na Figura 8. As citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), também podem conduzir à ativação de mTOR, através de um mecanismo semelhante de inibição de TSC. Embora o mecanismo não esteja totalmente elucidado, já foi observado que aminoácidos ativam mTOR, independentemente de TSC (LAPLANTE; SABATINI, 2012), e que a inativação de mTOR ocorre por AMPK, proteínas quinases ativadas por adenosina monofosfato (AMP), e em resposta ao estresse celular e depleção de energia (baixos níveis de adenosina trifosfato - ATP) (INOKI; ZHU; GUAN, 2003).

Os efetores a jusante mais bem caracterizados de mTOR incluem duas vias de sinalização paralelas envolvidas no controle traducional: a proteína quinase S6 ribossômica (S6K) e a proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótica 4E (eIF4E) (4E-BP1, 4E-BP2 ou 4E-BP3) (HAY; SONENBERG, 2004). A fosforilação dependente de mTOR de S6K leva à ativação de S6K, que está envolvida na regulação da síntese proteica, do tamanho da célula, da progressão do ciclo celular, da homeostase da glicose e da sobrevivência de recém-nascidos. A fosforilação dependente de mTOR de 4E-BP1 resulta na dissociação de 4E-BP1 do fator de iniciação eIF4E e, portanto, na desinibição da última proteína, facilitando a regulação positiva da síntese proteica, do tamanho da célula e da progressão do ciclo celular (RUVINSKY; MEYUHAS, 2006).

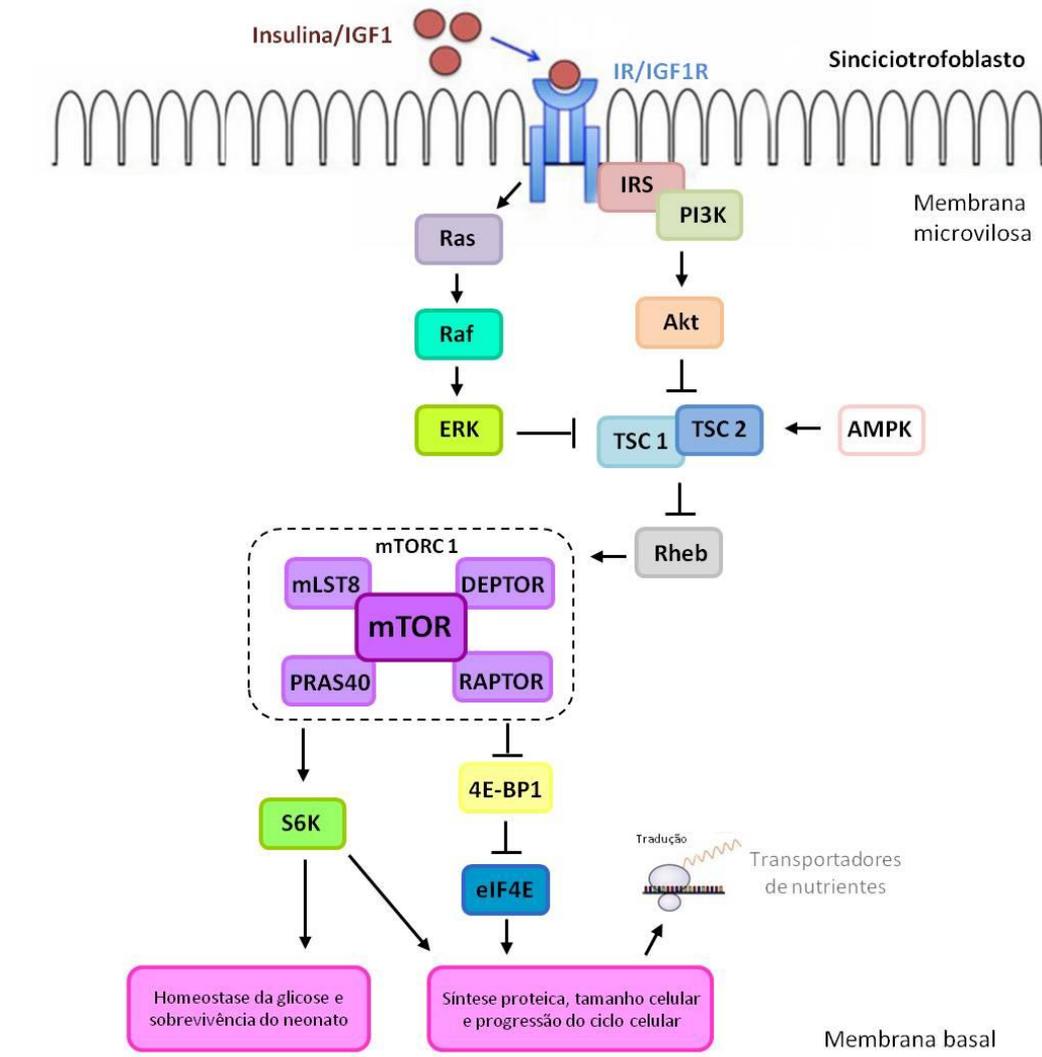


Figura 8: Mecanismo molecular de regulação dos transportadores de nutrientes placentários via IR/IGF1R/mTOR. Insulina/IGF1 ligam-se aos receptores, fosforilam Akt, que inibe TSC2, liberando assim a inibição de Rheb por TSC 1/2. Rheb ativado estimula a sinalização mTORC1. Outras quinases a montante, como ERK 1/2, convergem no TSC 1/2, que regula mTOR. A ativação de mTORC1 leva à fosforilação da S6K e à dissociação de eIF4E da 4E-BP1, promovendo a síntese proteica. AMPK, em resposta aos baixos níveis de energia, fosforila TSC2, e assim inibe mTORC1. IGF1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; IR: receptor de insulina; IGF1R: receptor do IGF1; IRS: substrato do receptor de insulina; PI3K: fosfoinositídeo 3-quinase; Akt/PKB: proteína quinase B; TSC 1 e 2: complexo de esclerose tuberosa 1 e 2; Rheb: homólogo Ras enriquecido no cérebro; Ras: GTPase descoberta no sarcoma de rato (*rat sarcoma*); Raf: quinase de fibrossarcoma rapidamente acelerado; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; AMPK: quinase ativada por adenosina monofosfato; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; mTORC1: complexo mTOR 1; DEPTOR: proteína que interage com mTOR contendo domínio DEP; RAPTOR: proteína associada-regulatória da mTOR; mLST8: proteína 8 Sec13 mamífero letal; PRAS40: substrato de Akt rico em prolina, 40 kDa; S6K: proteína quinase ribossomal S6; 4E-BP1: proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótico 4E 1;

eIF4E: fator de iniciação eucariótico 4E. Adaptado de (BRETT *et al.*, 2014; DIMASUAY *et al.*, 2016; ROOS; POWELL; JANSSON, 2009; RUVINSKY; METUHAS, 2006; YU; CUI, 2016).

1.6 Estado energético materno: perfis lipídicos e glicêmicos

Além da morfofuncionalidade placentária, o estado energético materno também influencia o desenvolvimento e o crescimento fetal (SOHLSTROM, 1994). Há evidências de que a composição corporal materna por si só é um fator predisponente à adiposidade nos filhotes (SACKS *et al.*, 2006). Além disso, hiperglicemia e hiperlipidemia maternas aumentam o suprimento de glicose e lipídios ao feto (DUBE; ETHIER-CHIASSON; LAFOND, 2013; KUHL, 1998). Observa-se, portanto, que o frequente aumento da disponibilidade de nutrientes na circulação materna estimula a placenta a aumentar o transporte desses nutrientes, resultando em supercrescimento fetal (BRETT *et al.*, 2014), enquanto que a subnutrição materna freqüentemente resulta em restrição do crescimento intrauterino (PRADA; TSANG, 1998).

Durante a gestação, naturalmente ocorre o aumento da resistência periférica à insulina na mãe para garantir o fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento do feto (KIRWAN *et al.*, 2002; MASTORAKOS; ILIAS, 2003; RYAN; ENNS, 1988). Conseqüentemente, a célula β -pancreática secreta mais insulina. Em roedores, a insulina atinge seu pico por volta do 16º DG (BARBOUR *et al.*, 2007; MALAISSE *et al.*, 1969). A resistência à insulina gera níveis mais altos de glicose materna, que é transferida para o feto. Em resposta, o feto produz sua própria insulina, que então age como um hormônio de crescimento, promovendo em aumento do crescimento fetal e adiposidade (MCGOWAN; MCAULIFFE, 2010; PEDERSEN, 1977). O perfil lipídico materno também é aumentado fisiologicamente durante a gravidez, onde as concentrações de triglicerídeos no plasma estão elevadas e acompanhadas por aumentos menores de colesterol e fosfolipídeos. Esses lipídios são transferidos para o fígado, para metabolização, e disponibilizados no plasma fetal por meio de FATP e de lipoproteínas transportadoras de colesterol na placenta (HERRERA *et al.*, 2006).

Apesar da plasticidade da placenta para manter o crescimento fetal normal mesmo com alterações metabólicas na mãe, sabe-se que os transportadores placentários de nutrientes respondem à oferta materna. Por isso é importante que os níveis de glicose e lipídios no sangue materno sejam mantidos dentro das concentrações normais para garantir

adequadamente esses nutrientes ao feto (HORAN *et al.*, 2014). Distúrbios no metabolismo materno que alteram o suprimento de nutrientes da mãe para o feto podem induzir adaptações estruturais e funcionais durante o desenvolvimento fetal, com conseqüências duradouras para o crescimento e metabolismo da prole ao longo da vida (AERTS; VAN ASSCHE, 2006).

1.7 Toxicidade dos OTs nos sistemas reprodutivo feminino e placentário, estado energético materno e transferência de efeitos à prole

OTs são capazes de inibir competitivamente a aromatase, provocando a diminuição de estrogênio (OMURA *et al.*, 2001) e aumento nos níveis de testosterona (GROTE *et al.*, 2004). Tais hormônios modulam a função reprodutiva de mamíferos. EMA e MIYAWAKI (2002) reportaram que os OTs diminuem o peso uterino, o ganho de peso materno, a taxa de gravidez e o número de implantes em ratas pseudográvidas. Além disso, nosso grupo demonstrou que 100 ng/kg de TBT promoveram irregularidade no ciclo estral, atresia ovariana, acúmulo de Sn nos ovários e soro, adipogênese ovariana anormal, *feedback* negativo irregular dos esteróides ovarianos (ARAUJO *et al.*, 2018; PODRATZ *et al.*, 2012; SENA *et al.*, 2017), associado a resistência à insulina e intolerância a glicose, aumento da adiposidade e acúmulo de vacúolos lipídicos no fígado (BERTULOSO *et al.*, 2015).

COOKE e colaboradores (2008) mostraram que o TBT pode se acumular e atravessar a placenta. OTs também se acumulam em tecidos fetais, como o fígado (GRUN *et al.*, 2006). Na geração F1, a exposição parental a 20 mg/kg de TBT, nos dias 0-19 ou 8-19 de gestação, diminui o peso corporal (ADEEKO *et al.*, 2003). A redução de 46,1% no número de células germinativas é observada nos ovários após 10 mg/kg de TBT, nos dias 8-19 de gestação (KISHTA *et al.*, 2007). Além disso, CHAMORRO-GARCÍA e colaboradores (2013) demonstraram que a exposição pré-natal ao TBT foi capaz de gerar herança transgeracional de complicações metabólicas até a 3ª geração, como desenvolvimento de obesidade e esteatose hepática em ambos os gêneros de camundongos.

Dessa maneira, a proposta deste estudo foi avaliar se a biotransferência dos OTs entre diferentes espécies poderia comprometer os sistemas reprodutivo e placentário de ratas adultas, e os possíveis efeitos herdados pelos fetos.

2 JUSTIFICATIVA

A contaminação ambiental provocada pelos OTs, a exposição de humanos a estes xenobióticos e a desregulação endócrina que geram em invertebrados marinhos e roedores já são estudados ao longo de várias décadas, em diversos países. No entanto, ainda não há um modelo de biotransferência dos OTs para mamíferos. Analisar os prejuízos que a exposição a soluções individuais de OTs, compradas no mercado, geram em roedores são importantes para demonstrar a toxicidade desses compostos e os efeitos sobre órgãos-alvos. No entanto, a principal via de exposição de humanos se dá com a transferência dos OTs provenientes da ingestão de organismos aquáticos contaminados, que contém uma mistura de OTs, e assim, apresentam metabolização e propriedades cinéticas diferenciadas. Além disso, uma pesquisa na base de dados digital *PubMed*, realizada em março de 2017, revelou apenas 12 artigos relacionando os OTs e placenta de ratas. Nesses estudos, as avaliações restringiam-se à dosagem dos OTs na placenta; registro do peso; um estudo realizou análise histológica placentária após exposição ao DBT; testes comportamentais após aplicação dos OTs na placenta; e avaliação da transferência dos OTs via placenta, após exposição das mães e dosagem nos filhotes.

Neste contexto, surgem os seguintes questionamentos: uma vez verificado o problema reprodutivo em gastrópodes, decorrentes da contaminação por OTs, poderia haver a transferência deste xenobiótico e dos distúrbios gerados nos moluscos, para outras espécies, como mamíferos terrestres, por meio da ingestão alimentar? Os possíveis prejuízos endócrinos poderiam influenciar o estado energético e o funcionamento placentário, e, assim, afetar a gestação? As alterações gestacionais poderiam acarretar danos aos fetos?

Nossa hipótese é de que a exposição aos OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, prejudica a morfofuncionalidade reprodutivo-placentária e os perfis energéticos, produzindo respostas adaptativas, que são memorizadas e culminarão em distúrbios efêmeros e/ou permanentes nos fetos de ambos os sexos. Sendo assim, este estudo é pioneiro na avaliação das vias moleculares de regulação dos transportadores placentários de nutrientes após exposição de ratas adultas aos OTs, assim como em relação ao tipo de exposição aos OTs pelas ratas, que reflete mais fidedignamente a principal via de exposição de humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a gênese e os mecanismos envolvidos nas alterações reprodutivas e do estado energético de ratas adultas, assim como na disfunção placentária e nos prejuízos aos fetos de ambos os gêneros, induzidos pela exposição direta e por herança multigeracional materna de ingestão de moluscos contaminados com organoestânicos.

3.2 Objetivos Específicos

a) Determinar as concentrações de estanho no soro das ratas, para confirmar a transferência dos organoestânicos via ingestão de moluscos contaminados;

b) Determinar os efeitos da exposição aos moluscos contaminados com organoestânicos sobre a morfofuncionalidade dos ovários e úteros de ratas adultas;

c) Determinar os efeitos da exposição aos moluscos contaminados com organoestânicos sobre a fertilidade e a implantação embrionária;

d) Determinar os efeitos da exposição aos moluscos contaminados com organoestânicos sobre os perfis lipídicos e glicêmicos de ratas adultas e grávidas;

e) Determinar os efeitos da exposição aos moluscos contaminados com organoestânicos sobre a estrutura microscópica, o processo inflamatório, a deposição lipídica e a expressão proteica na placenta;

f) Determinar os efeitos da exposição materna aos moluscos contaminados com organoestânicos sobre parâmetros antropométricos e hepáticos nos fetos de ambos os gêneros.

4 MÉTODOS

4.1 Descrição do gastrópode

Neste estudo, os moluscos usados foram da espécie *Leucozonia nassa* (*L. nassa*) (fotos representativas na Figura 9). Esta espécie pertence à classe Gastrópode, característica da zona entre marés, principalmente em regiões abrigadas. Distribui-se no Brasil desde o Ceará até Santa Catarina, e em ilhas oceânicas e demais regiões do Continente Americano, como Flórida, Texas, Colômbia e Venezuela (THOMÉ *et al.*, 2010). Sua concha normalmente apresenta uma linha central branca e um dente no lábio externo da abertura da concha. Possui um pé pequeno em relação ao animal, de coloração rosada e com manchas brancas. Locomove-se mais à noite e se esconde em fendas e bancos de *Phragmatopoma sp.* durante a baixa-mar. Alimenta-se de outros gastrópodes, poliquetas, ostras e cracas. São presas de cefalópodes, como polvos, e crustáceos, que são amplamente consumidos por humanos e, portanto, ocorre bioacumulação trófica dos OTs (RIOS, 1994).

L. nassa mostrou ser uma boa espécie bioindicadora da poluição por TBT na costa do Espírito Santo por apresentar-se altamente sensível à exposição por esse poluente, registrando elevados índices de *imposex* em fêmeas e anomalias em pênis de machos, principalmente em regiões próximas a portos e marinas. Tal fator, associado à facilidade de coleta de exemplares, à presença de grandes populações e sua ampla distribuição ao longo do litoral brasileiro, a selecionam como uma espécie sentinela para a presença desses compostos, sendo adotada em programas de biomonitoramento costeiro (PEDRUZI, 2009; COSTA, 2012).

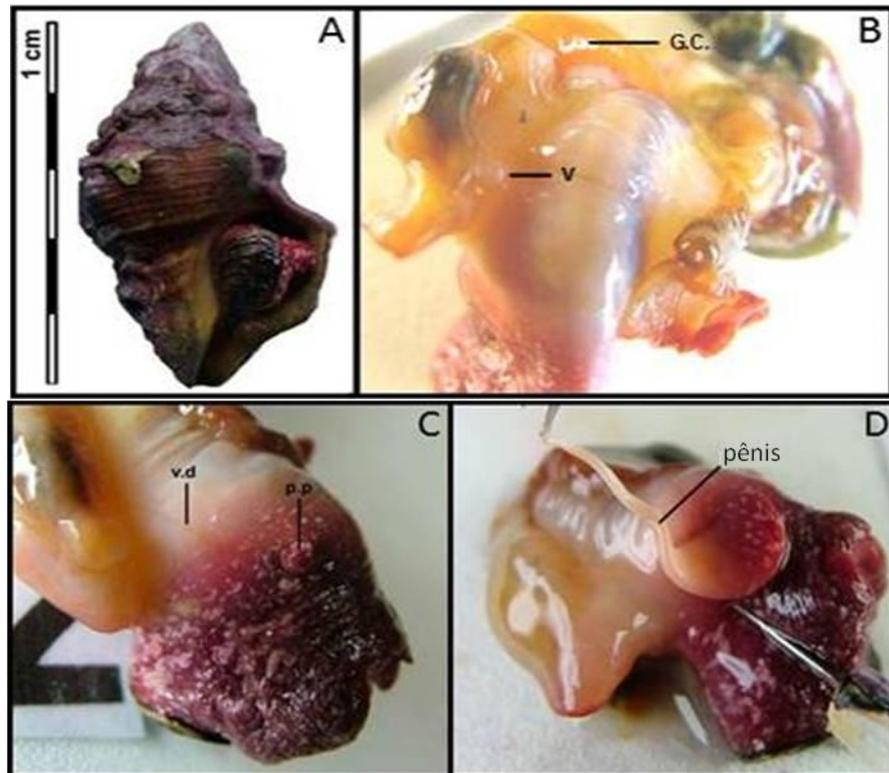


Figura 9: Gastrópode *Leucozonia nassa*. (A) Espécime com concha; (B) Fêmea normal, G.C.: glândula da cápsula, v: vulva; (C) Fêmea imposexada, v.d: vaso deferente, p.p: pré-pênis; (D) Macho, p: pênis. Fotos fornecidas pela Dr^a. Mércia Barcellos da Costa.

4.2 Coleta dos moluscos e análise do *Imposex*

Espécimes (n=100) de *L. nassa* imposexadas foram coletados na Praia da Ilha do Frade, Baía de Vitória, ES, Brasil (77°54'S, 36°63'O), que exibe altos níveis de *imposex* (95 ± 2%, avaliação entre 2007 e 2011), associados com a poluição de OTs nos sedimentos marinhos, como demonstrado na Figura 10. COSTA e colaboradores (2014) realizaram a dosagem de OTs neste sedimento e encontrou as concentrações (ng/g sedimento): MBT (296 ± 26), DBT (276 ± 8,6), TBT (398 ± 9). Devido ao alto valor detectado de TBT (acima de 300 ng/g sedimento), esse sedimento é considerado altamente contaminado, de acordo com um critério de qualidade estabelecido por WAITE e colaboradores (1991). Outros indivíduos de *L. nassa* (n=100) não-imposexados foram coletados na Praia de Aracruz, anteriormente à contaminação pela lama de rejeitos resultante do rompimento da barragem de Mariana, Minas Gerais, no dia 5 de novembro de 2015, e portanto, tratava-se de uma região livre de contaminação com OTs e sem atividade marítima (área controle, 19°49'S, 40°16'O).

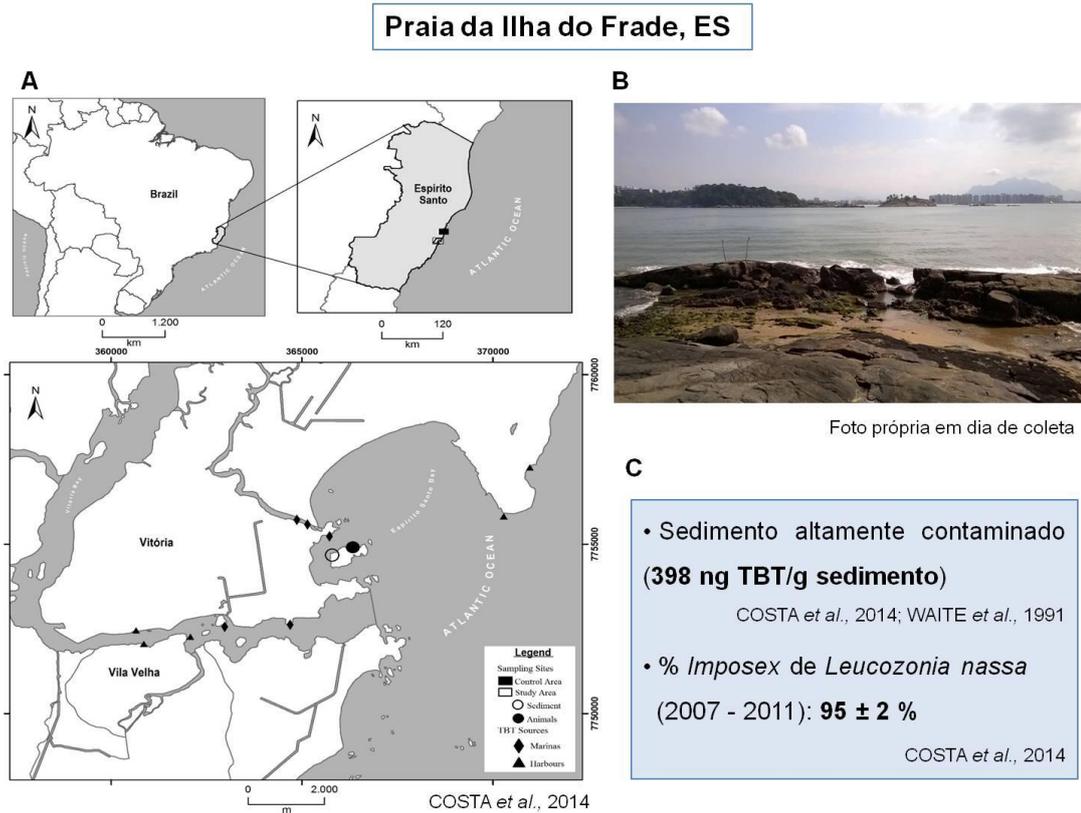


Figura 10: Localização da área de coleta das amostras de *L. nassa* imposexadas. (A) Representação no mapa da área de coleta das amostras de *L. nassa* contaminadas com OTs na Praia da Ilha do Frade, baía de Vitória, Espírito Santo, Brasil. (B) Foto representativa do ponto de coleta em dia de maré baixa. (C) COSTA e colaboradores (2014) demonstraram que entre os anos de 2007 e 2011, na Praia da Ilha do Frade - ES, a % de *imposex* de *L. nassa* foi de $95.2 \pm 2.1\%$ e a concentração de TBT no sedimento foi de 398 ± 9 ng/g de sedimento, que segundo WAITE e colaboradores (1991), caracteriza-se como um sedimento altamente contaminado.

Após a coleta, os gastrópodes foram mantidos em aquários aerados, contendo água do mar das estações de coleta. A narcotização dos animais foi feita por imersão em uma solução de cloreto de magnésio a 4% em água do mar e água destilada (1:1). As conchas foram quebradas com auxílio de uma morsa e após a remoção da parte mole, o sexo foi determinado baseado na presença das glândulas de cápsulas, de albúmen e de ingestão de esperma em fêmeas e da próstata em machos. O comprimento do pênis foi medido em fêmeas imposexadas (COSTA *et al.*, 2008B; 2013; 2014). Posteriormente, os moluscos fêmeas não-imposexados (coletados em Aracruz) ou imposexados (coletados na Praia da Ilha do Frade) foram utilizados na preparação do extrato não-contaminado e contaminado, respectivamente, através da maceração das partes corporais moles. A coleta dos moluscos e análise do *imposex* foram gentilmente realizadas pelo Laboratório de Malacologia da UFES (coordenado pela Dr^a. Mércia Barcellos da Costa).

4.3 Dosagem de Sn nos extratos

Para a confirmação da contaminação dos gastrópodes com OTs, realizamos, além da caracterização biológica com a verificação do *imposex*, a análise química de quantificação do Sn nos homogenatos. As concentrações de Sn nos extratos não-contaminado e contaminado com OTs foram avaliados utilizando espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Nexlon 300-D, Perkin Elmer, Alemanha). As amostras foram digeridas com peróxido de hidrogênio a 30% (m/m) e ácido nítrico ultra puro (Elga-Purelab, Marlow, UK) utilizando um forno microondas equipado com vasos de PTFE (microondas Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Áustria), e, posteriormente, analisadas por ICP-MS. O nível de detecção para Sn determinado por ICP-MS foi de 4,0 ng/g e foi determinado para cada análise realizada (MOSER; MCGEE; EHMAN, 2009). A dosagem de Sn nos extratos foi gentilmente realizada pelo Laboratório de Espectrometria Atômica da UFES (coordenado pela prof^a. Dr^a. Maria Tereza Carneiro).

4.4 Animais e grupos experimentais

Ratas Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) adultas (\pm 230g, com 12 semanas de idade) foram fornecidas/mantidas pelo Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), com umidade e temperatura controladas, sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, e água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES (registros 047/2010 e 01/2017). As fêmeas foram expostas aos seguintes tratamentos: **G1**: CON (controle, expostas a 0,6 mL de água destilada – mimetizar a gavagem, n = 31); **G2**: LNN (tratadas com extrato de *Leucozonia nassa* não contaminado com OTs, n = 31); **G3**: LNI (tratadas com extrato de *Leucozonia nassa* imposexada - contaminada com OTs, n = 31). Os grupos 2 e 3 receberam 600 mg do respectivo extrato/dia/animal, via gavagem, durante 15 dias. Esta dose de extrato escolhida equivale à ingestão de frutos do mar por comunidades ribeirinhas brasileiras (200 g/dia/70 kg), e foi obtida de estudo que avalia os riscos a saúde humana decorrentes da exposição aos OTs (FERNANDEZ *et al.*, 2005). Posteriormente, as ratas foram destinadas aos protocolos experimentais, conforme a Figura 11.

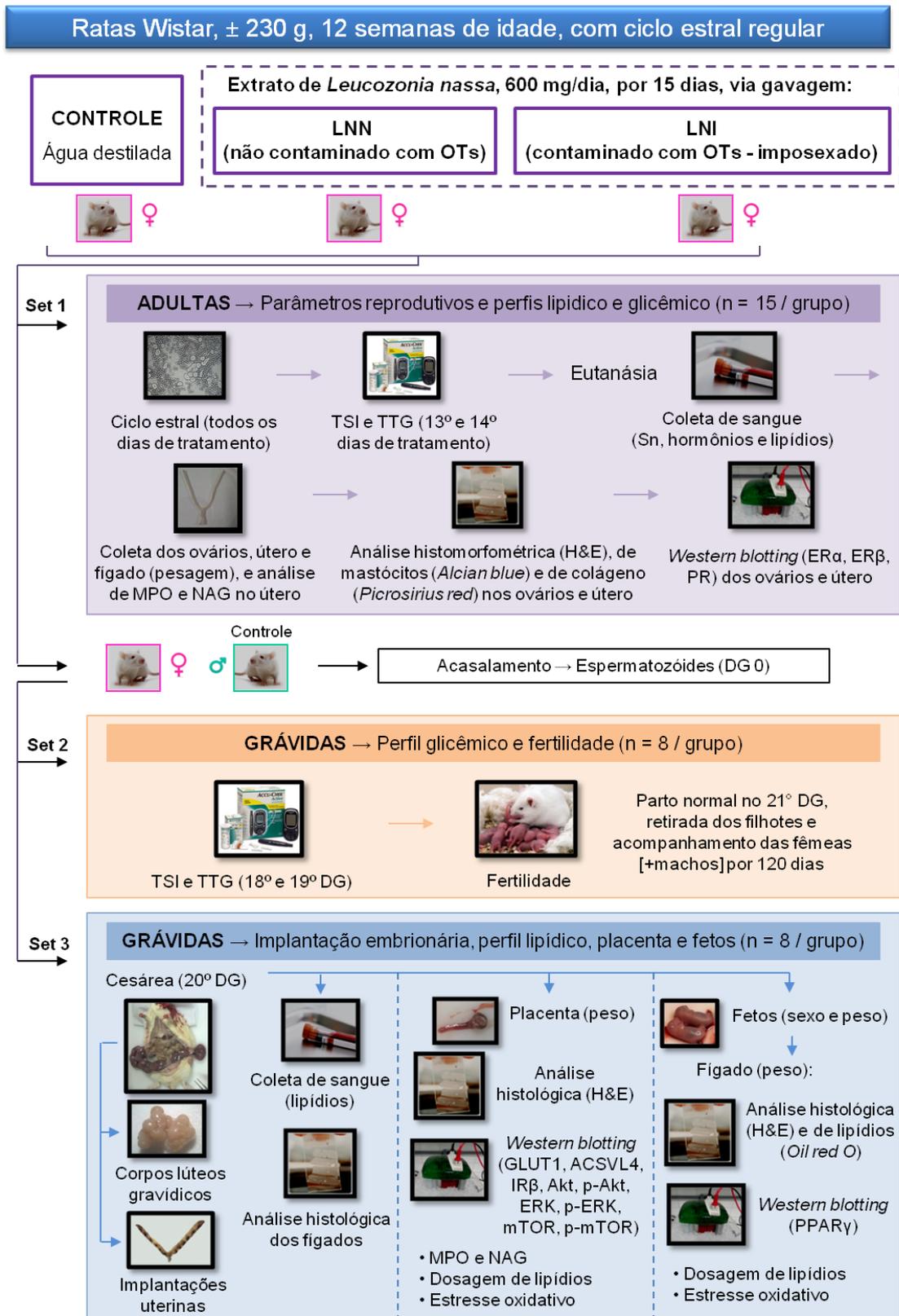


Figura 11: Modelo esquemático dos tratamentos e dos protocolos experimentais realizados em ratas adultas, grávidas e fetos. Sn: estanho, TSI: teste de sensibilidade insulínica, TTG: teste de tolerância à glicose, MPO: mieloperoxidase, NAG: N-acetil-β-D-glicosaminidase, H&E: hematoxilina e eosina; DG: dia gestacional.

Neste estudo, foram utilizadas 93 ratas (CON = 31, LNN = 31, LNI = 31). Após os 15 dias dos tratamentos específicos, 15 fêmeas de cada grupo foram destinadas ao **Set 1**, para avaliação dos parâmetros reprodutivos e perfil energético nas adultas. As outras 16 ratas de cada grupo foram alocadas com machos controle para acasalamento e foi considerado o DG 0 (zero) quando ocorreu a visualização de espermatozóides no lavado vaginal. Posteriormente, 8 fêmeas grávidas de cada grupo foram destinadas ao **Set 2**, para avaliação do perfil glicêmico e do protocolo de fertilidade; e as outras 8 grávidas de cada grupo foram destinadas ao **Set 3**, para análise de implantação embrionária, e coleta do sangue, do fígado, das placentas e dos fetos.

Para as avaliações do **Set 3**, as 8 fêmeas grávidas de cada grupo, no 20º DG a tarde, foram decapitadas (sem anestesia, devido a coleta de sangue da região cervical para a dosagem sérica de lipídios, e após 12 horas de jejum, devido as análises de glicose no sangue umbilical) (ZENG; XU; ZHANG, 2016). Rapidamente, foi feita a cesariana, por incisão longitudinal na região da linha alba, para exposição do útero e dos ovários. O útero foi retirado, com todo o seu conteúdo, e, com o auxílio de tesoura com ponta boleada, a parede uterina foi aberta e as membranas amnióticas foram rompidas. As placentas, cordão umbilical e os fetos foram cuidadosamente separados dos cornos uterinos. Foram coletados os dados antropométricos e, imediatamente, os fetos foram decapitados. Posteriormente, os fígados fetais foram dissecados (DAMASCENO *et al.*, 2008). Das grávidas, também foram coletados os fígados.

4.5 Avaliação do ciclo estral nas adultas (Set 1)

Diariamente, foi coletado, durante os 15 dias de tratamento, entre 8 e 9 horas da manhã, o lavado vaginal das fêmeas, por meio da injeção de 10 µL de salina (NaCl 0,9%). Este material foi depositado em lâminas de vidro, fixado com metanol e corado com H&E, para análise dos tipos celulares no microscópio óptico (fluorescente de EPI L3001) (NELSON *et al.*, 1982).

4.6 Protocolo de TSI e TTG nas adultas e grávidas (Set 1 e 2)

No 13º dia de tratamento das ratas adultas (Set 1) e no 18º DG das grávidas (Set 2) (KISS *et al.*, 2012), pela manhã, as fêmeas, em estado alimentado, receberam a aplicação intraperitoneal (ip) de 0,75U de insulina/kg de peso corporal. Receberam um pequeno corte

na ponta da cauda, para coleta de uma gota de sangue e verificação da glicemia nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 90 minutos (TSI - teste de sensibilidade insulínica).

As mesmas fêmeas, no 14^o dia de tratamento (ratas adultas – Set 1) e no 19^o DG (grávidas – Set 2), após jejum de 12 horas, receberam a aplicação ip de 2g de glicose/kg de peso corporal. Receberam um pequeno corte na ponta da cauda, para coleta de uma gota de sangue e verificação da glicemia nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (TTG - teste de tolerância a glicose). O aparelho utilizado para leitura glicêmica dos testes foi o Accu-Chek® Advantage (Roche) (SANTOS *et al.*, 2010).

4.7 Avaliação dos níveis séricos hormonais e de Sn nas adultas (Set 1), dosagem de lipídios nas adultas e grávidas (Set 1 e 3), e de glicose e colesterol no sangue do cordão umbilical (Set 3)

Após os 15 dias de tratamento, as fêmeas adultas (Set 1) foram decapitadas na fase de metaestro-diestro, sem anestesia, devido à coleta de sangue da região cervical para a dosagem de hormônios sexuais, que são influenciados por ação dos anestésicos (LEE *et al.*, 2000), de Sn e de lipídios (triglicerídeos e colesterol total). As grávidas (Set 3) foram decapitadas, sem anestesia, no 20^o DG, para a coleta de sangue da região cervical para a dosagem de lipídios.

Após a decapitação, as amostras de sangue foram recolhidas e imediatamente centrifugadas, para se obter o soro, que foi utilizado para medições dos níveis de estradiol, progesterona e testosterona (ratas adultas - Set 1) por ELISA (Estradiol-2693, Progesterone-1561, Testosterone-1559, EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Saronno, Italy) (MOYSÉS; BARKER; CABRAL, 2001). A dosagem de Sn no soro das ratas adultas (Set 1) foi realizada de forma semelhante à análise de Sn nos extratos, por ICP-MS (tópico: 4.3 Dosagem de Sn nos extratos) (MOSER; MCGEE; EHMAN, 2009). O mensuramento dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total (ratas adultas e grávidas - Set 1 e 3) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante de kits colorimétricos (Bioclin, MG, Brasil) (LIU *et al.*, 2014).

No sangue do cordão umbilical (Set 3), verificamos a glicemia com o aparelho de leitura glicêmica Accu-Chek® Advantage (Roche), e amostras de sangue do cordão foram recolhidas para dosagem de colesterol total por kit (Bioclin).

4.8 Análise dos pesos corporal e dos órgãos (Set 1 e 3)

O ganho de peso corporal das ratas ao longo do tratamento e no período gestacional (Set 3) foi obtido pelo registro semanal do peso. Após as eutanásias, verificamos o peso dos ovários, útero, hipófise, fígado e adiposidade (tecido parametrial, abdominal, retroperitoneal e perirrenal) das adultas (Set 1); placenta, fígado e adiposidade das grávidas (Set 3) e peso corporal e do fígado fetais (Set 3).

4.9 Análises histomorfométricas

4.9.1 Avaliação histológica dos ovários, útero e fígado das adultas (Set 1), da placenta e fígado das grávidas e dos fetos (Set 3)

Após a remoção, os órgãos foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado, pH 7,4, por um período entre 24 e 48 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e banhados em parafina a 60°C. Posteriormente, os blocos de parafina contendo os tecidos foram cortados em um micrótomo (Leica RM 2125 RTS). Foram obtidas 5 secções/animal, em cortes de 5 µm, com 50 µm de distância entre elas. Inicialmente, foram coradas com H&E e fotografadas pelo programa AxioVision Rel. 4.8, na câmera AxioCam ERc5s acoplada ao microscópio Olympus AX70 (PODRATZ *et al.*, 2012).

A classificação e contagem de folículos ovarianos (primordial, primário, pré-antral e antral) e corpo lúteo foi realizada de acordo com BORGEEST e colaboradores (2002), e dos folículos císticos e atrésicos, conforme SHI e colaboradores (2009), pelo qual folículos atrésicos apresentam células da granulosa desorganizadas, com núcleos picnóticos, ovócitos degenerados e deslocamento da membrana basal, e os folículos císticos foram definidos como dilatados, cheios de líquido folicular e revestidos com células da granulosa redondas ou achatadas. Assim, classificamos como folículo cístico, os folículos atrésicos sem antro, apenas para diferenciar atresia em estágios iniciais ou tardios. Para a morfometria uterina, foi mensurada a espessura do epitélio luminal, do miométrio e do endométrio. Nos fígados foram realizadas análises qualitativas de detecção de células inflamatórias e vacúolos lipídicos, caracterizados por serem redondos, de limites nítidos e tamanhos variáveis. Na placenta, foi quantificada a porcentagem de células de glicogênio na zona basal, obtida pelo cálculo: (área de células de glicogênio/área total) x 100.

4.9.2 Avaliação da deposição de colágeno no ovário e útero das adultas (Set 1)

Cortes de ovários e útero foram corados com *Picro-sirius red*. Foram obtidas fotomicrografias com a objetiva 4x, de forma a capturar todo o tecido. As fotos foram agrupadas pela função *photomerge*, do Photoshop, para se ter a área total. Para a quantificação de colágeno foi utilizado o programa ImageJ. Os resultados foram expressos com porcentagem de área marcada com a coloração (SENA *et al.*, 2017).

4.9.3 Avaliação de mastócitos nos úteros das adultas (Set 1)

Cortes de útero foram corados com *Alcian Blue* (Sigma-Aldrich Co, LLC). Foram obtidas fotomicrografias com a objetiva 4x, de forma a capturar todo o tecido. Posteriormente, as fotos foram agrupadas pela função *photomerge*, do Photoshop, para se ter a área total. O número de células com coloração positiva (células contendo grânulos citoplasmáticos roxos) no tecido foi avaliado e expresso por unidade de área (mm^2) (BERTULOSO *et al.*, 2015).

4.9.4 Avaliação da deposição de lipídios no fígado dos fetos (Set 3)

Os fígados dos fetos foram dissecados, embebidos em Tissue-Tek OCT (Fisher Scientific), congelados e cortados na espessura de 7 μm usando um criostato (Jug CM1800; Leica). Os tecidos foram montados em lâminas e coradas com *Oil Red O* (Sigma-Aldrich). Gotículas de lipídios foram quantificadas pelo programa ImageJ. A área das gotículas de lipídios (μm^2) foi expressa pela área de fígado analisada (μm^2) (BERTULOSO *et al.*, 2015).

4.10 Avaliação da atividade de MPO (Mieloperoxidase) – presença de neutrófilos – nos úteros das adultas (Set 1) e placenta (Set 3)

Os órgãos foram pesados, homogeneizados em tampão pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO_4 e 0,015 M NaEDTA) e centrifugados. Os pellets foram suspensos em tampão NaPO_4 0,05 M com brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5%, seguido por 3 ciclos de congelamento e descongelamento usando $\text{N}_2(\text{l})$ 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 H_2O_2 (0,3 mM). A reação foi terminada pela adição de 50 μL de H_2SO_4 (4 M). Os resultados foram expressos como mudança de OD/ μg de proteína (ARAÚJO *et al.*, 2010).

4.11 Atividade de NAG (N-acetil-β-D-glicosaminidase) – presença de macrófagos – nos úteros das adultas (Set 1) e placenta (Set 3)

Os órgãos foram homogeneizados 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 µL 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 µL de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6). Hidrólise do substrato foi determinado pela mensuração da absorção em 400 nm. Os resultados foram expressos como nmol/µg de proteína (BARCELOS *et al.*, 2005).

4.12 Avaliação proteica, por *western blot*, dos ovários e útero (Set 1), placenta e fígado dos fetos (Set 3)

As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise contendo os inibidores de protease, a 0°C com um homogeneizador Potter, com 10 incursões por amostra e, posteriormente, centrifugadas a 10000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas totais (LOWRY *et al.*, 1951). Após as dosagens, retiramos o volume necessário de cada amostra para uma concentração de 100 µg/µL de proteínas totais, em um volume final de 15 µL, após adição de água e tampão de amostra, contendo β-mercaptoetanol. As proteínas foram desnaturadas a 100 °C, por 5 minutos. O SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis* usando dodecilsulfato de sódio) foi preparado usando 8-10% de SDS e poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida) (para proteínas de alto peso molecular, 220 kDa, foram utilizados géis de 8%; para as demais, foram géis de 10%). A corrida de eletroforese teve duração de 1 hora e 30 minutos a 120 Volts. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA). Após a transferência por 2 horas a 100 Volts, as membranas foram lavadas com tampão tris-salina 0.05% e tween 20 (TBS-T), e bloqueadas com leite em pó desnatado 5% em solução de TBS-T por 1 hora a 4 °C. As membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 10 minutos e incubadas com seus respectivos anticorpos primários, conforme a Tabela 1 (diluídos em leite em pó desnatado 3% em TBS-T, durante toda a noite a 4 °C). As membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (IgG conjugado a fosfatase alcalina, diluído em leite em pó desnatado 3% em TBS-T, por 1 hora a 4 °C). O resultado do *western blotting* foi visualizado usando uma reação colorimétrica com os reveladores NBT (*nitroblue tetrazolium chloride*) e BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-*

indolylphosphate p-toluidine salt) (sc24981; SCBT, Inc). As bandas foram analisadas por densitometria, utilizando o Programa Image J. Expressão relativa foi normalizada pela divisão dos valores da proteína de interesse pelo valor do controle interno correspondente (SENA *et al.*, 2017).

Tabela 1: Anticorpos usados na avaliação da expressão proteica

Anticorpo para	Código	Diluição	Órgão / Anticorpo 1º
ER α	sc-542, SCBT	1:500	Ovários e útero adultas (<i>Set 1</i>)
ER β	sc-8974, SCBT	1:500	Ovários e útero adultas (<i>Set 1</i>)
PR	sc-538, SCBT	1:500	Útero adultas (<i>Set 1</i>)
IR β	sc-57342, SCBT	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
p-Akt	sc-135650, SCBT	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
Akt	sc-55523, SCBT	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
p-ERK 1/2	9101, Cell Signaling	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
ERK 1/2	9102, Cell Signaling	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
p-mTOR	sc-293132, SCBT	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
mTOR	sc-293089, SCBT	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
GLUT 1	sc-377228, SCBT	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
ACSVL 4	sc-393309, SCBT	1:500	Placenta (<i>Set 3</i>)
PPAR γ	sc-7273, SCBT	1:500	Fígado fetos (<i>Set 3</i>)
GAPDH	sc-25778, SCBT	1:1000	Útero (RP – <i>Set 1</i>), placenta e fígado fetos (<i>Set 3</i>)
β -actin	sc-130656, SCBT	1:1000	Ovários e útero adultas (<i>Set 1</i>)
IgG anti-coelho + fosfatase alcalina	A3687, Sigma-Aldrich	1:1000	ER α , ER β , RP, p-Akt1, p-ERK 1/2, ERK 1/2, GAPDH, β -actin
IgG anti-camundongo + fosfatase alcalina	A3562, Sigma-Aldrich	1:1000	IR β , Akt1, p-mTOR, mTOR, GLUT 1, ACSVL 4, PPAR γ

ER α : receptor de estrogênio alfa; ER β : receptor de estrogênio beta; PR: receptor de progesterona; IR β : receptor de insulina beta; Akt: proteína quinase B; p-Akt: Akt fosforilada; ERK 1/2: quinase regulada por sinal extracelular; p-ERK 1/2: ERK 1/2 fosforilada; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; p-mTOR: mTOR fosforilada; GLUT1: transportador de glicose tipo 1; ACSVL4: Acil-CoA sintetase da família de cadeia muito longa tipo 4; PPAR γ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; β -actin: beta-actina; IgG: imunoglobulina G; SCBT: Santa Cryz Biotechnology, INC.

4.13 Avaliação da fertilidade (Set 2)

Como as ratas grávidas (Set 2) não abortaram e não apresentaram qualquer anormalidade na gestação após os TSI e TTG, foram destinadas a avaliação da fertilidade. Para isso, foram mantidas com machos controles (12 semanas de idade e com separação prepucial) em gaiolas de reprodução contínua. Seis fêmeas grávidas por grupo (dezoito fêmeas no total) foram mantidas com três machos CON (nove machos no total) (2 fêmeas e 1 macho/gaiola). As gaiolas foram verificadas diariamente e as avaliações incluíram a frequência das ninhadas e o tamanho das ninhadas, sendo que, a frequência de ninhadas foi determinada pelo registro de cada nova ninhada produzida durante 120 dias (NOVAIRA *et al.*, 2014). Após o nascimento dos filhotes da primeira gestação, por parto normal, no 21º DG, estes foram retirados das gaiolas e decapitados, uma vez que a amamentação pode interferir na receptividade da fêmea ao macho e assim alterar o tempo de ocorrência da próxima gestação. Esta conduta de retirada dos filhotes foi repetida após todas as gestações.

4.14 Avaliação dos fetos e das implantações embrionárias (Set 3)

Após a eutanásia, os fetos foram pesados e examinados a fresco para a determinação do sexo pela distância anogenital que, no macho, é aproximadamente duas vezes maior do que na fêmea (DAMASCENO *et al.*, 2008).

Após a retirada dos fetos, o útero materno foi submetido ao processo que revela os sítios em que ocorreram implantações (método de Salewski). O útero foi imerso em solução de sulfeto de amônio a 10% por 10 minutos, lavado em seguida em água corrente. Depois, foi imerso por 10 minutos em solução constituída por partes iguais de ácido clorídrico a 1% e solução de ferrocianeto de potássio a 20%. Os sítios de implantação apareceram como pontos negros facilmente visíveis (DAMASCENO *et al.*, 2008), como observado na Figura 12.

Os ovários das grávidas também foram removidos, para a contagem de corpos lúteos gravídicos, que são bem maiores e indicam o número de óvulos fecundados (DAMASCENO *et al.*, 2008), como verificado na Figura 12.

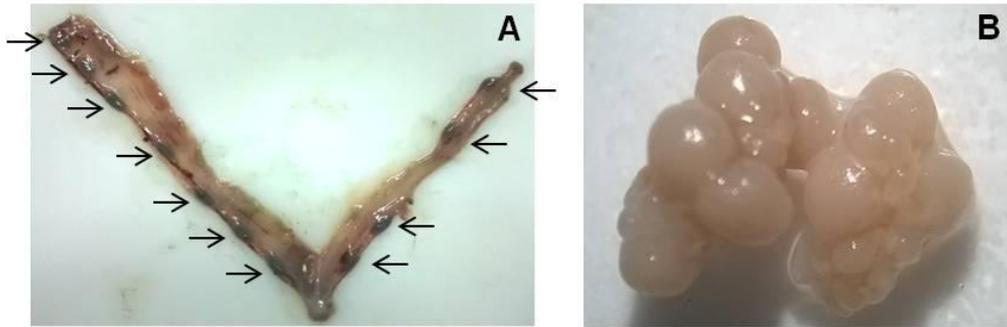


Figura 12: Imagens representativas do útero e ovários obtidos de ratas grávidas após cesariana, no 20º DG. (A) Útero contendo os sítios de implantação embrionária (setas), após coloração pelo método de Salewski. (B) Corpos lúteos gravídicos nos ovários (B). DG: dia gestacional.

- Cálculo das perdas de implantação embrionária (DAMASCENO *et al.*, 2008)

A proporção de mortes embrionárias durante o período que antecede a implantação é denominada **porcentagem de perdas pré-implantação**:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ corpos lúteos gravídicos} - \text{n}^\circ \text{ implantações}}{\text{n}^\circ \text{ corpos lúteos gravídicos}} \times 100$$

A proporção de mortes embrionárias após a implantação é denominada **porcentagem de perdas pós-implantação**:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ implantações} - \text{n}^\circ \text{ fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ implantações}} \times 100$$

4.15 Avaliação de triglicerídeos e colesterol total na placenta e fígado dos fetos (Set 3)

Amostras de placenta e fígado dos fetos (Set 3) foram homogeneizadas com salina, na proporção de 1:4 (g/mL), e submetidas à extração de lipídios totais pelo método de Folch modificado (FOLCH; LEES e SLOANE-STANLEY, 1957). Para isso, foi adicionado TCA 50%, seguido de centrifugação a 4000 rpm e, ao pellet, adicionamos clorofórmio-metanol (2:1), para a coleta da fase inferior, composta por clorofórmio e lipídios. Esta etapa foi repetida 3 vezes, e o clorofórmio foi evaporado. Os lipídios foram ressuspensos com salina-1% de albumina, e então, foi realizada a dosagem de colesterol total e de triglicerídeos com kit colorimétrico (Bioclin, MG, Brasil) (LIU *et al.*, 2014).

4.16 Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na placenta e fígado dos fetos (Set 3)

Foram pesados 150 mg de cada uma das amostras de placenta e fígado dos fetos, aos quais foi acrescentado 1 mL de PBS 1x, para homogeneização. Adicionamos 100 µL da solução TBA + BHT (ácido tiobarbitúrico + butil-hidrotolueno) e 50 µL de ácido fosfórico a 7%, com posterior incubação a 100°C, por 15 minutos. Imediatamente após este tempo de aquecimento, as soluções foram colocadas em gelo durante 10 minutos, para interromper a reação, e foi acrescentado 750 µL de butanol. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 2000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da peroxidação lipídica, com leitura na absorvância de 532 nm e, descontando-se a absorvância da amostra a 600 nm, para eliminar interferentes (PIRES *et al.*, 2014).

4.17 Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na placenta e fígado dos fetos (Set 3)

Foram pesados 150 mg de cada uma das amostras de placenta e fígado dos fetos, aos quais foi acrescentado 100 µL de PBS 1x e 300µl de TCA (ácido tricloroacético) a 12,5%. As soluções foram centrifugadas por 15 minutos, a 3000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para a leitura na absorvância de 630 nm (PIRES *et al.*, 2014).

4.18 Análise estatística

Para esta análise, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5. Todos os dados foram expressos como a média ± EPM (erro padrão da média). O teste de normalidade usado foi o D'Agostino-Pearson omnibus. Para valores Gaussianos foi empregado o ANOVA de uma via (*post hoc* Tukey). Para dados não Gaussianos, foi usado o teste de Kruskal-Wallis (seguido pela comparação múltipla de Dunn). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Aumento dos níveis de Sn nos gastrópodes e no soro das ratas LNI

Na análise das concentrações de Sn na água (CON) e nos extratos de *L. nassa* (LNN e LNI), o grupo CON apresentou valores menores ou iguais ao nível de detecção pela análise de ICP-MS, que foi de 4,0 ng/g. No extrato LNN, foi encontrada concentração de Sn de $108,7 \pm 0,2$ ng/g ($n=3$, Figura 13A). Em contraste, no extrato LNI (molusco imposexado) foi detectado níveis elevados de Sn ($844,3 \pm 7,0$ ng/g, $n=3$, $p < 0,001$), o que permite sugerir exposição a alta concentração de OTs. Além disso, para confirmar a transferência deste xenobiótico dos gastrópodes para os roedores, foi analisada a concentração do Sn no soro das ratas. Nas fêmeas CON e LNN, foi observado níveis de Sn de $4,0 \pm 1,0$ e $7,0 \pm 2,0$ ng/g ($n=6$), respectivamente. Já no soro das ratas LNI, os valores de Sn encontrados foram de $37,0 \pm 2,0$ ng/g ($n=6$, $p < 0,05$) (Figura 13B). Estes achados podem ser atribuídos aos altos níveis de OTs bioacumulados pelos gastrópodes utilizados na preparação do extrato LNI.

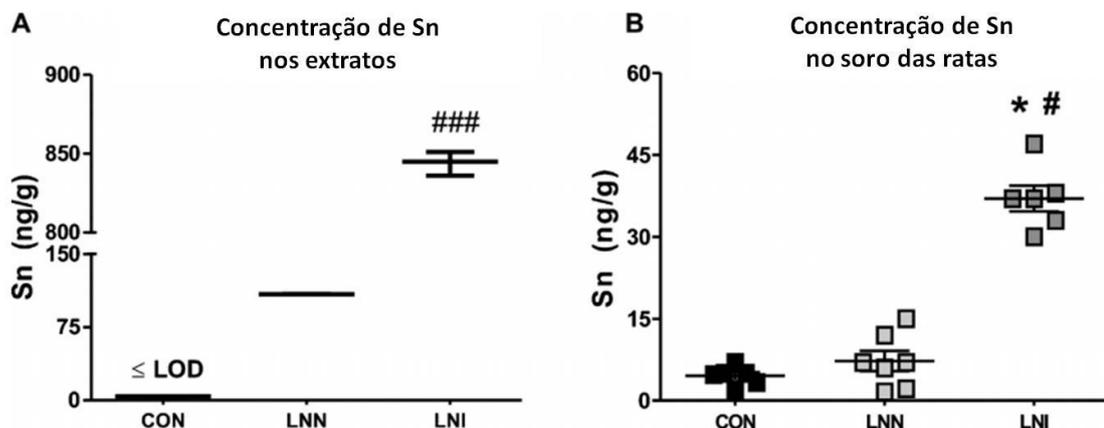


Figura 13: Dosagem de Sn nos extratos de moluscos (A) e no soro das ratas (B). LOD: nível de detecção = 4,0 ng/g. Extratos ($n=3$) e soros ($n=6$). Valores expressos como a média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs CON; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs LNN.

5.2 Ratas LNI apresentaram irregularidade no ciclo estral

Em decorrência da exposição aos OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, foi observado prejuízos funcionais ovarianos nas ratas LNI. Fêmeas dos grupos CON e LNN exibiram ciclos estrais regulares (Figura 14A), com comprimento do ciclo de $4,2 \pm 0,3$ e $4,3 \pm 0,2$ dias ($n=10$), respectivamente (Figura 14B). Porém, nas ratas LNI, foi

verificado ciclagem estral anormal, com comprimento total do ciclo de $6,1 \pm 0,5$ dias ($n=10$, $p<0,01$, Figura 14B) e prolongamento da fase de metaestro-diestro (CON: $2,0 \pm 0,1$; LNN: $2,0 \pm 0,1$; LNI: $4,0 \pm 0,5$ dias, $n=10$, $p<0,01$) (Figura 14A e 14B).

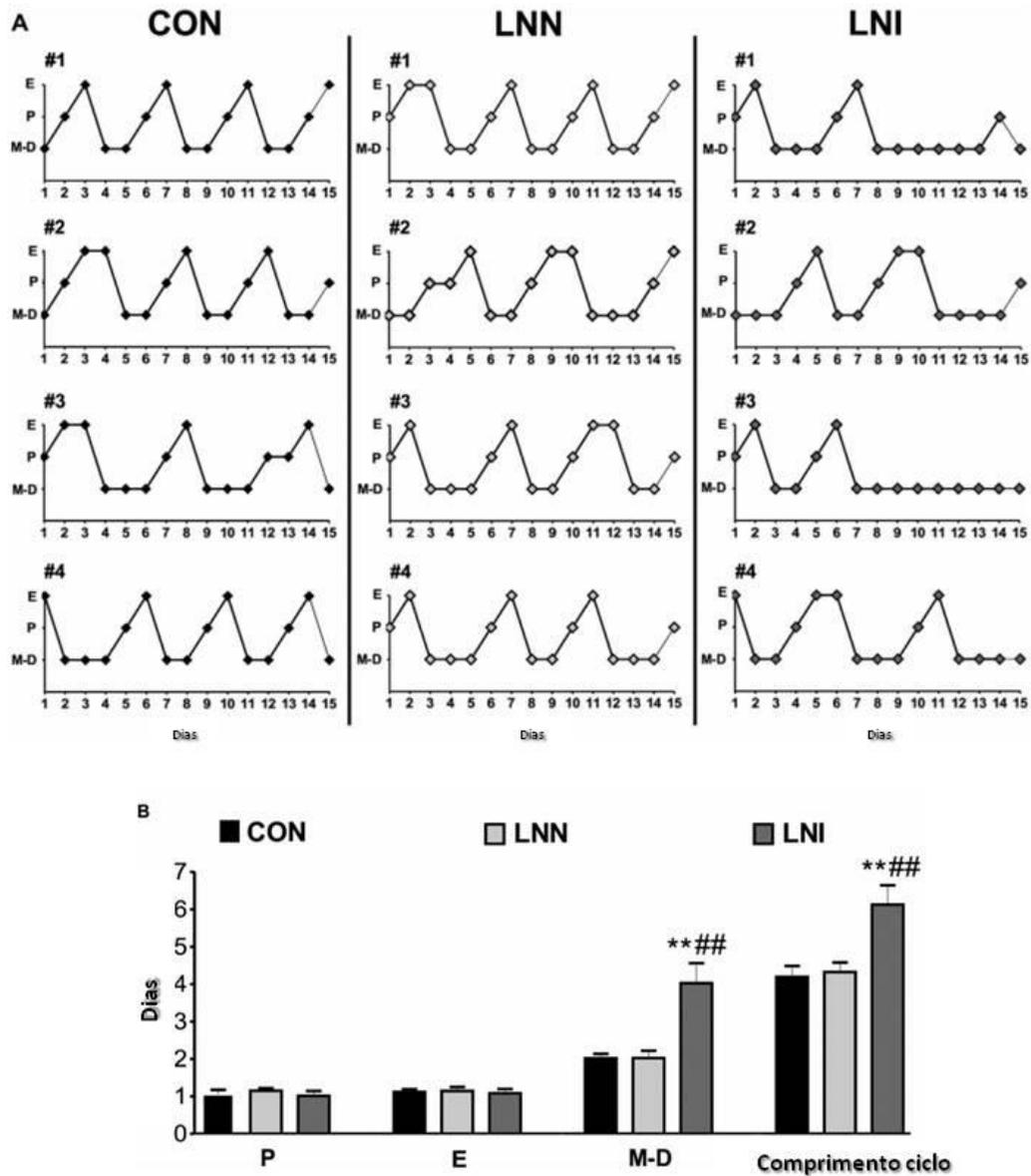


Figura 14: Avaliação do ciclo estral. (A) Ciclagem estral diária das ratas CON, LNN e LNI durante os 15 dias de tratamento. (B) Número de dias em cada fase do ciclo estral e a duração de cada ciclo ($n=10$). Proestro (P), Estro (E), Metaestro-Diestro (M-D). Valores expressos como Média \pm EPM. ** $p<0,01$ vs CON; ## $p<0,01$ vs LNN.

5.3 OTs aumentaram os níveis séricos de estrogênio, progesterona e testosterona

OTs não alteraram o peso da hipófise, assim como os níveis basais das gonadotrofinas LH e FSH (Figura 15A, 15B e 15C). Também não foi verificada diferença no peso dos ovários (Figura 15D) e dos úteros (Figura 15E) entre os três grupos de estudo. No entanto, apesar de não ocorrer modificação ovariana macroscópica, o grupo LNI demonstrou aumento nos níveis séricos de estrogênio (CON: $9,91 \pm 1,53$; LNN: $7,8 \pm 0,69$; LNI: $33,40 \pm 1,79$ pg/mL, $n=7$, $p < 0,001$) (Figura 15F), progesterona (CON: $4,91 \pm 0,30$; LNN: $4,12 \pm 0,42$; LNI: $6,94 \pm 0,69$ ng/mL, $n=7$, $p < 0,01$) (Figura 15G) e testosterona (CON: $0,155 \pm 0,010$; LNN: $0,149 \pm 0,008$; LNI: $0,195 \pm 0,004$ ng/mL, $n=7$, $p < 0,05$) (Figura 15H).

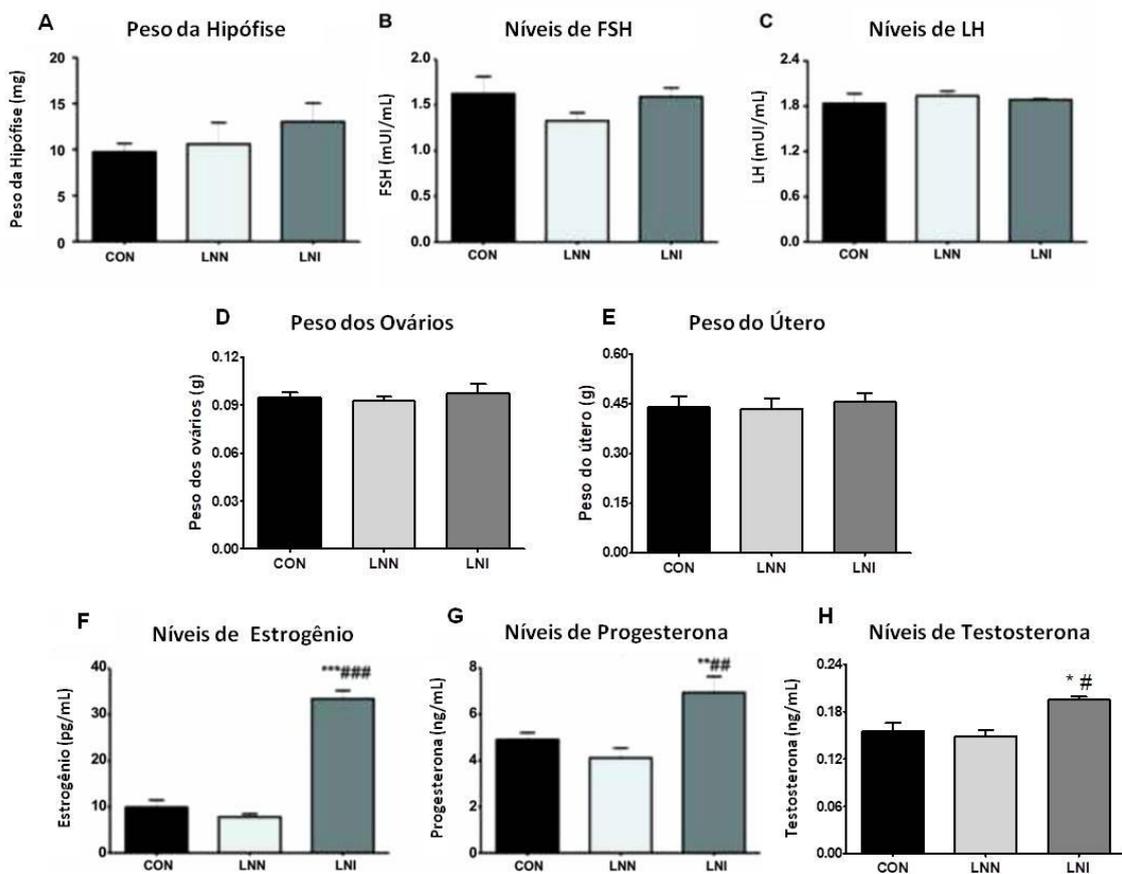


Figura 15: Análise de peso dos órgãos reprodutivos femininos e dos hormônios gonadotróficos e sexuais. (A) Peso da hipófise. (B) Níveis séricos de FSH e, (C) LH. (D) Peso dos ovários e (E) Peso do útero. (F) Níveis séricos de estrogênio, (G) progesterona e, (H) testosterona ($n=7$). Valores expressos como Média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs CON; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs LNN.

5.4 OTs induziram atresia ovariana, aumento de folículos primário, atrésico, císticos e de corpo lúteo, e maior deposição de fibras colágenas nos ovários

Além do prejuízo funcional ovariano, o grupo LNI também apresentou anormalidades morfológicas e distúrbio na foliculogênese (Figuras 16). Ovários dos grupos CON e LNN exibiram estrutura microscópica normal, com folículos preservados, oócito intacto, camadas celulares organizadas e dispostas uniformemente (Figura 16A – 16F), além de semelhança na proporção de folículos e corpos lúteos (Figura 16J – 16L). No entanto, foi observado nos ovários de ratas LNI aumento de 144% na presença de folículos císticos (CON: $1,21 \pm 0,11$; LNN: $1,15 \pm 0,06$; LNI: $2,93 \pm 0,22$ n°/mm², n=5, p<0,01) (dado não mostrado – imagem representativa na Figura 16G), folículo antral atrésico com oócito vacuolizado e com células apoptóticas na camada da granulosa e no espaço antral (Figura 16H), e células apoptóticas no corpo lúteo (Figura 16I).

Na análise do processo de formação, crescimento e maturação folicular, foi encontrado elevação no número de folículos primários no grupo LNI (CON: $1,14 \pm 0,11$; LNN: $1,18 \pm 0,08$; LNI: $1,8 \pm 0,13$ n°/mm², n=5, p<0,01) (Figura 16J), assim como de folículos atrésicos (CON: $0,75 \pm 0,10$; LNN: $0,97 \pm 0,18$; LNI: $1,67 \pm 0,30$ n°/mm², n=5, p<0,01) (Figura 16K) e corpos lúteos (CON: $0,81 \pm 0,09$; LNN: $0,96 \pm 0,13$; LNI: $1,27 \pm 0,13$ n°/mm², n=5, p<0,05) (Figura 16L). A contagem de folículos primordiais (CON: $1,64 \pm 0,14$; LNN: $1,62 \pm 0,13$; LNI: $1,88 \pm 0,12$ n°/mm², n=5), pré-antrais (CON: $0,93 \pm 0,11$; LNN: $0,77 \pm 0,14$; LNI: $0,82 \pm 0,17$ n°/mm², n=5) e antrais (CON: $0,91 \pm 0,10$; LNN: $0,91 \pm 0,16$; LNI: $1,16 \pm 0,12$ n°/mm², n=5) não diferiu entre os grupos (dados não mostrados).

Em adição à microscopia ovariana, fibras colágenas foram observadas ao redor dos folículos nos ovários de ratas LNI (Figura 16H), e com a análise da deposição de colágeno nos espaços corticais e medulares, realizada pela coloração de *Picrosírius red*, constatou-se aumento no grupo LNI (CON: $2,59 \pm 0,30$; LNN: $3,30 \pm 0,41$; LNI: $10,80 \pm 0,77\%$, n=5, p<0,01) (Figura 16M – 16P).

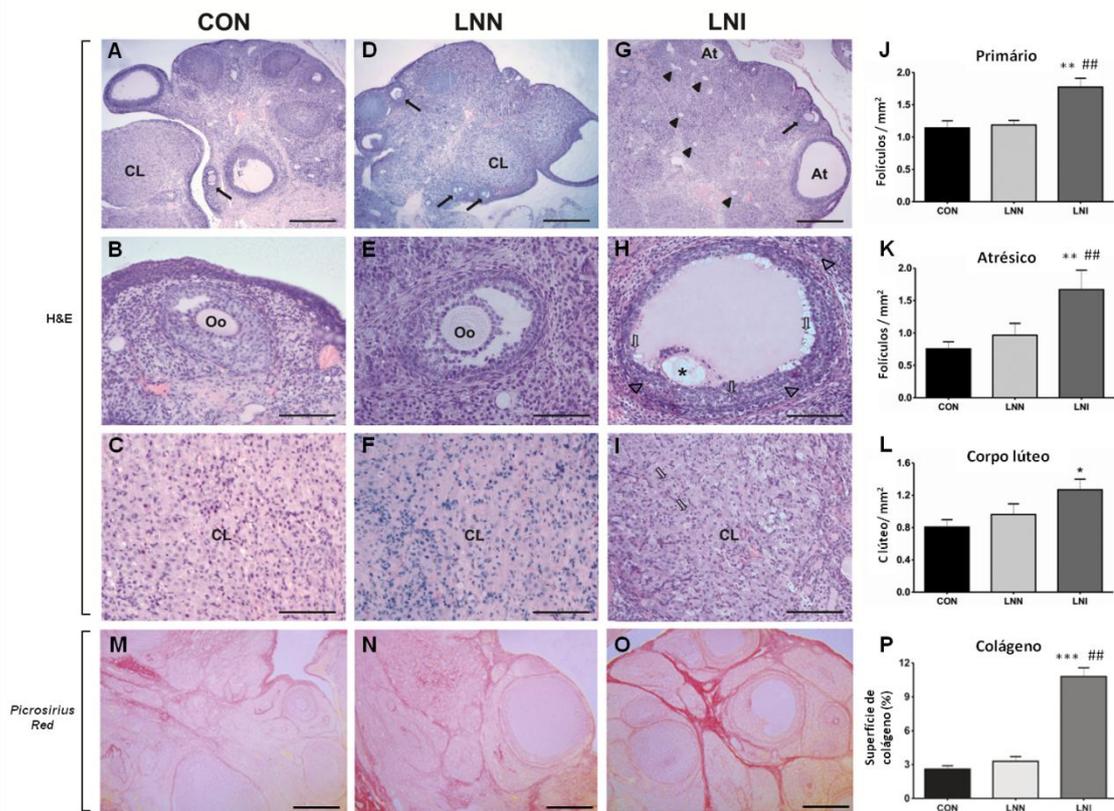


Figura 16: Análise histológica nos ovários, contagem dos folículos e corpo lúteo, e quantificação da deposição de colágeno. Seções ovarianas dos grupos CON (A, B, C), LNN (D, E, F) e LNI (G, H, I), coradas com H&E, demonstrando a organização das células, folículos e corpos lúteos. Quantificação dos folículos primário (J), atrésicos (K), e corpos lúteos (L) ovarianos expressos por unidade de área (n°/mm^2). Seções ovarianas coradas com *Picrosirius red* demonstrando a deposição de colágeno nos ovários de CON (M), LNN (N) e LNI (O) e a representação gráfica da quantificação (P) ($n=5$). Imagens A, D, G, M, N e O (barra: 400 μm); B, C, E, F, H e I (barra: 100 μm). CL: corpo lúteo; At: folículo atrésico; Oo: oócito intacto; seta preenchida: folículo antral; ponta de seta preenchida: folículo cístico; seta vazia: célula apoptótica; ponta de seta vazia: fibras colágenas; asterisco: oócito vacuolizado. Valores expressos como Média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs CON; ## $p < 0,01$ vs LNN.

5.5 OTs geram o espessamento e pontos de pseudoestratificação no epitélio luminal, inflamação e deposição de colágeno nos úteros

A análise microscópica uterina demonstrou diferenças entre os grupos CON, LNN e LNI (Figura 17A, 17B e 17C). No epitélio luminal dos úteros LNI, foi verificado espessamento (CON: $14,44 \pm 0,80$; LNN: $16,71 \pm 0,65$; LNI: $19,75 \pm 1,05$ μm ; $n=5$, $p < 0,05$) (Figura 17D) e

ponto de pseudoestratificação (Figura 17C1, seta). Não foi encontrada diferença nas espessuras do endométrio e miométrio (Figuras 17E e 17F). Foi observado a presença de células inflamatórias nos úteros LNI (Figura 17C, em destaque) e tal achado foi confirmado com análise bioquímica de MPO - que sugere presença de neutrófilos (CON: $0,296 \pm 0,038$; LNN: $0,263 \pm 0,043$; LNI: $0,507 \pm 0,078$ OD/mg tecido úmido, $n=6$, $p < 0,01$) (Figura 17G), de NAG - que sugere presença de macrófagos (CON: $0,335 \pm 0,048$; LNN: $0,273 \pm 0,024$; LNI: $0,698 \pm 0,099$ OD/mg tecido úmido, $n=6$, $p < 0,01$) (Figura 17H), e pela coloração de *Alcian blue* - que detecta mastócitos (CON: $0,758 \pm 0,110$; LNN: $0,749 \pm 0,053$; LNI: $1,107 \pm 0,060$ células/mm², $n=6$, $p < 0,05$) (Figuras 17I - 17L). Pela coloração de *Picrosírius red*, foi verificado o aumento da superfície de fibras colágenas nos úteros LNI (CON: $2,903 \pm 0,159$; LNN: $2,656 \pm 0,116$; LNI: $4,392 \pm 0,120$ %, $n=6$, $p < 0,001$) (Figuras 17M - 17P).

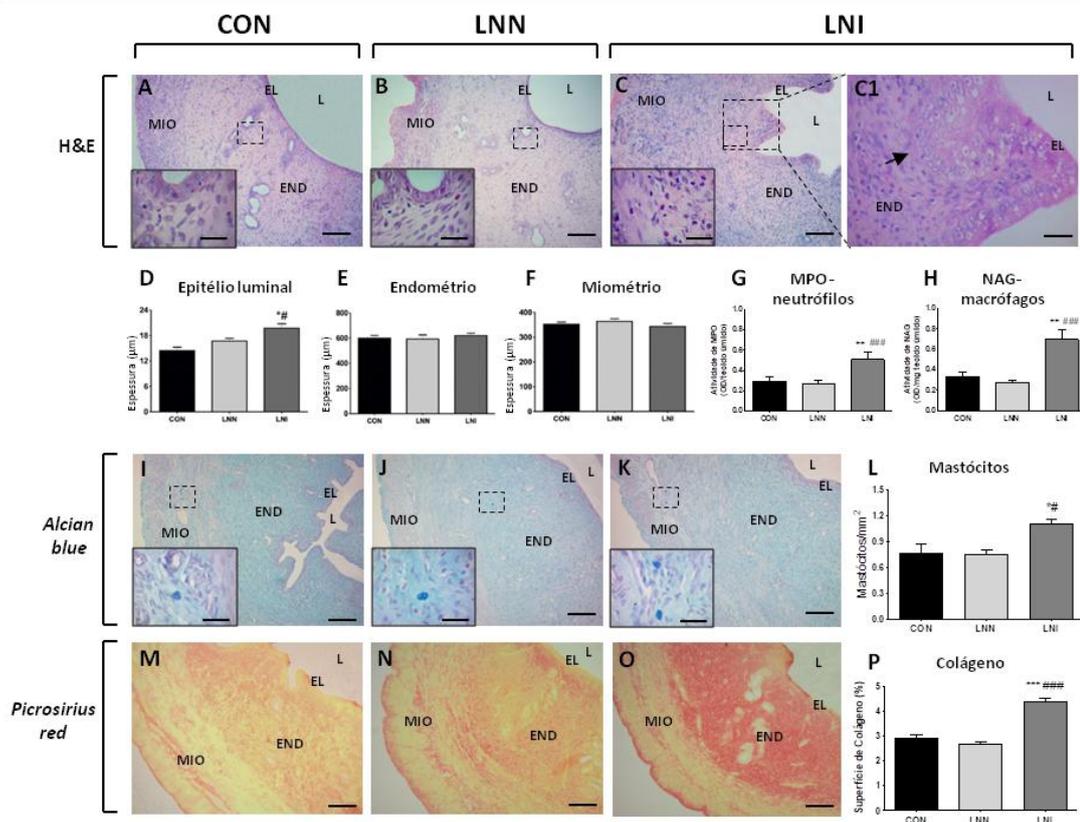


Figura 17: Histomorfometria uterina, detecção de células inflamatórias e quantificação da deposição de colágeno nos úteros. Seções uterinas dos grupos CON (A), LNN (B) e LNI (C e C1), coradas com H&E, demonstrando as camadas uterinas, a presença de células inflamatórias (em destaque) e epitélio luminal com pseudoestratificação (seta, C1). Morfometria do epitélio luminal (D), endométrio (E) e miométrio (F) ($n=5$). Atividade de MPO (G) e NAG (H) no útero ($n=6$). Seções uterinas coradas com *Alcian blue* demonstrando mastócitos nos grupos CON (I), LNN (J) e LNI (K) e a representação gráfica da quantificação (L) ($n=6$). Cortes corados com *Picrosírius red* demonstrando a deposição de fibras

colágenas nos úteros de CON (M), LNN (N) e LNI (O) e a representação gráfica da quantificação (P) (n=6). Imagens A, B, C, I, J, K, M, N, O (barra: 100 μ m); C1 (barra: 25 μ m); fotos em destaque (barra: 20 μ m). L: lumen; EL: epitélio luminal; END: endométrio; MIO: miométrio; MPO: mieloperoxidase; NAG: N-acetil- β -D-glicosaminidase. Valores expressos como Média \pm EPM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs CON; #p<0,05, ###p<0,001 vs LNN.

5.6 OTs aumentaram a expressão do ER α no útero

Não houve diferença na expressão dos ER α (Figura 18A) e ER β (Figura 18C) nos ovários, assim como do ER β (Figura 18D) e PR (Figura 18E) no útero. No entanto, úteros LNI exibiram aumento de 30% na expressão do ER α (CON: 1,00 \pm 0,02; LNN: 1,03 \pm 0,07; LNI: 1,34 \pm 0,15, n=5, p<0,05) (Figura 18B).

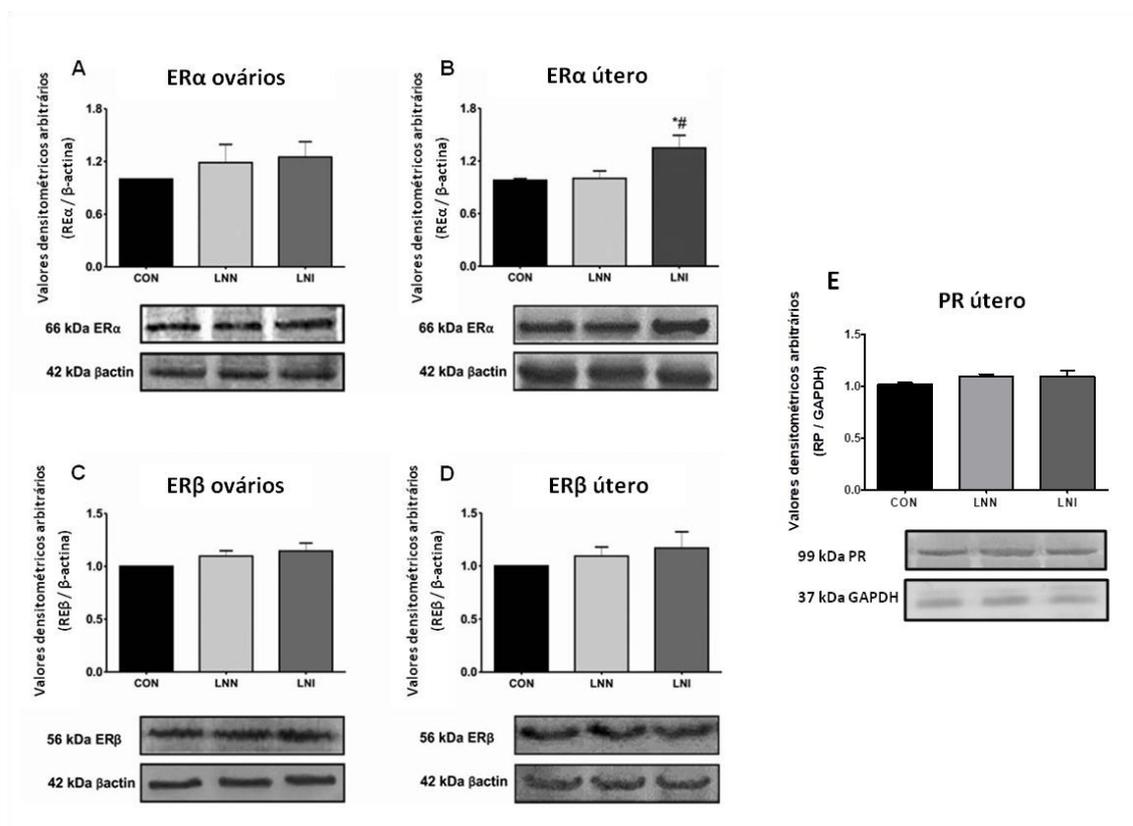


Figura 18: Análise proteica por western blot dos receptores de estrogênio e progesterona. (A) ER α nos ovários. (B) ER α no útero. (C) ER β nos ovários. (D) ER β no útero. (E) PR no útero (n=5). ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona. Valores expressos como Média \pm EPM. *p<0,05 vs CON; #p<0,05 vs LNN.

5.7 OTs promoveram dislipidemia e o aumento da deposição de triglicerídeos e colesterol total no fígado das ratas grávidas

Não foi encontrada alteração no ganho de peso corporal das ratas adultas ao longo dos 15 dias de tratamento e das grávidas, desde a alocação com machos para o acasalamento até o 20º DG, quando foi realizada a cesariana (Figura 19A). Neste acompanhamento, foi verificado maior extensão da curva do peso corporal das grávidas LNI, embora os pesos não sejam diferentes. Isso ocorreu porque a gestação no grupo LNI foi definida posteriormente. O tempo entre a alocação com machos e o 20º DG nas fêmeas CON foi de $23,667 \pm 2,186$ dias ($n=7$) e nas ratas LNN, $22,000 \pm 1,000$ dias ($n=7$). Em contrapartida, este tempo nas fêmeas LNI foi de $44,250 \pm 5,250$ dias ($p < 0,05$, $n=7$) (Figura 19A).

Na avaliação do perfil glicêmico, por meio do TSI e TTG, não foi verificada alteração no metabolismo da glicose entre os grupos, ao longo dos 120 minutos de avaliação do TSI nas ratas adultas (Figura 19B) e grávidas (Figura 19D), assim como nos 90 minutos do TTG nas ratas adultas (Figura 19C) e grávidas (Figura 19E).

Não foi encontrada alteração na adiposidade (soma dos pesos dos tecidos adiposos parametrial, abdominal, retroperitoneal e perirrenal) nas ratas adultas (Figura 19F) e grávidas (Figura 19H), assim como no peso do fígado das adultas (Figura 19G) e das grávidas (Figura 19I). Na avaliação dos níveis lipídicos séricos, não foi encontrada diferença nos níveis de triglicerídeos e colesterol total nas ratas adultas (Figuras 19J e 19K, respectivamente). No entanto, além do aumento normal destes lipídios nas ratas grávidas, a elevação nas ratas LNI foi superior à dos demais grupos, tanto para os níveis séricos de triglicerídeos (CON: $531,340 \pm 40,409$; LNN: $496,026 \pm 85,764$; LNI: $853,642 \pm 114,964$ mg/dL, $p < 0,05$, $n=7$) (Figura 19L), quanto para o colesterol total (CON: $96,544 \pm 1,325$; LNN: $96,341 \pm 3,966$; LNI: $116,858 \pm 4,452$ mg/dL, $p < 0,05$, $n=7$) (Figura 19M). Na avaliação histológica do fígado, que realiza a metabolização dos lipídios, foi observada organização e padrão celular normais próximo a veia centrolobular nos grupos CON e LNN das ratas adultas (Figura 19N e Figura 19O, respectivamente), assim como das grávidas CON (Figura 19R) e LNN (Figura 19S). No entanto, nas adultas LNI, foi detectado infiltrado inflamatório próximo a veia centrolobular (Figura 19P) e granuloma próximo ao espaço-porta (Figura 19Q). Já nas grávidas LNI, além das células inflamatórias, também foi verificado deposição lipídica bem evidente, caracterizada por vacúolos redondos, de limites nítidos e tamanhos variáveis (Figura 19T e Figura 19U).

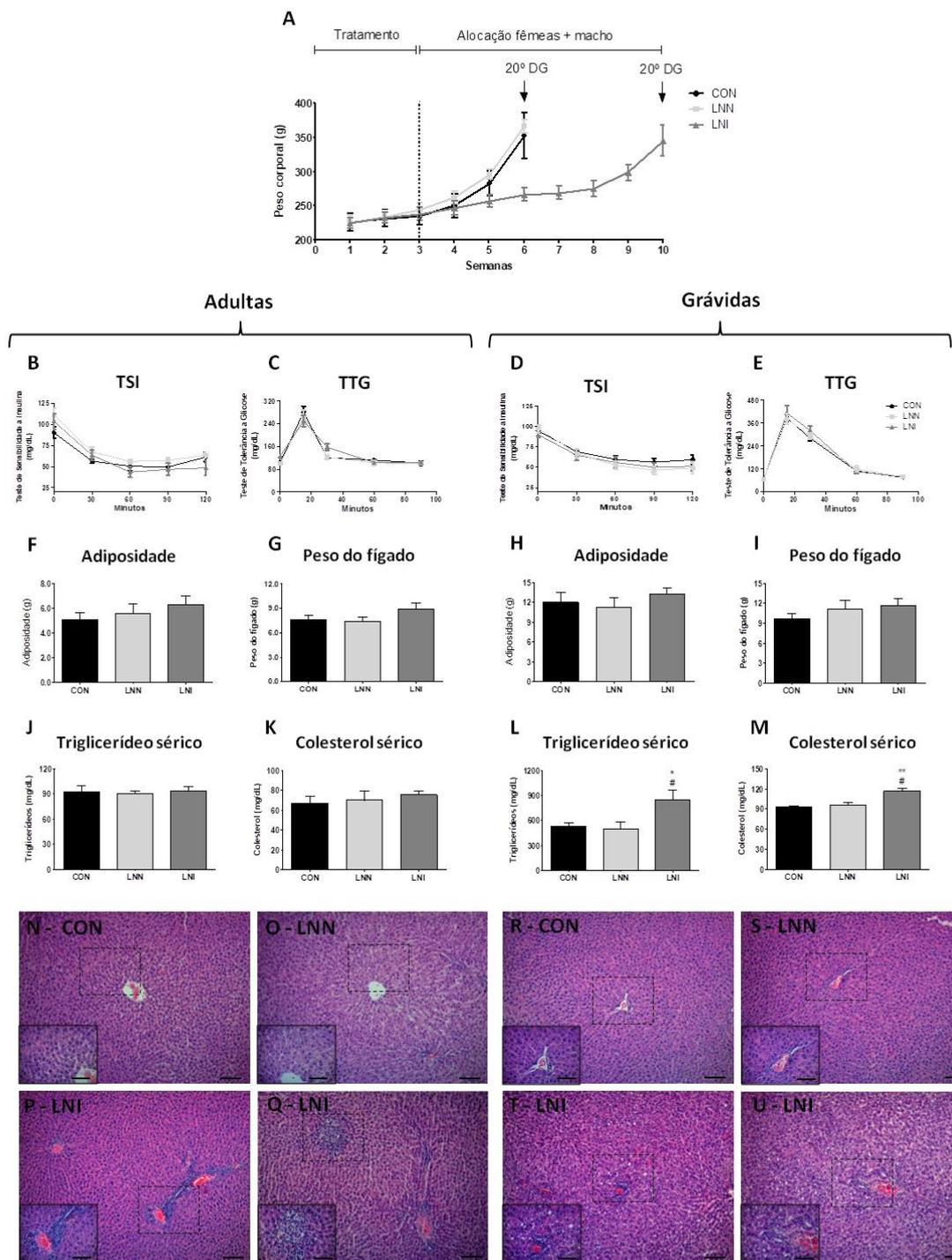


Figura 19: Análise de ganho de peso corporal e perfis glicêmicos e lipídicos das ratas adultas e grávidas. (A) Peso corporal das adultas e grávidas (até o 20º DG). (B) TSI das adultas. (C) TTG das adultas. (D) TSI das grávidas. (E) TTG das grávidas. (F) Adiposidade das adultas. (G) Peso do fígado das adultas. (H) Adiposidade das grávidas. (I) Peso do fígado das grávidas. (J) Triglicerídeos das adultas. (K) Colesterol total das adultas. (L) Triglicerídeos das grávidas. (M) Colesterol total das grávidas. Seções coradas com H&E do fígado das adultas CON (N), LNN (O) e LNI (P-Q), e das grávidas CON (R), LNN (S) e LNI

(T-U) (n=7). Imagens N-U (barra: 100 μ m); imagens em destaque (barra: 50 μ m). TSI: teste de sensibilidade insulínica; TTG: teste de tolerância à glicose. Valores expressos como Média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs CON; # $p < 0,05$ vs LNN.

5.8 OTs reduziram a frequência de ninhadas

Redução na frequência de ninhadas durante 120 dias foi observada em ratas LNI (CON: $2,667 \pm 0,211$; LNN: $2,750 \pm 0,250$; LNI: $1,333 \pm 0,333$ ninhadas, n=6, $p < 0,05$) (Figuras 20A e 20B), sem alteração na média de filhotes por ninhada (Figura 20C).

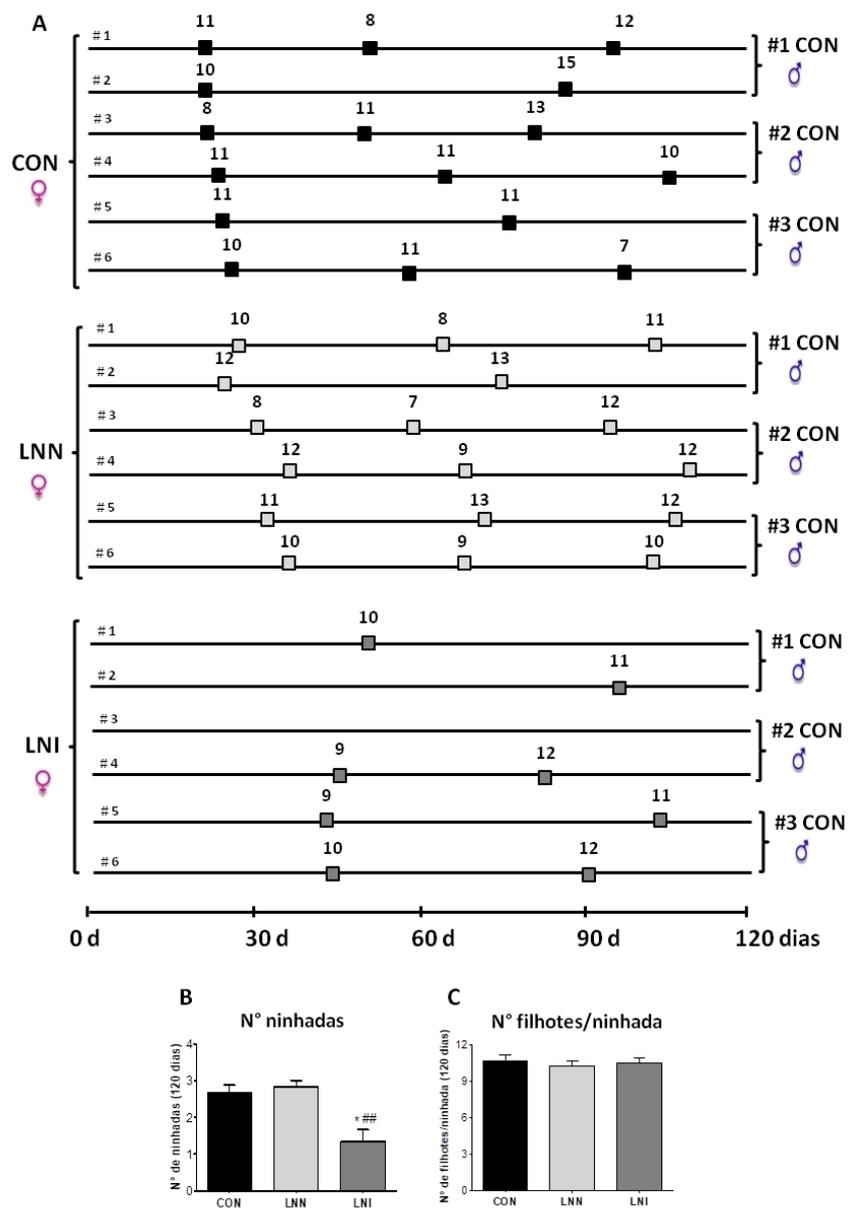


Figura 20: Avaliação da fertilidade ao longo de 120 dias. (A) Representação esquemática temporal da ocorrência de ninhadas (quadrados) e o número de filhotes (números acima dos quadrados). (B) Número de ninhadas em 120 dias. (C) Número de

filhotes por ninhada (n=6). Valores expressos como Média \pm EPM. *p<0,05 vs CON; ##p<0,01 vs LNN.

5.9 OTs reduziram o n° de implantações embrionárias e, assim, aumentaram a % de perdas pré-implantação

Após a cesariana no 20º DG, foi observado similaridade no número de corpos lúteos gravídicos nos grupos CON, LNN e LNI (Figura 21E). No entanto, foi verificada menor quantidade de implantações embrionárias nas ratas LNI, após coloração pelo método de Salewski e visualização de pontos negros bem evidentes nos úteros (CON: 12,500 \pm 0,435; LNN: 12,750 \pm 0,479; LNI: 10,333 \pm 0,541 implantações, n=7-8, p<0,05) (Figuras 21A, 21B, 21C e 21D). Foi calculada a porcentagem de perdas pré-implantação (correlaciona o n° de corpos lúteos gravídicos e n° de implantações embrionárias) e foi achado aumento de 208 % nas grávidas LNI (CON: 4,776 \pm 1,200; LNN: 2,220 \pm 2,220; LNI: 14,756 \pm 3,316 %, n=7-8, p<0,05) (Figura 21G). A quantidade de filhotes na 1ª ninhada não diferiu (Figura 21F). Foi calculada a porcentagem de perdas pós-implantação (correlaciona o n° de implantações embrionárias e o n° de filhotes na 1ª ninhada) e não foi observada diferença entre os grupos CON, LNN e LNI (Figura 21H).

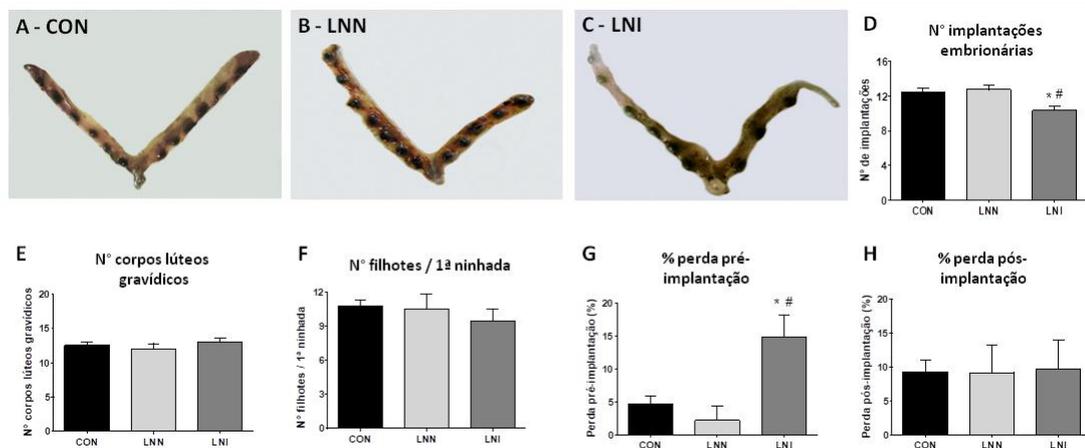


Figura 21: Avaliação da implantação embrionária. Imagens representativas dos úteros, após coloração pelo método de Salewski, com os sítios de implantação embrionária (estrutura circular preta) do CON (A), LNN (B) e LNI (C). Parâmetros gestacionais: n° de implantações embrionárias (D), n° de corpos lúteos gravídicos (E) e n° filhotes da 1ª ninhada (F). Com a realização de cálculos, obtivemos a % de perdas pré-implantação (G) e pós-implantação embrionária (H) (n=7-8). Valores expressos como Média \pm EPM. *p<0,05 vs CON; #p<0,05 vs LNN.

5.10 Caracterização placentária: OTs induziram aumento do peso, da deposição e transporte de glicose e lipídios, e de inflamação na placenta

Na análise macroscópica, foi observado aumento do tamanho e do peso das placentas LNI (CON: $0,853 \pm 0,013$; LNN: $0,821 \pm 0,029$; LNI: $0,923 \pm 0,038$ g, $n=8$, $p<0,05$) (Figuras 22A, 22B, 22C e 22D). Na avaliação histológica, CON e LNN apresentaram as camadas placentárias arranjadas de forma uniforme e regular (Figuras 22E e 22F). Em contrapartida, as placentas LNI exibiram desorganização celular na zona basal, com células gigantes trofoblásticas dispersas pela camada, e também maior quantidade de células de glicogênio (Figura 22G), o que foi confirmado pela quantificação (CON: $1,219 \pm 0,077$; LNN: $1,221 \pm 0,088$; LNI: $2,329 \pm 0,147$ %, $n=6$, $p<0,001$) (Figura 22H). Esta maior porcentagem de células de glicogênio foi devido o aumento do fornecimento de glicose à placenta, realizado pelo GLUT1, cuja expressão proteica mostrou-se elevada nas placentas LNI (CON: $0,859 \pm 0,057$; LNN: $0,865 \pm 0,060$; LNI: $1,074 \pm 0,053$, $n=5$, $p<0,05$) (Figura 22I). Além disso, a transferência de glicose ao feto também foi aumentada, uma vez que foi registrada maior glicemia no cordão umbilical das placentas LNI (CON: $41,200 \pm 1,781$; LNN: $40,917 \pm 1,438$; LNI: $49,133 \pm 2,182$ mg/dL, $n=8$, $p<0,05$) (Figura 22J).

Além da deposição de glicose na forma de glicogênio, placentas LNI apresentaram aumento da concentração de lipídios, como triglicerídeos (CON: $203,901 \pm 4,932$; LNN: $195,597 \pm 13,284$; LNI: $248,029 \pm 12,275$ mg/dL, $n=7$, $p<0,05$) (Figura 22K) e colesterol total (CON: $58,102 \pm 5,126$; LNN: $64,262 \pm 3,275$; LNI: $74,882 \pm 1,230$ mg/dL, $n=7$, $p<0,05$) (Figura 22M). A expressão do transportador de ácidos graxos ACSVL4 não diferiu entre os grupos (Figura 22L), no entanto, o colesterol foi fornecido em maior proporção aos fetos, como verificado pelo aumento do colesterol total no sangue do cordão umbilical (CON: $17,974 \pm 2,511$; LNN: $18,818 \pm 0,775$; LNI: $26,984 \pm 2,166$ mg/dL, $n=8$, $p<0,05$) (Figura 22N). Placentas LNI também exibiram processo inflamatório, com aumento na detecção de neutrófilos (CON: $2,332 \pm 0,552$; LNN: $2,922 \pm 0,203$; LNI: $5,562 \pm 0,667$ OD/mg tecido úmido, $n=7$, $p<0,01$) (Figura 22O) e de macrófagos (CON: $1,149 \pm 0,072$; LNN: $1,390 \pm 0,096$; LNI: $1,920 \pm 0,123$ OD/mg tecido úmido, $n=7$, $p<0,001$) (Figura 22P). No entanto, não houve alteração nos níveis de GSH (Figura 22Q) e TBARS (Figura 22R).

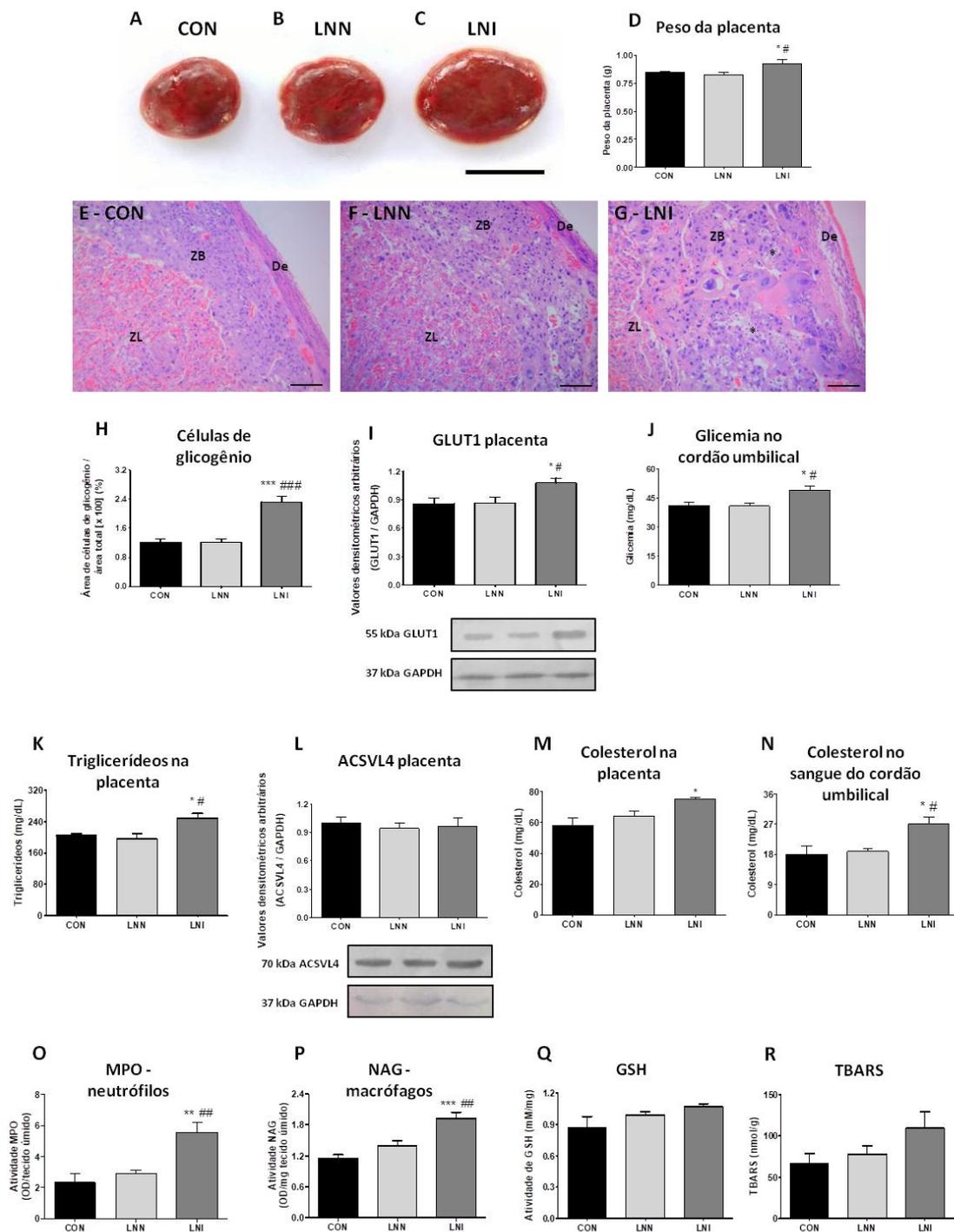


Figura 22: Caracterização placentária. Anatomia das placentas de CON (A), LNN (B) e LNI (C), com os respectivos pesos (D), obtidas no 20^o DG (n=8). Seções de placenta dos grupos CON (E), LNN (F) e LNI (G), coradas com H&E, demonstrando as camadas placentárias (ZL, ZB e De) e as células de glicogênio (asterisco), que foram quantificadas (H) (n=6). (I) Expressão de GLUT1 na placenta, por *Western blot* (n=5). (J) Dosagem de glicose no sangue do cordão umbilical (n=8). (K) Triglicerídeos na placenta (n=7). (L) Expressão do ACSVL4 na placenta, por *Western blot* (n=5). Dosagem de colesterol total na placenta (M) (n=7) e no sangue do cordão umbilical (N) (n=8). Atividade de MPO (O) e NAG

(P), e de marcadores de estresse oxidativo GSH (Q) e TBARS (R) (n=7). Imagens A, B e C (barra: 1 cm); imagens E, F e G (barra: 100 μ m). De: decídua; ZB: zona basal; ZL: zona labiríntica; GLUT1: transportador de glicose tipo 1; ACSVL4: acil-CoA sintetase da família de cadeia muito longa tipo 4; MPO: mieloperoxidase; NAG: N-acetil- β -D-glicosaminidase; GSH: glutationa reduzida; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Valores expressos como Média \pm EPM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs CON; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 vs LNN.

5.11 OTs induziram maior expressão placentária do IR β , p-Akt e p-mTOR

Placentas LNI apresentaram maior expressão de IR β (CON: 0,91 \pm 0,08; LNN: 0,91 \pm 0,11; LNI: 1,34 \pm 0,11, n=5, p<0,05) (Figura 23A), p-Akt (CON: 1,00 \pm 0,07; LNN: 0,93 \pm 0,08; LNI: 1,29 \pm 0,05, n=5, p<0,05) (Figura 23B) e p-mTOR (CON: 1,00 \pm 0,09; LNN: 1,22 \pm 0,06; LNI: 1,61 \pm 0,07, n=5, p<0,05) (Figura 23D), sem exibir alteração de Akt (Figura 23B), p-ERK 1/2, ERK 1/2 (Figura 23C) e mTOR (Figura 23D).

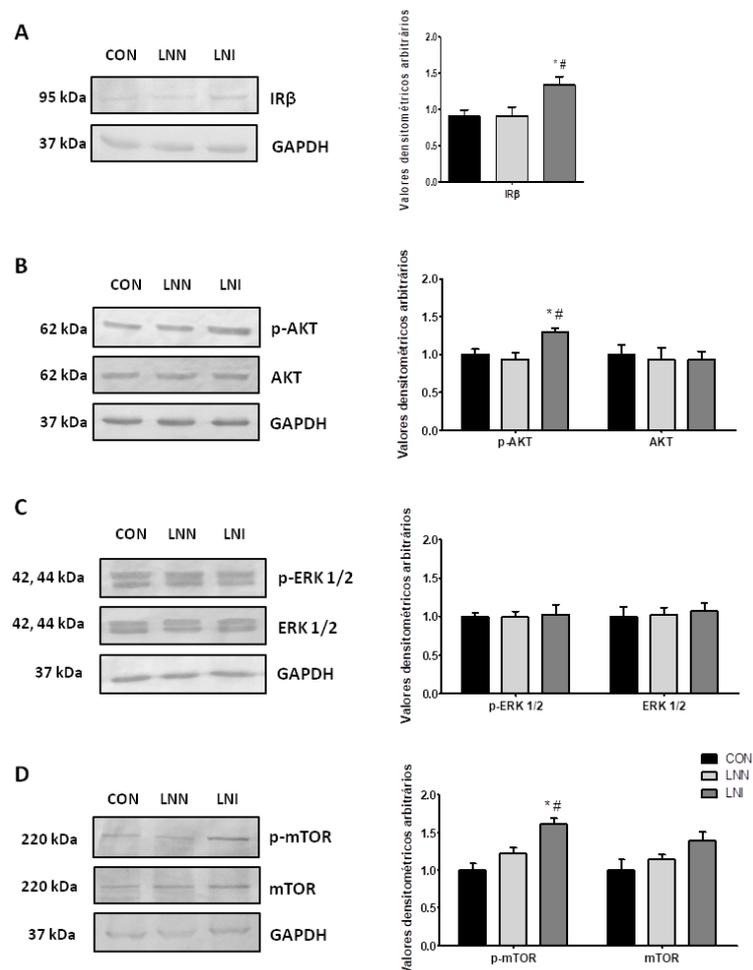


Figura 23: Análise proteica por western blot de proteínas regulatórias via IR/mTOR na placenta. Expressão do IR β (A), p-Akt e Akt (B), p-ERK 1/2 e ERK 1/2 (C), p-mTOR e mTOR (D) (n=5). IR β : receptor de insulina beta; Akt: proteína quinase B; p-Akt: Akt

fosforilada; ERK 1/2: quinase regulada por sinal extracelular; p-ERK 1/2: ERK 1/2 fosforilada; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; p-mTOR: mTOR fosforilada; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; kDa: quilodalton. Valores expressos como Média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs CON; # $p < 0,05$ vs LNN.

5.12 Exposição materna pré-gestacional aos OTs gerou aumento no peso e comprimento corporal de fetos

Após a retirada dos fetos, foi feita a determinação do sexo dos animais pela medida da distância anogenital. Não houve diferença entre as porcentagens de fetos fêmeas e machos entre os grupos (Tabela 2). Fetos fêmeas LNI apresentaram aumento do peso corporal (CON: $3,47 \pm 0,06$; LNN: $3,31 \pm 0,06$; LNI: $3,702 \pm 0,06$ g, $n=20$, $p < 0,05$), assim como os fetos machos LNI (CON: $3,69 \pm 0,06$; LNN: $3,50 \pm 0,01$; LNI: $3,95 \pm 0,05$ g, $n=20$, $p < 0,01$), que também apresentaram maior comprimento corporal (CON: $3,66 \pm 0,02$; LNN: $3,65 \pm 0,03$; LNI: $3,78 \pm 0,03$ cm, $n=20$, $p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2: % de fêmeas/machos e dados antropométricos dos fetos

Grupos / parâmetros	Fetos fêmeas			Fetos machos		
	CON	LNN	LNI	CON	LNN	LNI
Gênero (%)	47,22 \pm 2,78	49,13 \pm 3,39	38,88 \pm 5,55	52,77 \pm 2,77	50,86 \pm 3,41	61,11 \pm 5,55
Peso corporal (g)	3,47 \pm 0,06	3,31 \pm 0,06	3,70 \pm 0,06*#	3,69 \pm 0,06	3,50 \pm 0,01	3,95 \pm 0,05**##
Comprimento corporal (cm)	3,55 \pm 0,03	3,60 \pm 0,03	3,61 \pm 0,03	3,66 \pm 0,02	3,65 \pm 0,03	3,78 \pm 0,03*#

Valores expressos como Média \pm EPM ($n=20$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs CON; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs LNN.

5.13 Exposição materna pré-gestacional aos OTs promoveu inflamação e aumento de megacariócitos hepáticos

Na avaliação histológica do fígado dos fetos, foi observado muitas células inflamatórias próximo à veia centrolobular e aumento de megacariócitos tanto nas fêmeas LNI (CON: $0,002 \pm 0,0002$; LNN: $0,002 \pm 0,0001$; LNI: $0,004 \pm 0,0002$ células/mm², $n=8$, $p < 0,001$) (Figura 24D) quanto nos machos LNI (CON: $0,001 \pm 0,0001$; LNN: $0,001 \pm 0,0001$; LNI: $0,002 \pm 0,0002$ células/mm², $n=8$, $p < 0,05$) (Figura 24I), sem alteração nos pesos dos fígados (Figuras 24E e 24J).

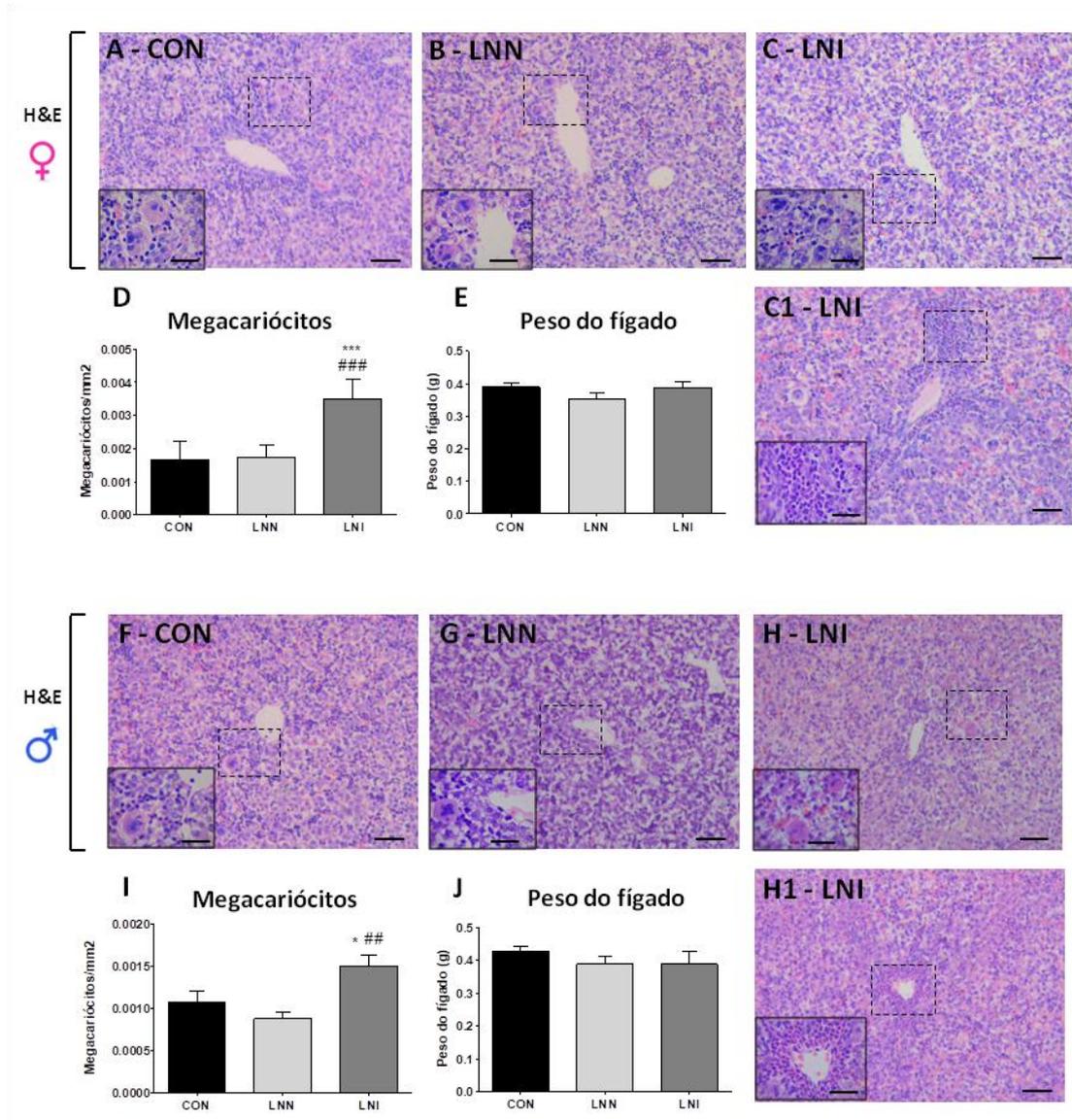


Figura 24: Análise histológica dos fígados dos fetos. Seções de fígado dos fetos fêmeas CON (A), LNN (B) e LNI (C e C1), coradas com H&E, demonstrando a organização celular próxima a veia centrolobular, a presença de megacariócitos (em destaque), que foram quantificados (D), e infiltrado inflamatório no grupo LNI (C1). Peso do fígado das fêmeas (E). Seções de fígado dos fetos machos CON (F), LNN (G) e LNI (H e H1) demonstrando a organização celular próxima a veia centrolobular, a presença de megacariócitos (em destaque), que foram quantificados (I), e infiltrado inflamatório no grupo LNI (H1). Peso do fígado dos machos (J) (n=8). Imagens A, B, C, C1, F, G, H, H1 (barra: 50 μ m); imagens em destaque (barra: 20 μ m). H&E: hematoxilina e eosina; ♀: fêmeas; ♂: machos. Valores expressos como Média \pm EPM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs CON; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs LNN.

5.14 Exposição materna pré-gestacional aos OTs gerou deposição lipídica e estresse oxidativo no fígado dos fetos

Na avaliação dos fígados de fetos fêmeas, não foi observada diferença na acumulação de gotículas lipídicas, após a coloração com *Oil red O* (Figuras 25A, 25B, 25C e 25D). No entanto, foi encontrado aumento nas concentrações de triglicerídeos (CON: 204,685±21,560; LNN: 232,468±51,809; LNI: 397,059±21,731 mg/dL, n=6, p<0,05) (Figura 25E) e de colesterol total hepático (CON: 44,051±2,090; LNN: 40,895±4,661; LNI: 62,550±7,063 mg/dL, n=6, p<0,05) (Figura 25F). Não houve alteração na expressão do PPAR γ nos fígados de fêmeas CON, LNN e LNI.

Na avaliação dos fígados de fetos machos, foi registrado maior acumulação de gotículas lipídicas no grupo LNI, após a coloração com *Oil red O* (CON: 0,060±0,006; LNN: 0,071±0,008; LNI: 0,099±0,010 $\mu\text{m}^2/\text{área total}$, n=6, p<0,05) (Figura 25M). Além disso, foi encontrado aumento nas concentrações de triglicerídeos hepático (CON: 236,0,36±23,708; LNN: 252,432±9,248; LNI: 365,495±21,452 mg/dL, n=6, p<0,01) (Figura 25N), sem modificação nos níveis de colesterol total hepático (Figura 25O). A expressão de PPAR γ nos fígados dos machos LNI também mostrou-se elevada (CON: 1,00±0,03; LNN: 1,07±0,17; LNI: 1,49±0,16, n=4, p<0,05) (Figura 25P).

Quanto à análise de danos oxidativos hepáticos, foi observado aumento deste parâmetro em ambos os gêneros do grupo LNI. Nos fetos fêmeas, foi registrado redução de GSH hepática, que previne a peroxidação lipídica, em LNI (CON: 1,386±0,061; LNN: 1,320±0,030; LNI: 1,165±0,030 mM/mg, n=7, p<0,05) (Figura 25H), e aumento dos níveis de TBARS em LNI (CON: 343,633±33,376; LNN: 344,360±33,123; LNI: 414,830±67,214 nmol/g, n=7, p<0,05) (Figura 25I). Nos fetos machos, foi encontrado um perfil semelhante, com redução de GSH hepática em LNI (CON: 1,366±0,048; LNN: 1,211±0,045; LNI: 1,134±0,089 mM/mg, n=7, p<0,05) (Figura 25Q), e elevação da concentração de TBARS em LNI (371,867±25,686; LNN: 373,416±21,489; LNI: 492,636±38,689 nmol/g, n=7, p<0,05) (Figura 25R).

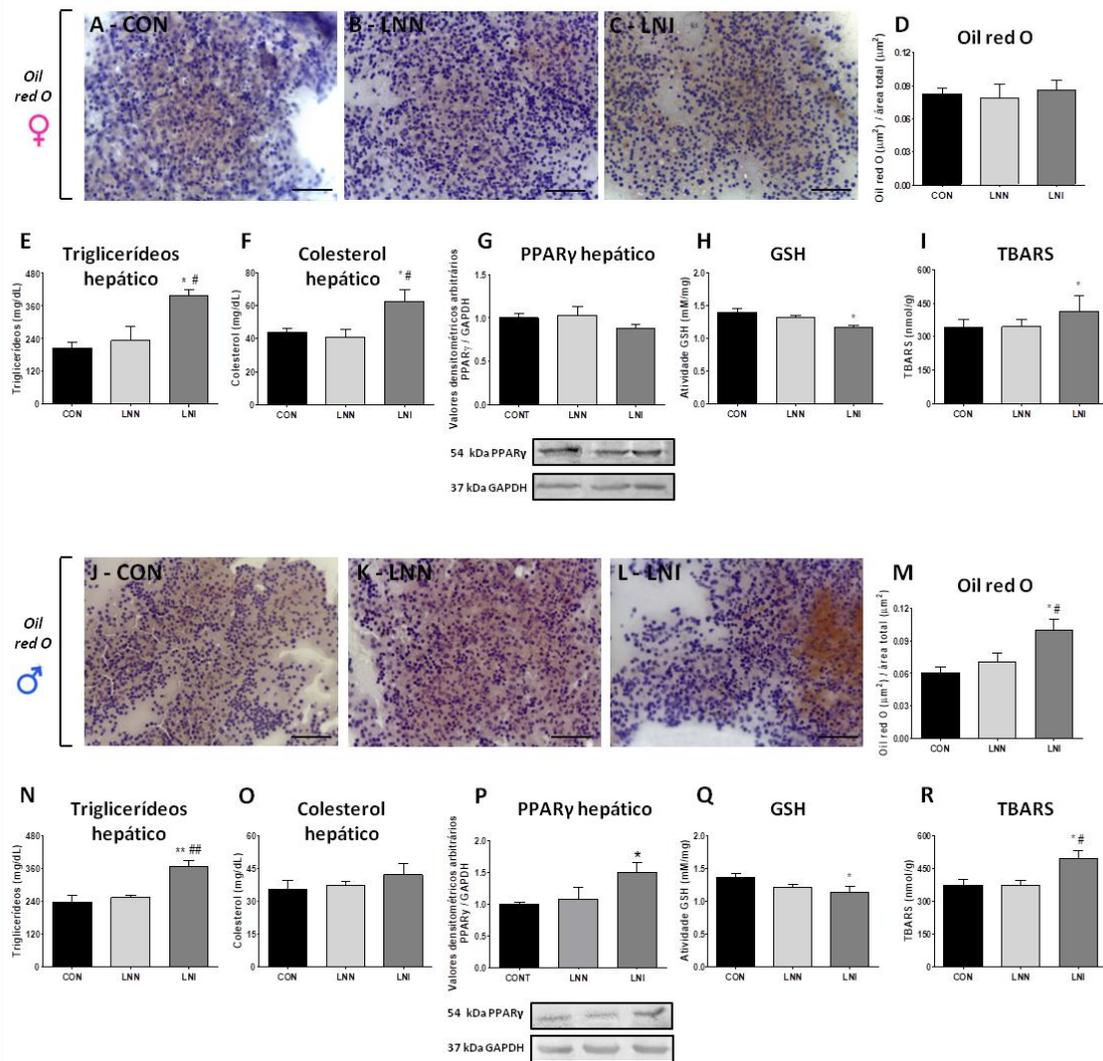


Figura 25: Análise da deposição lipídica e estresse oxidativo nos fígados dos fetos.

Seções de fígado dos fetos fêmeas CON (A), LNN (B) e LNI (C), coradas com *Oil red O*, e a quantificação das gotículas lipídicas (D) (n=6). Dosagens hepáticas de triglicerídeos (E) e colesterol total (F) no fígado das fêmeas (n=6). Expressão de PPAR γ (G) (n=4). Marcadores de estresse oxidativo GSH (H) e TBARS (I) no fígado das fêmeas (n=7). Seções de fígado dos fetos machos CON (J), LNN (K) e LNI (L), coradas com *Oil red O*, e a quantificação das gotículas lipídicas (M) (n=6). Dosagens hepáticas de triglicerídeos (N) e colesterol total (O) no fígado dos machos (n=6). Expressão de PPAR γ (P) (n=4). Marcadores de estresse oxidativo GSH (Q) e TBARS (R) no fígado dos machos (n=7). PPAR γ : receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; GSH: glutationa reduzida; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Imagens A, B, C, J, K, L (barra: 50 μ m). ♀: fêmeas; ♂: machos. Valores expressos como Média \pm EPM. *p<0,05, **p<0,01 vs CON; #p<0,05, ##p<0,01 vs LNN.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, encontramos evidências de que a ingestão de moluscos contaminados com OTs promove o comprometimento dos órgãos reprodutivos e da fertilidade de ratas, com reflexos negativos sobre o período gestacional e os fetos da geração F1. A transferência dos OTs dos gastrópodes aos roedores resultou no desenvolvimento de irregularidade no ciclo estral, elevação nos níveis sérios dos hormônios sexuais, degeneração ovariana e inflamação uterina. Estes danos refletiram diretamente em prejuízos à implantação embrionária e a quantidade de ninhadas. A exposição pré-gestacional aos OTs gerou dislipidemia nas grávidas, além de inflamação e acúmulo de lipídios na placenta, com maior expressão placentária de GLUT1 e das proteínas reguladoras dos transportadores de nutrientes, resultando em aumento do fluxo de glicose e também de colesterol no cordão umbilical. Em consequência, os fetos, de ambos os gêneros, responderam à desregulação materna com elevação do peso corporal e aumento de lipídios e estresse oxidativo hepáticos.

Agentes químicos que perturbam o sistema endócrino receberam bastante relevância nos últimos anos, uma vez que as exposições durante períodos críticos de desenvolvimento geram disfunções relacionadas com o estado metabólico, a reprodução, e muitos outros sistemas e/ou órgãos, e com isso, promovem o surgimento, em animais, de protótipos de doenças humanas. No entanto, pouco desta pesquisa projetou-se para a toxicologia dos OTs, por meio do modelo de contaminação dos moluscos e posterior ingestão por mamíferos, e um subconjunto ainda menor tem se concentrado na toxicologia reprodutiva-gestacional. Este estudo nos possibilitou revelar que os OTs, acumulados em gastrópodes, são os responsáveis pela desregulação da morfofuncionalidade do sistema reprodutivo e placentário de ratas, do estado lipídico das grávidas e do crescimento da prole.

6.1 Validação da contaminação dos moluscos com OTs e a biotransferência aos roedores

Para a determinação do nível de acumulação de OTs nos gastrópodes usados na preparação dos extratos LNN e LNI, avaliamos a concentração de Sn nos moluscos. Estudos relataram que frutos do mar, como peixes, gastrópodes e moluscos encontrados em área contaminada com OTs foram capazes de acumular estes compostos em seus tecidos (COSTA *et al.*, 2013; OH, 2009; TSUDA *et al.*, 1995). Nossos resultados corroboram com estes achados, uma vez que encontramos maiores níveis de Sn nos moluscos

imposexados coletados em região contaminada com OTs, e, portanto, foram utilizados no tratamento das ratas LNI. TAKAHASHI e colaboradores (2000) relataram que os níveis de OTs total e de Sn total apresentaram o mesmo comportamento em relação à distribuição corporal, diferenciação entre espécies costeiras, bem como tendências de agregação em mamíferos marinhos coletados da área costeira japonesa. Portanto, sugerimos que a acumulação significativa de Sn nos moluscos, associado à condição biológica de *imposex*, são resultantes da exposição aos OTs, especialmente ao TBT, na fonte ambiental. Além disso, sabe-se que o fígado está envolvido na biotransformação de xenobióticos em produtos solúveis em água, que são excretados no meio extracelular (GRONDIN *et al.*, 2007). Por exemplo, o TBT é acumulado no fígado de ratos e é metabolizado pelo citocromo P450 a DBT > MBT > e iSn (UENO *et al.*, 1994). SENA e colaboradores (2017) reportaram que a exposição de ratas a 100 ng/Kg TBT, que é 1/3 da dose considerada segura ou tolerável para humanos (EPA-USA, 1997), durante 15 dias, resultou em níveis séricos de $48,7 \pm 9,72$ ng/g Sn. Por isso, realizamos a análise de Sn no soro das ratas, para determinar o estado de contaminação das fêmeas LNI aos OTs, e observamos que este tratamento expôs adequadamente as ratas à contaminação, uma vez que observamos níveis elevados de Sn sérico nas ratas LNI. Os valores foram inferiores aos detectados por SENA e colaboradores (2017), porém significativos quando comparados às ratas CON e LNN. Assim, conduzimos o estudo com a avaliação dos parâmetros reprodutivos.

6.2 Morfofisiologia ovariana e uterina

A exposição aos OTs não afetou os pesos dos ovários e útero, no entanto, prejudicou as funções e as estruturas microscópicas desses órgãos reprodutivos. Ratas LNI apresentaram irregularidade no ciclo estral, com prolongamento da fase de metaestro-diestro. Devido à dificuldade de diferenciação dessas fases nos animais LNI, decidimos representá-las juntas, e tal interpretação não afeta as demais análises, uma vez que em ambas as fases os níveis dos hormônios sexuais e gonadotróficos são basais. Em decorrência desse aumento na fase de M-D e manutenção na duração das outras fases, foi observado aumento na duração total do ciclo reprodutivo dos animais LNI. LAWS e colaboradores (2000) descreveram que a exposição ao xenobiótico etinilestradiol causou a supressão na ciclagem estral, com aumento dos níveis de estrogênio e progesterona. Estes hormônios, controlados pela relação endócrina entre o sistema hipotálamo-hipófise e os folículos ovarianos, desencadeiam o surto ovulatório de LH pela hipófise e assim, regulam a diferenciação das células do epitélio vaginal e a ciclagem reprodutiva (RICHARDS, 2006).

Além da desregulação no ciclo estral, fêmeas LNI apresentaram maiores níveis séricos de estrogênio, progesterona e testosterona. A elevação nos níveis dos três hormônios esteróides confronta-se com um dos possíveis mecanismos de atuação dos OTs, que levaria a inibição da aromatase, que é a enzima que converte os andrógenos a estrógenos (COOKE, 2002; HEIDRICH; STECKELBROECK; KLINGMULLER, 2001). No entanto, os efeitos dos OTs sobre a atividade da aromatase ainda são controversos, e outras enzimas esteroidogênicas também são ativadas/inibidas pelos OTs, como a CYP11A1 (ARAUJO *et al.*, 2018), HSD17 β (DOERING *et al.*, 2002; GROTE *et al.*, 2006; LO *et al.*, 2003) e a HSD3 β (MCVEY; COOKE, 2003), e podem estar envolvidas na desarmonia da produção e secreção hormonal. Além disso, o estrogênio apresenta um mecanismo auto-amplificador em sua própria produção e é mediado por fatores intra-foliculares, entre eles o IGF-1, produzido pelas células intersticiais e pelas células da granulosa, e atua aumentando a ação das gonadotrofinas (VIGUIÉ *et al.*, 2018). Associado aos fatores ovarianos, tem-se também a ação do *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. Esperávamos a redução nos níveis de LH e/ou FSH, visto o aumento nas concentrações séricas dos hormônios ovarianos. No entanto, os valores basais das gonadotrofinas não diferiram entre os grupos. Este achado caracteriza o prejuízo na resposta de *feedback* negativo nas ratas LNI. Estudos mostram que este dano pode ser devido à alteração da expressão dos ERs e PRs na hipófise e hipotálamo (DUBOIS *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2017; YEO; HERBISON, 2014), o que já foi demonstrado ocorrer após exposição ao TBT (SENA *et al.*, 2017).

Embora as concentrações de LH e FSH não tenham alterado, observamos desregulação na foliculogênese das ratas LNI. Estes hormônios desempenham papéis importantes no desenvolvimento dos folículos. No entanto, os oócitos também secretam proteínas da superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF- β), como o fator de diferenciação e crescimento 9 (GDF9), proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), que funcionam como fatores parácrinos e são determinantes na regulação da diferenciação e função das células da granulosa, bem como na formação, crescimento e maturação folicular (EMORI; SUGIURA, 2014; HSUEH *et al.*, 2015). Ratas LNI apresentaram maior quantidade de folículos císticos, primários, atresicos e corpos lúteos. KEZELE e SKINNER (2003) reportaram que o tratamento com estrogênio ou progesterona aumentou a porcentagem de folículos primordiais em cultura de células ovarianas de ratas, porém a combinação destes dois hormônios não alterou a proporção folicular. Além disso, aumento no número de folículos primários, sem qualquer alteração no número de folículos primordiais, foi observado no córtex ovariano bovino coletado de fetos tratados com dihidrotestosterona (DHT) (YANG; FORTUNE, 2008). O GDF9 tem sido

associado a esta maturação do folículo ovariano primário sem influência sobre o desenvolvimento dos primordiais (NILSSON; SKINNER, 2002) e, assim como o BMP15, também atua como fator anti-apoptótico controlando a atresia folicular (CHU *et al.*, 2018). Esta alteração nos folículos é caracterizada principalmente pela apoptose nas células da granulosa e decorrente, entre outros fatores, de hiperandrogenemia (MANNERAS *et al.*, 2007) e, em folículos mais desenvolvidos, também por hiperestrogenemia (HUTZ; DIERSCHKE; WOLF, 1990; YAMAJI *et al.*, 1971). A atresia ocorre como um mecanismo de eliminação de folículos que iniciaram o crescimento, mas não conseguiram avançar as etapas para atingir a ovulação (ARAUJO *et al.*, 2018) Para distinguir a atresia em estágios iniciais ou tardios, classificamos como folículo cístico, os folículos atrésicos que não apresentavam antro e, portanto, ocorrem no início do desenvolvimento folicular. O aumento dos folículos císticos encontrado nos ovários de ratas LNI pode ser considerado uma via secundária à maturação dos folículos primordiais ou dos primários, que, por ação de fatores intrafoliculares, degeneram e não progridem para primários ou pré-antrais, respectivamente.

Durante o processo de atresia folicular, pode ocorrer em associação com a degeneração do ovócito e a desintegração das células da granulosa, o aumento no tamanho e número das células da teca e, assim, o folículo atrésico apresenta-se luteinizado, simulando um corpo lúteo (GURAYA, 1972; RUBIN *et al.*, 1963). O corpo lúteo é uma glândula endócrina temporária, reconhecida, principalmente, pela habilidade de sintetizar e secretar progesterona (FIELDS; FIELDS, 1996), e tem esta função exarcebada sob a ação de andrógenos (CARRIZO *et al.*, 1994). Portanto, sugerimos que as elevações séricas de estrogênio e testosterona, e o prejuízo no *feedback* negativo dos hormônios ovarianos encontrados nas ratas LNI, associados a possível desregulação de fatores parácrinos nos oócitos, resultam na desproporcionalidade e degeneração de folículos, assim como no aumento da produção de progesterona. Estes fatores, em especial a hiperandrogenemia, também podem estar envolvidos no aumento da deposição de colágeno perifolicular encontrada nos ovários de ratas LNI. LEWANDOWSKI e colaboradores (2006) verificaram que a secreção excessiva de testosterona perturba o equilíbrio entre metaloproteinases de matriz (MMPs), que facilitam a degradação da matriz extracelular, e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que suprimem a ativação de MMPs. Além disso, os andrógenos promovem o aumento dos FGFs no fluido folicular (ARTINI *et al.*, 2006) e de filamentos envolvidos na fibrogênese (MA *et al.*, 2007). Esta proliferação exagerada de fibroblastos, associada a um aumento da deposição de matriz extracelular, promove a rigidez do tecido e é uma das principais razões para a disfunção ovariana (LEBBE; WOODRUFF, 2013).

Estudos mostraram que a exposição a 100 ng/kg de TBT também prejudicou os parâmetros ovarianos, porém com alguns perfis diferentes. Os tratamentos durante 15 dias (SENA *et al.*, 2017) e 30 dias (ARAUJO *et al.*, 2018) também geraram atresia ovariana e aumento das concentrações séricas de testosterona, no entanto, com redução dos níveis de estrogênio e associado à diminuição da quantidade de corpos lúteos. Além disso, TBT por 15 dias reduziu as concentrações de LH basal e de pico e a duração da fase de proestro. Tais alterações não foram encontradas neste estudo e também após exposição ao TBT durante 30 dias. Desta forma, tornou-se adequado ressaltar que os efeitos e a tolerabilidade aos OTs dependem da fonte, da concentração e do tempo de exposição (KANNAN *et al.*, 2010).

Além da desregulação ovariana, os OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, também estabeleceram danos uterinos. Ratas LNI apresentaram hipertrofia de epitélio luminal, com pontos de pseudoestratificação, e maior expressão do ER α nos úteros. O'CONNOR e colaboradores (1996) comprovaram que o aumento da espessura do epitélio luminal uterino é um marcador clássico de níveis elevados de estrogênio. Além disso, os principais efeitos deste hormônio no útero são mediados pelo ER α , que é isoforma predominante e que regula a morfogênese epitelial, a citodiferenciação, o crescimento (SCHÖNFELDER *et al.*, 2004) e a proliferação de células epiteliais luminas (ABOT *et al.*, 2013). Em concordância com os nossos achados, o tratamento com 17 β -estradiol recrutou ER α para as regiões promotoras no útero e estimulou mitose, alterou a morfologia das células epiteliais cuboidais únicas em células epiteliais colunares e aumentou a infiltração de células imunes (POLLARD *et al.*, 1987). O útero de ratas LNI apresentou elevados níveis de marcadores de inflamação tecidual. Este achado foi caracterizado pela maior atividade de enzimas, como MPO, que é uma enzima encontrada nos grânulos de neutrófilos (MULLANE; KRAEMER; SMITH, 1985), e NAG, que é uma enzima lisossomal hidrolítica predominantemente produzida e liberada por macrófagos ativados (REINER *et al.*, 1981), e também pela maior detecção de mastócitos. Estas células possuem grânulos contendo histamina, MMPs, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interleucinas (BURD *et al.*, 1989; SELVAN; BUTTERFIELD; KRANGEL, 1994) e, assim, participam do remodelamento da matriz extracelular (MORI *et al.*, 1997), angiogênese/neovascularização e inflamação (FOLKMAN, 1982; FUKUSHIMA *et al.*, 2001). Lesões inflamatórias repetitivas são conhecidas por gerar fibrose (ZHANG *et al.*, 2013B). Os danos causados pela inflamação desencadeiam uma reação tecidual complexa, resultando em deposição de matriz extracelular nos úteros. A fibrose continua a progredir mesmo após o término do processo inflamatório (CADARIO *et al.*, 2002). Portanto, a progressão do processo fibrótico

após um ponto crítico torna-se independente da inflamação, apesar da presença de inflamação ter precedido a fibrose (ARESU *et al.*, 2012). Neste estudo, além da inflamação, também observamos aumento da deposição de colágeno nos úteros de ratas LNI, sugerindo que o acúmulo de matriz extracelular ainda enquadra-se em um estágio inicial. Resultados semelhantes de inflamação e deposição de colágeno uterinos foram encontrados após os tratamentos com TBT 100 ng/kg durante 15 dias (SENA *et al.*, 2017) e 30 dias (ARAUJO *et al.*, 2018), porém, com redução da espessura de endométrio devido aos baixos níveis de estrogênio.

Com estes achados reprodutivos no grupo LNI, representados por hiperandrogenismo, irregularidade no ciclo estral e aumento de folículos císticos/atresia ovariana, verificamos que a exposição aos OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, confere às ratas características da Síndrome do Ovário Policístico (HSU, 2015).

6.3 Síndrome do Ovário Policístico (SOP)

O primeiro consenso para o diagnóstico da SOP ocorreu em 1990, em uma reunião em Bethesda (EUA), onde o *National Institute of Health* (NIH) estabeleceu hiperandrogenismo clínico ou laboratorial e anovulação como critérios diagnósticos, não levando em consideração os achados ecográficos (ZAWADSKI; DUNAIF, 1992). Novas pesquisas de ultra-sonografia foram realizadas no intuito de melhorar a eficácia do diagnóstico. Em 2003, em Rotterdam (Holanda), no encontro da *European Society for Human Reproduction* e da *American Society of Reproductive Medicine*, novas regras foram sugeridas. Para confirmar o diagnóstico de SOP, dois destes três achados deveriam estar presentes: hiperandrogenismo (clínico ou laboratorial), anovulação crônica (oligo ou amenorréia) e ovários policísticos (presença ao exame ecográfico de 12 ou mais folículos entre 2 e 9 mm de diâmetro médio ou volume ovariano de 10 cm³ ou mais (apenas um ovário era suficiente para o diagnóstico) (ROTTERDAM, 2004). Em 2006, a *Androgen Excess and PCOS (AE-PCOS) Society* definiu que o hiperandrogenismo é o componente fundamental para a SOP e, associado a este critério, ao menos um dos outros dois (anovulação crônica e ovários policísticos) deveriam ser encontrados (AZZIZ, 2006), como demonstrado na Tabela 3.

Modelos hormonais, nos quais os roedores, os ovinos e os primatas não-humanos são tratados com andrógenos (testosterona, DHT ou dehidroepiandrosterona [DHEA]),

estrogênios ou inibidores da aromatase, são largamente utilizados na investigação da SOP. Embora não haja nenhum animal espontâneo a esta síndrome, os exemplares induzidos fornecem oportunidades para estudar a disfunção endócrina. Seu valor, entretanto, depende da fidelidade do modelo à fisiologia e doença humanas e à especificidade das perturbações (BOGOVICH, 1987; FAMILIARI; TOSCANO; MOTTA, 1985; WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2012). Porém, é importante notar que existem diferenças fundamentais entre a função ovariana humana e de roedores. O ciclo estral das ratas dura apenas 4-5 dias, comparado com 28 dias em mulheres. Além disso, os roedores são poliovatórios, sugerindo diferenças importantes na seleção do folículo dominante (HUANG-DORAN; FRANKS, 2016). Desta forma, os resultados de estudos baseados em roedores (genéticos ou hormonais) precisam ser extrapolados com cautela para a SOP humana (FRANKS; BERGA, 2012). Ainda assim, podemos sugerir que a exposição aos OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, induz características da SOP.

Tabela 3: Estudos sobre os critérios de SOP em mulheres e roedores

	Critérios / modelos	Evidências clínicas ou bioquímicas de hiperandrogenismo (HA)	Oligomenorréia - Anovulação (Oligo-An)	Morfologia do ovário policístico (PCOM)	
Mulheres	Instituto Nacional de Saúde (NIH, 1990)	+	+	-	
	Rotterdam (2003)	+ -	+ -	+ -	2 achados, após exclusão de quaisquer distúrbios de excesso de andrógenos (PCOM + Oligo-Na / sem HA)
	Androgen Excess Society (2006)	+	+ -	+ -	2 achados, necessariamente, com HA
Roedores	<i>ob/ob</i> (camundongo fêmea)	↑ Testosterona	Anovulação	Atrofia ovariana, sem cistos	Resultados de estudos baseados em roedores (genéticos ou hormonais) precisam ser extrapolados com cautela para a SOP humana.
	1 mg testosterona (rata grávida - 16 ^a a 19 ^a) - filhotes 60 dias	↑ Testosterona	Ciclo irregular	Atrofia ovariana	
	Tratamento com LNI (rata)	↑ Testosterona	Ciclo irregular (diestro prolongado)	↑ cistos; atresia ovariana	

+: presença; -: ausência; +- : presença/ausência. Adaptado de (ABRUZZESE *et al.*, 2016; HSU, 2015; HUANG-DORAN; FRANKS, 2016).

Além das perturbações reprodutivas, a SOP está associada a fatores de risco metabólico, incluindo resistência à insulina/diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade e dislipidemia (DUNAIF, 1997; EHRMANN, 2005; ESSAH; NESTLER, 2006; FRANKS, 1995).

6.4 Estado energético das adultas e grávidas

Anormalidades metabólicas podem coexistir e exacerbar as características reprodutivas encontradas na SOP, criando um ciclo vicioso (BAPTISTE *et al.*, 2010). Mulheres com SOP apresentam hiperandrogenemia e infertilidade associado ao aumento da adiposidade (LEGRO *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014). Resistência à insulina também foi registrada em aproximadamente 80% das mulheres obesas e 30-40% das magras, ambas com SOP (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 1999; KANDARAKI *et al.*, 2011). Embora não sejam necessários para o diagnóstico da SOP, a AE-PCOS passou a recomendar os testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em mulheres com esta síndrome (SALLEY *et al.*, 2007), também para incluir/excluir o diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2 (MARTINS *et al.*, 2006), que atinge cerca de 10% das mulheres com SOP (SIRMANS; PATE, 2013). Além disso, a exposição a 100 ng/Kg TBT durante 15 dias gerou aumento de peso corporal e adiposidade, hiperinsulinemia, e menores respostas ao TTG e TSI após 15 e 30 minutos, respectivamente (SENA *et al.*, 2017). Neste estudo, não encontramos diferença no peso corporal ao longo dos 15 dias de tratamento, assim como nas curvas de TTG e TSI, demonstrando que o nosso modelo de SOP não abrange determinadas características metabólicas geralmente encontradas na síndrome, como a obesidade e as variações glicêmicas. ABRUZZESE e colaboradores (2016) induziram características de SOP em filhotes de ratas, por meio do tratamento pré-natal com testosterona, e encontraram todos os prejuízos reprodutivos necessários para diagnosticar a SOP, porém sem verificar algumas comorbidades metabólicas. Sugere-se que este fato, também encontrado no nosso estudo, deve-se à diferença de concentração de andrógeno produzido/aplicado para induzir a síndrome, uma vez que já se tem estabelecido que doses mais altas de andrógenos geraram fenótipos mais semelhantes à SOP, bem como piores distúrbios endócrinos e metabólicos (AMALFI *et al.*, 2012).

Evidências mostram que a SOP também está associada à dislipidemia, que é uma condição anormal do perfil lipídico, caracterizada por níveis elevados de triglicerídeos, colesterol total, LDL-c e/ou diminuição de HDL-c (BAHCECI; AYDEMIR; TUZCU, 2007; CONWAY *et al.*, 1992; MACUT *et al.*, 2001; TALBOTT *et al.*, 1995). WILD e colaboradores (2010) encontraram altos níveis de triglicerídeos e LDL-c, bem como baixos níveis de HDL-c em mulheres de 18 a 45 anos com SOP. A comorbidade de SOP, dislipidemia e resistência à insulina tem sido relacionada à doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), principalmente, em obesos (BOUMOSLEH *et al.*, 2017; GAMBARIN-GELWAN *et al.*, 2007; LEGRO *et al.*, 2013; SETJI *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2009). A DHGNA é caracterizada pelo

acúmulo de lipídios no fígado, histologicamente idêntico à doença hepática alcoólica, em indivíduos sem consumo ou consumo mínimo de álcool, e a biópsia do fígado é o padrão ouro para diagnóstico e estadiamento da doença (ANGULO, 2002; MATTEONI *et al.*, 1999). GAMBARIN-GELWAN e colaboradores (2007) reportaram que 55% das 88 mulheres com SOP apresentavam esteatose hepática, cujo diagnóstico requer a detecção de triglicerídeos intra-hepático correspondendo a, pelo menos, 5% do peso do fígado (NASSIR *et al.*, 2015). Além disso, a exposição a 100 ng/Kg TBT durante 30 dias promoveu aumento nos níveis séricos de colesterol total (MERLO *et al.*, 2016) e, o mesmo tratamento durante 15 dias, gerou maior acúmulo hepático de gotículas lipídicas (BERTULOSO *et al.*, 2015). Ratas LNI na fase adulta não apresentaram alteração nos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total e a análise histológica hepática não demonstrou qualquer indício de aumento da deposição lipídica, porém observamos infiltrado inflamatório próximo a veio centrolobular e presença de granuloma próximo ao espaço-porta. De fato, o fígado é o principal órgão para metabolizar e acumular xenobióticos (GRONDIN *et al.*, 2007; WIEBKIN *et al.*, 1982) e vários trabalhos tem demonstrado que os OTs geram inflamação hepática (BERTULOSO *et al.*, 2015; KRAJNC *et al.*, 1984; MERKORD *et al.*, 1997; OZ, 2016), possivelmente devido à formação de corpos apoptóticos ou a liberação de constituintes celulares por hepatócitos necróticos, que desencadeiam a ativação de células imunes inatas e a produção de mediadores pró-inflamatórios (GU; MANAUTOU, 2012).

Apesar de não termos encontrado variações nas análises glicêmicas e lipídicas na fase adulta, é sabido que durante a gravidez ocorrem alterações no anabolismo/catabolismo de carboidratos e lipídios para assegurar um suprimento contínuo de nutrientes para o feto em crescimento (BUTTE, 2000). Estas variações fisiológicas podem ser o gatilho para prejuízos metabólicos nas grávidas com características de SOP e, por isso, realizamos, na fase gestacional, as mesmas avaliações já descritas. Não observamos diferença no ganho de peso corporal das grávidas, desde a alocação com machos controle até a realização da cesariana. Também não houve alteração nas curvas de TTG e TSI, assim como na adiposidade e peso do fígado entre os três grupos. No entanto, além do aumento de aproximadamente 5 vezes nos níveis de triglicerídeos séricos verificados nas grávidas CON e LNN em comparação com as adultas dos grupos respectivos, observamos nas grávidas LNI, elevação de quase 9 vezes em relação às adultas LNI. Hipertrigliceridemia é uma condição normal em grávidas e valores até cinco vezes maiores do que os valores basais são registrados. Isso se deve ao aumento dos níveis de estrogênio e prolactina, que levam à maior produção hepática de VLDL-c e ao efeito lipolítico do hormônio lactogênico placentário sobre o tecido adiposo (DESOYE *et al.*, 1987; WATTS *et al.*, 1992). Porém, nas grávidas

LNI, a elevação de triglicérides séricos foi exarcebada e quase 4 vezes maior do que nas grávidas CON e LNN. Também registramos aumento de colesterol total sérico nas grávidas LNI, em relação às grávidas CON e LNN, caracterizando-se, assim, um quadro de dislipidemia, devido à hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Essa alteração no perfil lipídico tem forte associação com esteatose hepática, sendo já demonstrado que 60% dos pacientes com dislipidemia e SOP apresentaram esteatose hepática (MARCHESINI *et al.*, 2003).

Na análise histológica, notamos que no fígado das grávidas LNI, além de processo inflamatório também já registrado no fígado das adultas LNI, houve o acúmulo de vacúolos lipídicos redondos, de limites nítidos e tamanhos variáveis, típico de DHGNA. Em condições fisiológicas, no fígado, há um equilíbrio entre a captação e a exportação de ácidos graxos, que por sua vez podem ser esterificados ou oxidados (BROWNING; HORTON, 2004; KAWANO; COHEN, 2013). No entanto, quando o equilíbrio entre a lipólise e a lipogênese é alterado, ou o influxo de ácido graxo para o fígado aumenta, gotículas lipídicas podem acumular-se no fígado, levando à DHGNA e a esteatose (DEN BOER *et al.*, 2004; KAWANO; COHEN, 2013). Em concordância com o nosso estudo, GRUN e colaboradores (2006) relataram que o TBT é lipolítico e altera a expressão de mediadores transcricionais críticos da adipogênese e síntese de triglicérides, por ação em moléculas sinalizadoras de RXR / PPAR γ , levando à complicações metabólicas associadas à SOP, como esteatose hepática. Além disso, durante o processo inflamatório, que foi encontrado no fígado de grávidas LNI, ocorre o aumento da mobilização e concentração de lipídios, com a finalidade de suprir as necessidades energéticas dos hepatócitos e também para produzir os mediadores inflamatórios (OLIVEIRA, 2005).

No acompanhamento do peso corporal das ratas, observamos a extensão da curva nas grávidas LNI, devido ao retardo no estabelecimento da gravidez. O tempo entre a alocação com machos e o 20º DG nas fêmeas LNI aumentou 87% e 101% em relação ao CON e LNN, respectivamente. Além da associação com desregulação metabólica, a SOP é uma causa comum de infertilidade anovulatória feminina e alto risco de complicações na gravidez (FRANKS; STARK; HARDY, 2008; NORMAN *et al.*, 2007).

6.5 Fertilidade e implantação embrionária

A fertilidade das ratas LNI foi prejudicada pela exposição aos OTs e o desencadeamento de características da SOP. Em um período de avaliação de 120 dias, o

número de ninhadas das fêmeas LNI reduziu pela metade comparado aos grupos CON e LNN, sem alteração na quantidade de filhotes por ninhada. Além disso, a porcentagem de perda pré-implantação embrionária nas fêmeas LNI foi 2 vezes maior do que nas fêmeas CON e LNN. Estes achados estão em harmonia com a literatura. SENA e colaboradores (2017) reportaram que a exposição a 100 ng/Kg de TBT reduz a frequência de ninhadas ao longo de 90 dias. Elevada perda embrionária, na fase de pré-implantação, foi verificada em ratas expostas a doses de 12,2 e 16,3 mg/Kg de TBT (HARAZONO; EMA; OGAWA, 1996), enquanto que perda pós-implantação embrionária foi registrada em ratas tratadas com 33 mg/kg de DPT (EMA; MIYAWAKI; KAWASHIMA, 1999). O aumento da perda de pré-implantação embrionária registrada em ratas LNI reflete as mortes embrionárias durante o período que antecede a implantação. Este valor é obtido pela relação entre o número de corpos lúteos gravídicos, que não alterou entre os grupos, e o número de implantações, que reduziu em aproximadamente 18% nas fêmeas LNI, comparado ao CON e LNN.

Para que a ovulação e a frequência de ninhadas ocorram de forma bem-sucedida é necessário que a ciclagem estral seja regular. Uma alteração da ciclicidade pode, portanto, induzir, diretamente, pelo menos a subfertilidade através da ovulação perturbada (retardada ou ausente) (VIGUIÉ *et al.*, 2018). Embora não tenhamos verificado variação no número de corpos lúteos gravídicos, que correspondem ao número de óvulos fecundados, ratas LNI apresentaram o aumento da duração das fases M-D e, conseqüentemente, a extensão do ciclo estral. Este prolongamento reduz a quantidade de picos de LH ocorridos em determinado tempo e, assim, diminui a ocorrência de ruptura folicular e liberação dos ovócitos. A ovulação nas ratas LNI gera a liberação de uma quantidade regular de ovócitos, porém este evento ocorre com frequência reduzida, o que diminui a probabilidade de gravidez. ZAID; OTHMAN e KASSIM (2014) mostraram que o tratamento com o xenoestrógeno bisfenol A gerou predominância de animais em diestro persistente, aumentou o número de folículos antrais de grande tamanho que não atingiram a ovulação e de folículos císticos-atrésicos, e diminuiu os folículos pré-antrais, o que, em conjunto, alterou o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios e a ovulação. Modificações no comprimento e / ou níveis hormonais das diferentes fases do ciclo estral podem impactar na qualidade dos oócitos e dos embriões. Portanto, o efeito da ciclicidade precisa ser considerado em relação à alteração da ovulação e da fertilidade (VIGUIÉ *et al.*, 2018)

Estudos mostram que a ovulação espontânea ou a estimulação da ovulação em mulheres com infertilidade induzida pelo dano ovariano, não garante a manutenção da gestação (JAKUBOWICZ *et al.*, 2002; SAVARIS *et al.*, 2011). Assim, sugere-se que a

anovulação não é a única causa de infertilidade, e que o ambiente uterino contribui para as anormalidades na implantação de embriões em mulheres com SOP (LI *et al.*, 2016; SAVARIS *et al.*, 2011). LI e colaboradores (2016) relataram que fêmeas tratadas com DHEA (6 mg/100 g peso corporal/ injetado por 20 dias), um modelo de SOP em ratas, apresentaram o comprometimento da receptividade uterina, associada a uma redução na taxa de implantação embrionária e desregulação nos genes relacionados à implantação. Como já descrito, as ratas adultas LNI apresentaram aumento da deposição de colágeno uterino, o que por si só pode dificultar as etapas de receptividade, implantação e decidualização e, assim, diminuir a frequência de gravidez (ZHANG *et al.*, 2013A). Além disso, ratas adultas LNI mostraram aumento de inflamação uterina, com elevados níveis de marcadores para macrófagos, assim como de detecção de mastócitos. Em gestações normais, os macrófagos funcionam como um suporte das células para facilitar a invasão do trofoblasto e formar a placenta. Em condições patológicas, os macrófagos funcionam como uma barreira para a invasão e diferenciação do trofoblasto (REISTER *et al.*, 2001). Já os mastócitos têm sido considerados importantes na implantação embrionária, uma vez que sua degranulação leva à liberação de fatores, como a histamina, triptase, VEGF, que são cruciais para a degradação da matriz extracelular e para a neo-vascularização (BOSQUIAZZO *et al.*, 2007). Ainda que o mecanismo de ativação dos mastócitos endometriais não seja bem estabelecido, sabe-se que o estrogênio e a progesterona regulam a migração e a degranulação dos mastócitos no útero, por meio da modulação da produção e a liberação de quimiocinas (JENSEN *et al.*, 2010). Assim, o aumento dos níveis dos hormônios ovarianos detectados em ratas adultas LNI podem afetar a implantação devido o maior recrutamento de mastócitos.

A implantação nas ratas adultas LNI também pode ter sido comprometida pelo próprio aumento nas concentrações de hormônios gonadais detectado na fase em que, normalmente, apresentam-se em níveis basais. Isso porque as flutuações fisiológicas de ambos os esteroides são necessárias para a ativação da secreção de fatores de crescimento no útero, a transformação do trofoblasto (PARIA; DAS; DEY, 1998) e a indução da decidualização uterina, em resposta do útero à implantação do blastocisto (GLASSER *et al.*, 1991). Esses hormônios atuam via seus respectivos receptores. Ratas LNI apresentaram aumento do ER α uterino, sem alteração no PR. O ER α desempenha um papel importante na diferenciação celular, regulando proteínas-alvo, como o PR. Embora tanto o estroma quanto o epitélio expressem o PR, o estrogênio reduz a expressão desta proteína nas células epiteliais do lúmen, diminuindo a atuação da progesterona (TIBBETTS *et al.*, 1998). Além disso, SAVARIS e colaboradores (2011) demonstraram uma resistência endometrial à

progesterona em indivíduos com SOP, devido à redução na expressão de genes regulados por progesterona no útero de mulheres com SOP.

Assim, observamos que os danos estruturais nos ovários e útero, juntamente com a irregularidade no ciclo estral e as alterações nos níveis séricos dos hormônios gonadais registrados nas fêmeas LNI, são os responsáveis pelos atrasos na ocorrência da gravidez devido o prejuízo na ovulação e na implantação embrionária. No entanto, quando estes eventos ocorrem nas ratas LNI, não há alteração na proporção de mortes embrionárias após a implantação e, assim, a gestação torna-se bem sucedida. Em seguida, a placenta assume a responsabilidade de ligar o estado nutricional materno ao crescimento fetal, através do transporte de nutrientes (REYNOLDS *et al.*, 2006).

6.6 Placenta

A placenta é um órgão endócrino temporário alvo da ação dos OTs, tendo já sido detectado acúmulo tecidual e transferência de TBT aos fetos (COOKE *et al.*, 2008). Portanto, realizamos a cesariana no 20º DG para a coleta e análise deste órgão. Verificamos o aumento macroscópico e no peso das placentas de ratas LNI em comparação com CON e LNN. Registros de peso placentário mostram variações dependentes do agente químico, da dose e do período de exposição. Ratas com características de SOP, após indução com 0,5 mg/Kg de testosterona nos DG 15-19, apresentaram redução no peso placentário (HU *et al.*, 2015). Achado semelhante foi verificado após exposição a 20 mg/Kg de DBT, nos DG 7-9 e 10-12 (FURUKAWA *et al.*, 2017). COOKE e colaboradores (2008) relataram que ratas expostas a 0,25, 2,5 e 10 mg/Kg TBT nos DG 8-20 não apresentaram alteração no peso placentário. Em contrapartida e em concordância com os nossos resultados, aumento no peso da placenta foi detectado após exposição às doses de 0,25, 2,5, 10 e 20 mg/Kg TBT nos DG 0-19 ou 8-19 (ADEEKO *et al.*, 2003), assim como após 5, 9 e 15 mg/Kg TBT nos DG 7-15 (ITAMI *et al.*, 1990).

Na avaliação histológica da placenta, verificamos desorganização celular na zona basal placentária de ratas LNI, com células gigantes trofoblásticas dispersas pela camada e, também, maior quantidade de células de glicogênio. A zona basal tem um papel importante no metabolismo de xenobióticos (EJIRI *et al.*, 2001). Assim, essa desestruturação na camada pode ser vista como uma adaptação do organismo para remover o agente tóxico (AHBAB *et al.*, 2017) que as fêmeas se expuseram antes da gestação e, possivelmente, ainda estão circulando na corrente sanguínea. As células de glicogênio foram identificadas

pela coloração de H&E, pela qual apresentam os citoplasmas claros e os núcleos condensados, com a cor mais escura do que aqueles de células de espongiotrofoblastos circundantes (WOODING; FLINT, 1994). As células de glicogênio interagem com as células natural *killer* uterinas, estimulando-as a modificar as artérias espiraladas, e também liberam os seus componentes intracelulares (glicogênio e hormônios) para o interstício, para servir como fonte de energia (CROY *et al.*, 2000). Entre o 16º e 19º DG, os estoques de glicogênio diminuem em mais de 3 vezes na placenta de roedores (PICKARD *et al.*, 2003). Em seguida, entram em uma fase apoptótica, formando grandes lacunas com glicogênio nas proximidades dos seios vasculares, sugerindo que seja uma fonte de energia no final da gestação ou talvez influencie no parto (BOUILLOT *et al.*, 2006). O acúmulo de células de glicogênio na placenta, no final da gestação, pode refletir o armazenamento para o seu próprio uso, a incapacidade de liberar glicose dos estoques de glicogênio, ou pode ser uma resposta compensatória à grande oferta nutricional materna, objetivando limitar o excesso de glicose que chega ao feto (AKISON *et al.*, 2017). Para a formação destas células com estoque de glicogênio, é necessário que a placenta receba a glicose materna, e este processo requer a atividade de GLUT1, que é a isoforma responsável pelo transporte de glicose entre a mãe e a placenta (ZHOU; BONDY, 1993). Ratas LNI apresentaram aumento da expressão proteica de GLUT1 na placenta, confirmando, assim, a maior aquisição de glicose placentária. No entanto, além de receber mais glicose materna e armazenar na forma de glicogênio, as placentas de ratas LNI também transferem aos fetos uma quantidade aumentada desse substrato, visto os altos níveis glicêmicos detectados no cordão umbilical. Essa transferência transplacentária de glicose é realizada por GLUT3 (ZHOU; BONDY, 1993) e este parâmetro bioquímico do sangue do cordão umbilical funciona como um espelho, refletindo o estado neonatal (KHAN; SAHA, 2013).

Deposição lipídica também foi observada nas placentas de ratas LNI, por meio do aumento da concentração tecidual de triglicerídeos. Embora a placenta tenha capacidade de formar triglicerídeos a partir de glicose ou ácidos graxos (FREINKEL, 1965; ROUX; MYERS, 1974), é sabido que a deposição lipídica placentária no final da gravidez deve-se, principalmente, ao aumento da quantidade de lipídios que chegam à placenta da circulação materna (DIAMANT; DIAMANT; FREINKE, 1980). Como os triglicerídeos não podem ser transportados pela placenta, são hidrolisados em ácidos graxos e, estes, são disponibilizados aos fetos, através de ACSVLs (KING, 2006). Não encontramos alteração na expressão proteica de ACSVL4 nas placentas dos três grupos. Esta isoforma localiza-se principalmente no sinciciotrofoblasto, na zona labiríntica. Embora não tenha alterado, outras

isoformas de ACSVLs estão presentes na placenta e envolvidas na transferência de ácidos graxos (O'TIERNEY-GIN *et al.*, 2015), e podem ter tido o funcionamento comprometido.

Hipercolesterolemia materna durante a gravidez também facilita a disponibilidade de lipídios para o feto (SCHAEFER-GRAF *et al.*, 2008) e pode contribuir para o acúmulo na placenta. Ratas LNI apresentaram aumento de colesterol total placentário, assim como no sangue do cordão umbilical. Aumento do fornecimento de lipídios à circulação fetal também foi registrado após o comprometimento da função placentária global (ZHU *et al.*, 2010) decorrente da produção de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas por significativos subconjuntos de macrófagos (LAGER *et al.*, 2011). Nas placentas das ratas LNI encontramos aumento nos níveis de marcadores inflamatórios que detectam neutrófilos e macrófagos, sem dano oxidativo, visto que as concentrações teciduais de GSH e TBARS não diferiram. A gravidez, por si só, é um estado inflamatório (STEWART *et al.*, 2007). Em gestações associadas a complicações reprodutivas e/ou metabólicas, a inflamação de baixo grau, antes da gravidez, inicia uma cascata de eventos que se traduzem em um ambiente inflamatório no útero, e posteriormente, na placenta (CHALLIER *et al.*, 2008).

A expressão dos transportadores placentários é regulada por mecanismos moleculares envolvendo mTOR (JANSSON; POWELL, 2013), que é ativado por vias de mediadores inflamatórios ou de fatores de crescimento, como a insulina (LAPLANTE; SABATINI, 2012). GORDON e colaboradores (1995) mostraram que a insulina aumentou a expressão de GLUT1 em células trofoblásticas isoladas. Além disso, insulina regulou positivamente a síntese de glicogênio placentário (HIDEN *et al.*, 2009) e aumentou o peso da placenta (SUSA *et al.*, 1984). Embora as ratas adultas e grávidas LNI não tenham apresentado alteração nas curvas glicêmicas nos testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, as modificações estruturais e proteicas placentárias, como aumento do tamanho e do peso, maior expressão de GLUT1, acúmulo de glicogênio, e elevação no fluxo de glicose e lipídios no cordão umbilical, caracterizam uma ativação do sensor de nutrientes mTOR, via IR (ACEVEDO *et al.*, 2005). Além disso, DESOYE e colaboradores (1994) reportaram que a insulina fetal também atua como um regulador da função placentária, atuando como um fator de crescimento para a placenta (HIDEN *et al.*, 2009). De fato, observamos o aumento da expressão proteica do IR β nas placentas de ratas LNI. A ligação da insulina ao IR na membrana placentária pode ativar 2 vias de sinalização: a Ras-ERK-mTOR e a via PI3K-Akt-mTOR (COLOMIERE *et al.*, 2009). Não encontramos alteração na expressão de ERK e p-ERK nas placentas LNI, logo, a cascata migraria para a regulação de PI3K-Akt-mTOR. Em concordância, observamos o aumento da p-Akt. Esta ativação inibe

proteínas inibitórias, resultando na ativação de mTOR (LAPLANTE; SABATINI, 2012), o que foi verificado na placenta das ratas LNI, com aumento de 61% e 31% na expressão de p-mTOR, comparado as ratas CON e LNN, respectivamente. Em condições saudáveis, o excesso de nutrientes maternos inibe a via mTOR, potencialmente através de um *feedback* negativo, em um esforço para restringir o transporte excessivo de nutrientes e otimizar o crescimento fetal (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). No entanto, quando o fluxo de nutrientes está constantemente aumentado, a via de sinalização do mTORC1 é ativada, contribuindo para o aumento do transporte de nutrientes (GACCIOLI *et al.*, 2013; JANSSON *et al.*, 2013). Assim, esta desregulação na mTOR placentária, decorrente de patologias durante a gravidez, resulta no crescimento anormal do feto (BRETT *et al.*, 2014).

6.7 Herança fetal

O crescimento fetal é criticamente dependente dos nutrientes maternos e do adequado funcionamento placentário (JANSSON; ILLSLEY, 1993). Como esperado, os fetos de ambos os gêneros, de mães LNI, apresentaram aumento no peso corporal. Supercrescimento fetal está relacionado positivamente tanto com a maior expressão de transportadores de nutrientes placentários (JANSSON *et al.*, 2013), quanto com o maior peso da placenta (WALLACE; HORGAN; BHATTACHARYA, 2012). Além disso, recém-nascidos de mães com SOP apresentaram aumento da adiposidade fetal (MALIQUEO *et al.*, 2009), possivelmente devido a maior disponibilidade de glicose, que é prontamente convertida em gordura fetal (ROSARIO *et al.*, 2015), e também são mais propensos a desenvolverem alterações metabólicas (RECABARREN *et al.*, 2008).

O fígado fetal regula as funções metabólicas e é dependente do crescimento do feto. Alterações no suprimento de nutrientes placentários promovem mudanças na estrutura e função hepática (BURNS *et al.*, 1997; LANE *et al.*, 2002). Além disso, o fígado é um importante alvo de acumulação dos OTs. COOKE e colaboradores (2008) demonstraram que o TBT atravessa a placenta, e que as concentrações de OTs totais nos fígados fetais foram equivalentes aos níveis placentários e muito maiores do que a carga total encontrada em filhotes inteiros. Apesar de não termos registrado diferença nos pesos dos fígados fetais, a análise microscópica demonstrou aumento de megacariócitos hepáticos nos fetos fêmeas e machos de mães LNI. Durante o período fetal, o fígado é o principal órgão hematopoiético (MOHAMMADI *et al.*, 2013). Em ratos, a hematopoiese hepática é iniciada no 12º DG e atinge seu pico no 17º DG, quando células eritróides e megacariócitos podem ser identificados, e encerra-se 2-3 dias após o nascimento (HEBEL; STROMBERG, 1986;

TRAVER *et al.*, 2001). Os megacariócitos são facilmente reconhecidos no fígado fetal, por serem células grandes, com extenso citoplasma e núcleo irregular e lobulado (PAPADANTONAKIS; RAVID, 2009). Estas células são precursoras das plaquetas e a produção hepática fetal parece gerar mais plaquetas do que a derivada da medula óssea em adultos (MAZHARIAN; WATSON; SÉVERIN, 2009). Aumento de megacariócitos hepáticos fetais reflete a maior demanda de plaquetas pelo organismo, possivelmente devido a processo inflamatório. As plaquetas são os primeiros corpúsculos celulares que se acumulam em um local com dano da parede vascular. Quando ativadas, as plaquetas expressam receptores para proteínas adesivas e agregam citocinas e outros mediadores. Além disso, fazem contato direto com células endoteliais, granulócitos, monócitos e linfócitos. Através destes contatos, as plaquetas podem estimular ou inibir as funções das células na inflamação e auxiliar na migração transendotelial de leucócitos para o tecido circundante (KLINGER; JELKMANN, 2002). Em concordância, fetos fêmeas e machos de mães LNI apresentaram infiltrado inflamatório hepático próximo a veia centrolobular. Estudos têm demonstrado essa associação entre doenças inflamatórias e a trombocitose (BJERRE *et al.*, 2000; HEITS *et al.*, 1999; KLINGER; JELKMANN, 2002), e evidências tem sugerido o volume médio de plaquetas como um novo marcador de inflamação (FARAH; KHAMISY-FARAH, 2015).

A ativação plaquetária também tem sido observada em pessoas com hipertrigliceridemia (SCHNEIDER, 2009). Quando ocorre em fetos, esta dislipidemia gera superacumulação de triglicerídeos no fígado fetal (SOFTIC *et al.*, 2012). Corroborando com estes dados, verificamos em ambos os gêneros fetais, de mães LNI, o aumento da concentração hepática de triglicerídeos. Como o fígado dos fetos apresenta muitos capilares sinusoides dilatados, a detecção de acúmulo lipídico microscopicamente, torna-se dificultada. Por isso, realizamos a avaliação histológica da deposição lipídica utilizando a coloração de *Oil red O*, que é um corante que se dissolve em lipídios neutros, como colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos. Por esta técnica, observamos maior acúmulo lipídico apenas no fígado de fetos machos. Além disso, aumento na expressão proteica do PPAR γ , que é um marcador do metabolismo lipídico hepático e indutor de lipogênese (CHAMORRO-GARCIA *et al.*, 2013), também só foi verificada nos fígados de fetos machos. Em contrapartida, altos níveis de colesterol tecidual só foram registrados no fígado dos fetos fêmeas. Esses achados mostram prejuízo de mobilização lipídica nos fígados dos fetos fêmeas e machos, com algumas diferenças relacionadas ao gênero. CHAMORRO-GARCIA e colaboradores (2013) também relataram diferenças metabólicas entre os fetos expostos ao TBT, sendo que machos apresentaram fenótipos mais intensos nas análises dos tecidos

adiposos e no perfil de expressão gênica, enquanto que as fêmeas mostraram fenótipo hepático mais pronunciado do que os machos, permitindo-lhes sugerir que existe diferenças na forma de atuação do TBT entre os tecidos e os gêneros. A concentração de lipídios no fígado também favorece a metabolização dos ácidos graxos. Essa oxidação gera peróxido de hidrogênio, que produz radicais hidroxila na presença de ferro, sendo ambas espécies reativas de oxigênio (RAO; REDDY, 2001). O excesso desses metabólitos esgota os antioxidantes naturais, como o GSH, causando o estresse oxidativo e resultando na peroxidação lipídica hepática (GARCÍA-MONZÓN *et al.*, 2000; NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003). Corroborando com esses trabalhos, encontramos níveis aumentados dos marcadores de estresse oxidativo no fígado dos fetos fêmeas e machos, representados por redução do antioxidante GSH e aumento de TBARS, que detecta os subprodutos da peroxidação lipídica.

A acumulação de lipídios no fígado fetal tem sido relacionada ao desenvolvimento de vários distúrbios metabólicos, especialmente na vida adulta (MCCURDY *et al.*, 2009). Quando o feto é colocado sob a influência de determinados estímulos durante o desenvolvimento embrionário, as respostas adaptativas que ocorrem nesse período podem ser fixadas permanentemente, ocasionando um paradigma fisiopatológico. Assim, o feto pode ser programado durante o desenvolvimento intrauterino para desenvolver doenças efêmeras e/ou permanentes na idade adulta (BARKER *et al.*, 1989). Além disso, quando estas disfunções são desencadeadas apenas às gerações F1 e F2, tem-se uma herança multigeracional (SKINNER, 2008). No entanto, CHAMORRO-GARCIA e colaboradores (2013) demonstraram que a exposição ao TBT gerou efeitos prejudiciais metabólicas até a geração F3, sendo, portanto, uma herança transgeracional e permanente (ANWAY; SKINNER, 2006; JIRTLE; SKINNER, 2007).

Desta forma, verificamos que a exposição direta aos OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, confere características da SOP e sub-fertilidade às ratas adultas e modificação do perfil lipídico após estabelecimento da gravidez, enquanto que a transferência vertical aos fetos da geração F1 resulta em distúrbios lipídicos hepáticos de ambos os gêneros, como sintetizado na Figura 26.

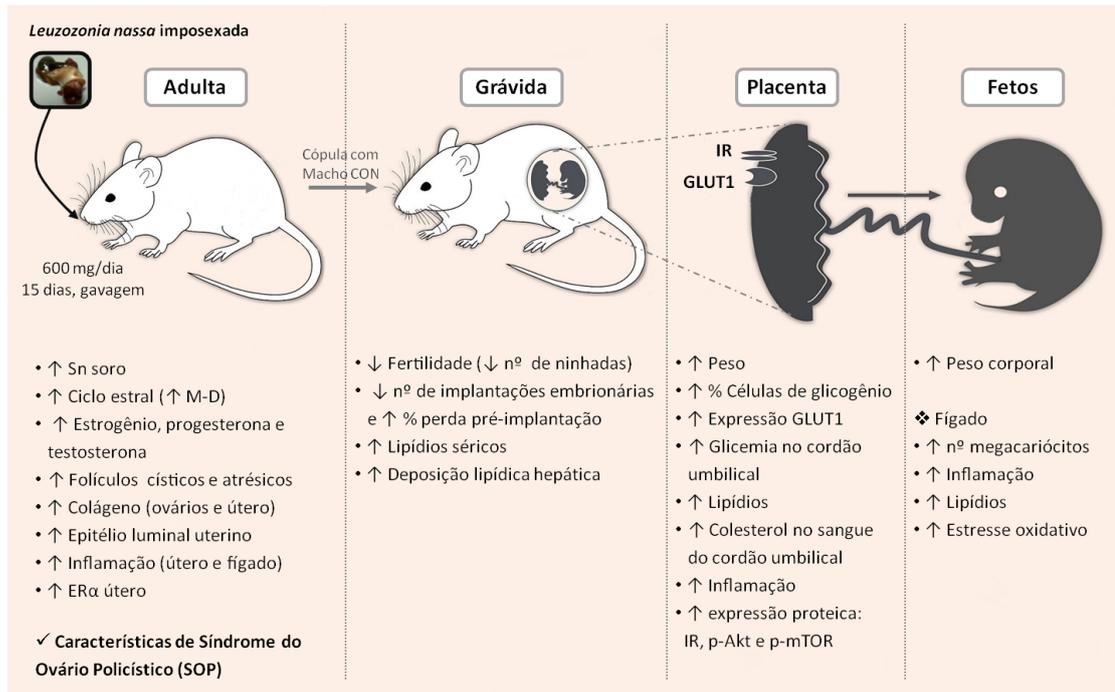


Figura 26: Esquema resumindo os efeitos tóxicos dos OTs observados neste estudo. A exposição de ratas adultas aos OTs, por meio da ingestão de moluscos contaminados, produz efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo destas fêmeas e gera heranças adaptativas ao período gestacional e à formação da placenta, interferindo no crescimento dos fetos.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo indicam que:

1. Em ratas adultas, os OTs provenientes da ingestão de moluscos contaminados, geram disfunções reprodutivas características da SOP, como hiperandrogenismo, irregularidade no ciclo estral e aumento de folículos císticos/atresia ovariana, que refletem na redução da fertilidade, porém, não há alteração no perfil energético glicêmico e lipídico;
2. Quando engravidam, as ratas expostas aos OTs no período pré-gestacional, passam a apresentar hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e deposição lipídica hepática;
3. A formação da placenta de ratas expostas aos OTs é diferenciada, com desorganização da zona basal, acúmulo de lipídios e inflamação, além de superexpressão do GLUT1 e das proteínas reguladoras IR β , p-Akt e p-mTOR;
4. O estado lipídico materno e as modificações placentárias refletem no maior crescimento dos fetos de ambos os gêneros, e em danos à estrutura do fígado, que apresenta maior concentração de lipídios, inflamação e estresse oxidativo.

Assim, este trabalho gerou conhecimento sobre parâmetros reprodutivos, energéticos, placentários e de herança aos fetos do 1º modelo de biotransferência dos OTs para mamíferos.

8 REFERÊNCIAS

ABIDLI, S., SANTOS, M.M., LAHBIB, Y., CASTRO, L.F.C., REIS-HENRIQUES, M.A., TRIGUI EL MENIF, N. Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): imposex induction and sex hormone levels insights. **Ecological Indicators**, v. 13, p. 13–21, 2012.

ABOT, A., FONTAINE, C., RAYMOND-LETRON, I., FLOURIOT, G., ADLANMERINI, M., BUSCATO, M., OTTO, C., BERGÈS, H., LAURELL, H., GOURDY, P., LENFANT, F., ARNAL, J.F. The AF-1 Activation Function of Estrogen Receptor α Is Necessary and Sufficient for Uterine Epithelial Cell Proliferation In Vivo. **Endocrinology**, v. 154(6), p. 2222–2233, 2013.

ABRUZZESE, G.A., HEBER, M.F., FERREIRA, S.R., VELEZ, L.M., REYNOSO, R., PIGNATARO, O.P., MOTTA, A.B. Prenatal hyperandrogenism induces alterations that affect liver lipid metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 230(1), p. 67-79, 2016.

ACEVEDO, C.G., MÁRQUEZ, J.L., ROJAS, S., BRAVO, I. Insulin and nitric oxide stimulates glucose transport in human placenta. **Life Sciences**, v. 76, p. 2643–2653, 2005.

ADEEKO, A., LI, D., FORSYTH, D.S., CASEY, V., COOKE, G.M., BARTHELEMY, J., CYR, D.G., TRASLER, J.M., ROBAIRE, B., HALES, B.F. Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. **Journal of Toxicology Science**, v, 74, p. 407–415, 2003.

AERTS, L., VAN ASSCHE, F.A. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.38(5–6), p. 894-903, 2006.

AHBAB, M.A., GÜVEN, C., KOÇKAYA, E.A., BARLAS, N. Comparative developmental toxicity evaluation of di-n-hexyl phthalate and dicyclohexyl phthalate in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33(9), p. 696–716, 2017.

AKISON, L.K., NITERT, M.D., CLIFTON, V.L., MORITZ, K.M., SIMMONS, D.G. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. **Placenta**, v. 54, p. 52-58, 2017.

ALZIEU, C. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & Coastal Management**, v. 40, p. 23–26, 1998.

ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, v. 258(1–2), p. 99–102, 2000.

ALZIEU, C., MICHEL, P., TOLOSA, I., BACCI, E., MEE, L.D., READMAN, J.W. Organotin compounds in the Mediterranean: a continuing cause for concern. **Marine Environmental Research**, v. 32, p. 261–70, 1991.

AMALFI, S., VELEZ, L.M., HEBER, M.F., VIGHI, S., FERREIRA, S.R., OROZCO, A.V., PIGNATARO, O., MOTTA, A.B. Prenatal hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depend on the levels of testosterone exposure. **PLoS One**, v. 7(5), p. e37658, 2012.

ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1221-1231, 2002.

ANTIZAR-LADISLAO, B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment International**, v. 34(2), p. 292–308, 2008.

ANWAY, M.D., SKINNER, M.K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. **Endocrinology**, v. 147 (6), p. 43–49, 2006.

ARAUJO, F.A., ROCHA, M.A., MENDES, J.B., ANDRADE, S.P. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 29–34, 2010.

ARAÚJO, J.F.P., PODRATZ, P.L., SENA, G.C., MERLO, E., FREITAS-LIMA, L.C., AYUB, J.G.M., PEREIRA, A.F.Z., SANTOS-SILVA, A.P., MIRANDA-ALVES, L., SILVA, I.V., GRACELI, J.B. The obesogen tributyltin induces abnormal ovarian adipogenesis in adult female rats. **Toxicology Letters**, v. 295, p. 99–114, 2018.

ARESU, L., BENALI, S., GIANNUZZI, D., MANTOVANI, R., CASTAGNARO, M., FALOMO, M.E. The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. **Journal of Veterinary Science**, v. 13(2), p. 171-177, 2012.

ARTINI, P.G., MONTI, M., MATTEUCCI, C., VALENTINO, V., CRISTELLO, F., GENAZZANI, A.R. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. **Gynecological Endocrinology**, v. 22, p. 465–470, 2006.

AZZIZ, R. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 781-785, 2006.

BAHCECI, M., AYDEMIR, M., TUZCU, A. Effects of oral fat and glucose tolerance test on serum lipid profile, apolipoprotein, and CRP concentration, and insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 87, p. 1363–1368, 2007.

BAILEY, S.K., DAVIES, I.M. The effects of tributyltin on dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Scottish coastal waters. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 69(2), p. 335–354, 1989.

BAIRD, A., WEHREBERG, W.B., BOHLEN, P., LING, N. Immunoreactive and biologically active growth hormone-releasing factor in the rat placenta. **Endocrinology**, v. 117, p. 1598, 1985.

BAPTISTE, C.G., BATTISTA, M.C., TROTTIER, A., BAILLARGEON, J.P. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p. 42–52, 2010.

BARBOUR, L.A., MCCURDY, C.E., HERNANDEZ, T.L., KIRWAN, J.P., CATALANO, P. M., FRIEDMAN, J. E. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 30(2), p. S112-119, 2007.

BARCELOS, L.S., TALVANI, A., TEIXEIRA, A.S., VIEIRA, L.Q., CASSALI, G.D., ANDRADE, S.P., TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 352–358, 2005.

BARKER, D.J.P., OSMOND, C., GOLDING, J., KUH, D., WADSWORTH, M.E.J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **British Medical Journal**, v. 298, p. 564-567, 1989.

BARREIRO, R., GONZALEZ, R., QUINTELA, M., RUIZ, J.M. Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. **Marine Ecology Progress Series**, v. 218, p. 203–212, 2001.

BAUER, M.K., HARDING, J.E., BASSETT, N.S., BREIER, B.H., OLIVER, M.H, GALLAHER, B.H., EVANS, P.C., WOODALL, S.M., GLUCKMAN, P.D. Fetal growth and placental function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 115–120, 1998.

BAUMANN, M.U., DEBORDE, S., ILLSLEY, N.P. Placental glucose transfer and fetal growth. **Endocrine**, v. 19, p. 13–22, 2002.

BENNETT, R.F. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In: De Mora, S. J. (Ed). **Tributyltin: a case study of an Environmental Contaminant**. Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge Univ. Press. Cambridge, p.21-61, 1996.

BERTULOSO, B.D., PODRATZ, P.L., MERLO, E., ARAÚJO, J.F.P., LIMA, L.C.F., MIGUEL, E.C., de Souza, L.N., GAVA, A.L., OLIVEIRA, M., MIRANDA-ALVES, L., CARNEIRO, M.T.W.D., NOGUEIRA, C.R., GRACELI, J.B. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**, v. 235, p. 45–59, 2015.

BJERRE, A., OVSTEBØ, R., KIERULF, P., HALVORSEN, S., and BRANDTZAEG, P. Fulminant meningococcal septicemia: dissociation between plasma thrombopoietin levels and platelet counts. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 643–647, 2000.

BLABER, J.M. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. **Proceedings of Malacological Society of London**, v. 39. p. 231-233, 1970.

BLANCK, H., DAHL, B. Recovery of marine periphyton communities around a Swedish marina after the ban of TBT use in antifouling paints. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36(6), p. 437–443, 1998.

BLUNDEN, S.J., EVANS, C.J. In: **The Handbook of Environmental Chemistry**; Hutzinger, O. Springer-Verlag: Berlin, v. 3, 1990.

BO, E. FARINETTI, A., MARRAUDINO, M., STERCHELE, D., EVA, C., GOTTI, S., PANZICA, G. Adult exposure to tributyltin affects hypothalamic neuropeptide Y, Y1 receptor distribution, and circulating leptin in mice. **Andrology**, v. 4(4), p. 723-734, 2016.

BOGOVICH, K. Induction of follicular cysts in rat ovaries by prolonged administration of human chorionic gonadotropin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 219, p. 659–656, 1987.

BORGEEST, C., SYMONDS, D., MAYER, L.P., HOYER, P.B., FLAWS, J. A. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. **Toxicological Sciences**, v. 68, p. 473–478, 2002.

BOSQUIAZZO, V.L., RAMOS, J.G., VARAYOUD, J., MUÑOZ-DE-TORO, M., LUQUE, E.H. Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. **Reproduction**, v. 133(5), p. 1045-1055, 2007.

BOUILLOT, S., RAMPON, C., TILLET, E., HUBER, P. Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. **Placenta**, v. 27(8), p. 882-888, 2006.

BOUMOSLEH, J.M., GRUNDY, S.M., PHAN, J., NEELAND, I.J., CHANG, A., VEGA, G.L. Metabolic concomitants of obese and nonobese women with features of polycystic ovarian syndrome. **Journal of the Endocrine Society**, v. 1, p. 1417–1427, 2017.

BRETT, K.E., FERRARO, Z.M., Yockell-LELIEVRE, J., Gruslin, A., ADAMO, K.B. Maternal–Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 16153-16185, 2014.

BROWNING, J.D., HORTON, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 147-152, 2004.

BRTKO, J., DVORAK, Z. Triorganotin compounds – ligands for "rexinoid" inducible transcription factors: biological effects. **Toxicology Letters**, v. 234, p. 50–58, 2015.

BRYAN, G.W., GIBBS, P.E. Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In: Newman MC, McIntosh AW (eds) *Metal ecotoxicology: concepts and applications*. **Lewis Publishers**, p. 323–361, 1991.

BRYAN, G.W., GIBBS, P.E., BURT, G.R., HUMMERSTONE, L.G. The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dogwhelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 67(3), p. 525–544, 1987.

BRYAN, G.W., GIBBS, P.E., HUMMERSTONE, L.G., BURT, G.R. 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, p. 611–640, 1986.

BULUN, S.E., ADASHI, E.Y. Fisiologia e Patologia do eixo reprodutivo feminino. In: **Williams, Tratado de Endocrinologia**. P. Reed Larsen, Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky. Elsevier. 11ª edição, 2010.

BURD, P.R., ROGERS, H.W., GORDON, J.R., MARTIN, C.A., JAYARAMAN, S., WILSON, S.D., DVORAK, A.M., GALLI, S.J., DORF, M.E. Interleukin 3-dependent and -independent mast cell stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, p. 245–257, 1989.

BURNS, S.P., DESAI, M., COHEN, R.D., HALES, C.N., ILES, R.A., GERMAIN, J.P., GOING, T.C., BAILEY, R.A. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 1768–1774, 1997.

BUTTE, N.F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1256–1261, 2000.

CADARIO, M.E., LOSINNO, L., GIGUERE, S., AGUILAR, J., MACPHERSON, M., FITZPATRICK, C., UHL, E. Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 449–452, 2002.

CARRIZO, D.G., RASTRILLA, A.M., TELLERÍA, C.M., AGUADO, L.I. Androstenedione stimulates progesterone production in corpora lutea of pregnant rats: an effect not mediated by oestrogen. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51(3-4), p. 191-197, 1994.

CARSON, D.D., BAGCHI, I., DEY, SK., ENDERS, A.C., FAZLEABAS, A.T., LESSEY, B.A., YOSHINAGA, K. Embryo implantation. **Developmental Biology**, v. 223(2), p. 217–237, 2000.

CARTER, A.M. Animal models of human placentation - a review. **Placenta**, v. 28, p. S41–S47, 2007.

CARTER, A.M., ENDERS, A.C., JONES, C.J., MESS, A., PFARRER, C., PIJNENBORG, R., SOMA, H. Comparative placentation and animal models: patterns of trophoblast invasion – a workshop report. **Placenta**, v. 27, p. S30–S33, 2006.

CETIN, I., MARCONI, A.M., CORBETTA, C., LANFRANCHI, A., BAGGIANI, A.M., BATTAGLIA, F.C., PARDI, G. Fetal amino acids in normal pregnancies and in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. **Early Human Development**, v. 29, p. 183–186, 1992.

CHALLIER, J.C., BASU, S., BINTEIN, T. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. **Placenta**, v. 29(3), p. 274–281, 2008.

CHAMORRO-GARCÍA, R., SAHU, M., ABBEY, R.J., LAUDE, J., PHAM, N., BLUMBERG, B. 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, p. 359-366, 2013.

CHAN, S.W.C., LEATHERN, J.H. Placental steroidogenesis in the rat: comparison of normal and giant placentae. **Endocrinology**, v. 100, p. 1418-1422, 1977.

CHEN, Y.W., LAN, K.C., TSAI, J.R., WENG, T.I., YANG, C.Y., LIU, S.H. Tributyltin exposure at noncytotoxic doses dysregulates pancreatic beta-cell function in vitro and in vivo. **Archives of Toxicology**, v. 91, p. 3135–3144, 2017.

CHU, Y., XU, Y., YANG, W., SUN, Y. The role of FSH and TGF- β superfamily in follicle atresia. **Aging**, v. 10(3), p. 305–321, 2018.

COLBORN, T., VOM SAAL, F.S., SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378–384, 1993.

COLOMIERE, M., PERMEZEL, M., RILEY, C., DESOYE, G., LAPPAS, M. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. **European Journal of Endocrinology**, v. 160, p. 567–578, 2009.

CONAMA (2005) CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução Nº 357**, 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 24 de outubro de 2018.

CONNELLY, O.M., MULAC-JERICEVIC, B., DEMAYO, F., LYDON, J.P., O'MALLEY, B.W. Reproductive functions of progesterone receptors. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 339–355, 2002.

CONWAY, G. S., AGRAWAL, R., BETTERIDGE, D.J., JACOBS, H.S. Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 37, p. 119–125, 1992.

COOKE, G.M. Effect of organotins on human aromatase activity in vitro. **Toxicology Letters**, v. 126, p. 121–130, 2002.

COOKE, G.M., FORSYTH, D.S., BONDY, G.S., TACHON, R., TAGUEC, B., COADY, L. Organotin Speciation and Tissue Distribution in Rat Dams, Fetuses, and Neonates Following Oral Administration of Tributyltin Chloride. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 71, p. 384-395, 2008.

COSTA, M.B., FERNANDEZ, M.A., BARBIERO, D.C., MELO, F.T.V., OTEGUI, M.B.P., FERREIRA, B.S. First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 56, p. 145-148, 2008A.

COSTA, M.B., OTEGUI, M.B.P., BARBIERO, D.C., FERNANDEZ, M.A.S. Occurrence of imposex in *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda: Ranellidae) in Vitoria, ES, Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, p. 65–69, 2008B.

COSTA, M.B. **Avaliação da contaminação por compostos organoestânicos (COEs) no litoral do Espírito Santo por meio de indicadores biológicos, imposex e intersex: uma análise espacial e temporal**. Tese (Doutorado em Oceanografia Ambiental) – Programa de pós-graduação em Oceanografia Ambiental do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

COSTA, M.B., ZAMPROGNO, G.C., PEDRUZZI, F.C., DALBEM, G.B., TOGNELLA, M.M.P. 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. 203, 2013.

COSTA, M.B., MARDEGAN, B.S., ZAMPROGNO, G.C., PEDRUZZI, F.C., DE MORAES, L., DALBEM, G.B., DA SILVA, D.A., GRACELI, J.B. Penis Malformations in *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1792) and *Leucozonia ocellata* (Gmelin, 1791) in a TBT Contaminated Region from Brazil. **Aquatic Science and Technology**, v. 2(2), p. 52-66, 2014.

CROY., B.A., ASHKAR, A.A., MINHAS, K., GREENWOOD, J.D. Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7(1),p. 12-20, 2000.

DAMASCENO, D.C., KEMPINAS, W.G., VOLPATO, G.T., CONSONNI, M., RUDGE, M.V.C., PAUMGARTTEN, F.J.R. Modelos experimentais. In: **Anomalias Congênitas - Estudos Experimentais**. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.

DAVIES, J., GLASSER, S.R. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. **Acta Anatomica**, v. 69, p. 542–608, 1968.

DEN BOER, M., VOSHOL, P.J., KUIPERS, F., HAVEKES, L.M., ROMIJN, J.A. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 644-649, 2004.

DESOYE, G., HARTMANN, M., BLASCHITZ, A., DOHR, G., HAHN, T., KOHNEN, G., KAUFMANN, P. Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern. **Histochemistry**, v. 101, p. 277–285, 1994.

DESOYE, G., SCHWEDITSCH, M.O., PREIFFER, K.P., ZECHNER, R., KOSTNER, G.M. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 64, p. 704-712, 1987.

DEY, S.K., LIM, H., DAS, S.K., REESE, J., PARIJA, B.C., DAIKOKU, T., WANG, H. Molecular cues to implantation. **Endocrine Reviews**, v. 25(3), p. 341–373, 2004.

DIAMANT, Y.Z., DIAMANT, S., FREINKEL, N. Lipid Deposition and Metabolism in Rat Placenta During Gestation. **Placenta**, v. 1, p. 319-325, 1980.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., KOULI, C.R., BERGIELE, A.T., FILANDRA, F.A., TSIANATELI, T.C., SPINA, G.G., ZAPANTI, E.D., BARTZIS, M.I. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek Island of Lesbos: Hormonal and metabolic profile. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 4006–4011, 1999.

DIMASUAY, K.G., BOEUF, P., POWELL, T.L., JANSSON, T. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 12, 2016.

DOERING, D.D., STECKELBROECK, S., DOERING, T., KLINGMULLER, D. Effects of butyltins on human 5alpha-reductase type 1 and type 2 activity. **Steroids**, v. 67, p. 859-867, 2002.

DPC (2007) DIREÇÃO DE PORTOS E COSTAS, Marinha do Brasil. **Decreto Portaria Nº. 76/DPC**, 30 de julho de 2007. Standards maritime authority for the control of anti-fouling systems on ships - NORMAN 23/DPC. Disponível em: <<https://www.dpc.mar.mil.br/sites/default/files/normam23.pdf>>. Acesso em 24 de outubro de 2018.

DUBE, E., ETHIER-CHIASSON, M., LAFOND, J. Modulation of cholesterol transport by insulin-treated gestational diabetes mellitus in human full term placenta. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 16, 2013.

DUBOIS, S.L., ACOSTA-MARTÍNEZ, M., DEJOSEPH, M.R., WOLFE, A., RADOVICK, S., BOEHM, U., URBAN, J.H., LEVINE, J.E. Positive, but not negative feedback actions of estradiol in female mice require estrogen receptor α (ER α) in kisspeptin neurons. **Endocrinology**, v. 156(3), p. 1111-1120, 2015.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis 1. **Endocrine Reviews**, v. 18, p. 774–800, 1997.

EHRMANN, D.A. Polycystic ovary syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1223–1236, 2005.

EJIRI, N., KATAYAMA, K., NAKAYAMA, H., DOI, K. Expression of cytochrome P450 (CYP) isozymes in rat placenta through pregnancy. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 53, p. 387–391, 2001.

ELVIN, J.A., MATZUK, M.M. Mouse models of ovarian failure. **Reviews of Reproduction**, v. 3(3), p. 183- 195, 1998.

EMA, M., MIYAWAKI, E. Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 309–317, 2002.

EMA, M., MIYAWAKI, E., HARAZONO, A., OGAWA, Y. Effects of triphenyltin chloride on implantation and pregnancy in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 11, p. 201–206, 1997.

EMA, M., MIYAWAKI, E., KAWASHIMA, K. Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats. **Toxicology Letters**, v. 108, p. 17–25, 1999.

EMORI, C., SUGIURA, K. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. **Animal Science Journal**, v. 85(6), p. 627-633, 2014.

ENDERS, A.C., BLANKENSHIP, T.N. Comparative placental structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 38, p. 3–15, 1999.

EPA-USA - United States Environmental Protection Agency. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: an effects assessment and analysis. Washington, DC: U. S. **Environmental Protection Agency**. Report No. EPA/630/R-96/012, 1997.

ESSAH, P.A., NESTLER, J.E. The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 29, p. 270–280, 2006.

EVANS, S.M., LEKSONO, T., MCKINNEL. P.D. Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based antifouling paints. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30(1), p. 14–21, 1995.

FAMILIARI, G., TOSCANO, V., MOTTA, P.M. Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone. **Cell and Tissue Research**, v. 240(3), p. 519–528, 1985.

FARAH, R., KHAMISY-FARAH, R. Significance of MPV, RDW with the presence and severity of metabolic syndrome. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 123(9), p. 567-570, 2015.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 26, p. 1–117, 1996.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 353-365, 2003.

FERNANDEZ. M.A., LIMAVERDE, A.M., CASTRO, I.B., TERRA, A.C., WAGENER, A.L. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: evidences of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 18(2): 463-476, 2002.

FERNANDEZ, M.A., LIMAVERDE, A.M., SCOFIELDS, A.L., WAGENER, A.L.R. Preliminary evaluation of human health risks from ingestion of organotin contaminated seafood in Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, p. 75-77, 2005.

FERNANDEZ, M.A., PINHEIRO, F.M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **International Journal of Environment and Health**, v. 1(3), p. 427–48, 2007.

FIELDS, M.J., FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v.45, p.1295-1325, 1996.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES A.P.R., AMORIM C.A., SILVA J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, p. 303-327, 2008.

FILARDO, E.J., QUINN, J.A., FRACKELTON, JR.A.R., BLAND, K.I. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. **Molecular Endocrinology**, v. 16, p. 70–84. 2002.

FILICORI, M., SANTORO, N., MERRIAM, G.R., CROWLEY, W.F.JR. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 62, p. 1136–1144, 1986.

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226(1), p. 497-509, 1957..

FOLKMAN, J. Angiogenesis: initiation and control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 401, p. 212–227, 1982.

FORSYTH, D.S., JAY, B. Organotin leachates in drinking water from chlorinated poly(vinyl chloride) (CPVC) pipe. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 11(7), p. 551–558, 1997.

FOWDEN, A.L., WARD, J.W., WOODING, F.P., FORHEAD, A.J., CONSTANCIA, M. Programming placental nutrient transport capacity. **The Journal of Physiology**, n. 572, p. 5–15, 2006.

FRANCI, C.R., ANSELMO-FRANCI, J.A., Gônadas: Sistema reprodutor feminino. In: **Fisiologia**, AIRES, M.M. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2012.

FRANKS, S. Polycystic ovary syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 853–861, 1995.

FRANKS, S., BERGA, S.L. Does PCOS have developmental origins? **Fertility and Sterility**, v. 97(1), p. 2–6, 2012.

FRANKS, S., STARK, J., HARDY, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 367–378, 2008.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. **Physiology of Reproduction**, v. 45, p. 613–665, 1994.

FREINKEL, N. Effects of conceptus on maternal metabolism during pregnancy. In *On the Nature and Treatment of Diabetes* (Ed.) Leibel, B. S. & Wrenshall, G. A. Amsterdam: **Excerpta Medica Foundation**, p. 679–691, 1965.

FRISTACHI, A., XU, Y., RICE, G., IMPELLITTERI, C.A., CARLSON-LYNCH, H., LITTLE, J.C. Using probabilistic modeling to evaluate human exposure to organotin in drinking water transported by polyvinyl chloride pipe. **Risk Analysis**, v. 29(11), p. 1615–1628, 2009.

FROMME, H., MATTULAT, A., LAHRZ, T., RUDEN, H. Occurrence of organotin compounds in house dust in Berlin (Germany). **Chemosphere**, v. 58(10), p. 1377–1383, 2005.

FUKUSHIMA, N., SATOH, T., SANO, M., TOKUNAGA, O. Angiogenesis and mast cells in non-Hodgkin's lymphoma: a strong correlation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**, v. 42, p. 709–720, 2001.

FURUKAWA, S., HAYASHI, S., ABE, M., HAGIO, S., IRIE, K., KURODA, Y., OGAWA, I., SUGIYAMA, A. Background data on developmental parameters during the gestation period in rats. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, p. 83–88, 2013

FURUKAWA, S., HAYASHI, S., USUDA, K., ABE, M., HAGIO, S., OGAWA, I. Toxicological pathology in the rat placenta. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 24, p. 95–111, 2011.

FURUKAWA, S., TSUJI, N., KOBAYASHI, Y., YAMAGISHI, Y., HAYASHI, S., ABE, M., KURODA, Y., KIMURA, M., HAYAKAWA, C., SUGIYAMA, A. Effect of dibutyltin on placental and fetal toxicity in rat. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 42(6), p. 741-753, 2017.

FURUKAWA, S., KURUDA, Y., SUGIYAMA, A. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27(1), p. 11–18, 2014.

GACCIOLI, F., WHITE, V., CAPOBIANCO, E., POWELL, T.L., JAWERBAUM, A., JANSSON, T. Maternal overweight induced by a diet with high content of saturated fat activates placental mTOR and eIF2 alpha signaling and increases fetal growth in rats. **Biology of Reproduction**, v. 89, p. 96, 2013.

GAMBARIN–GELWAN, M., KINKHABWALA, S.V., SCHIANO, T.D., BODIAN, C., YEH, H., FUTTERWEIT, W. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p. 496–501, 2007.

GARAVENTA, F., PELLIZZATO, F., FAIMALI, M., TERLIZZI, A., MEDAKOVIC, D., GERACI, S., PAVONI, B. Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. **Hydrobiologia**, v. 555, p. 281–287, 2006.

GARCÍA-MONZÓN, C., MARTÍN-PÉREZ, E., IACONO, O.L., FERNÁNDEZ-BERMEJO, M., MAJANO, P.L., APOLINARIO, A., LARRAÑAGA, E., MORENO-OTERO, R. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. **Journal of Hepatology**, v. 33(5), p. 716-724, 2000.

GIBSON, C.P., WILSON, S.P. Imposex still evident in eastern Australia 10 years after tributyltin restrictions. **Marine Environmental Research**, v. 55, p. 101–112, 2003.

GLASSER, S.R., MULHOLLAND, J., JULIAN, J., MANI, S. Blastocyst-endometrial relationships:reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocysts. **Trophy Research**, v. 5, p. 229–280, 1991.

GODOI, A.F.L., FAVORETO, R., SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, v. 26, p. 708–716, 2003.

GOFFIN, V., BINART, N., TOURAINE, P., KELLY, P.A. Prolactin: the new biology of an old hormone. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 47–67, 2002.

GOODING, M.P., LEBLANC, G.A. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, p. 172–180, 2001.

GORDON, M.C., ZIMMERMAN, P.D., LANDON, M.B., GABBE, S.G., KNISS, D.A. Insulin and glucose modulate glucose transporter messenger ribonucleic acid expression and glucose uptake in trophoblast isolated from first-trimester chorionic villi. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, p. 1089–1097, 1995.

GRONDIN, M., MARION, M., DENIZEAU, F., AVERILL-BATES, D.A. Tributyltin induces apoptotic signaling in hepatocytes through pathways involving the endoplasmic reticulum and mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222(1), p. 57–68, 2007.

GROTE, K., STAHLSCHMIDT, B., TALSNESS, C.E., GERICKE, C., APPEL, K.E., CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p. 145-158, 2004.

GROTE, K., ANDRADE, A. J., GRANDE, S. W., KURIYAMA, S. N., TALSNESS, C. E., APPEL, K. E., CHAHOUD, I. Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. **Toxicology**, v. 222, p. 17–24, 2006.

GRÜN, F. The obesogen tributyltin. **Vitamins and Hormones**, v. 94, p. 277–325, 2014.

GRÜN, F., WATANABE, H., ZAMANIAN, Z., MAEDA, L., ARIMA, K., CUBACHA, R., GARDINER, D.M., KANNO, J., IGUCHI, T., BLUMBERG, B. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Molecular Endocrinology**, v. 20(9), p. 2141-2155, 2006.

GU, X., MANAUTOU, J.E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 14, p. e4, 2012.

GUARD, H.B., COBERT, A.B., COLEMAN, W.M. Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. **Science**, v. 213, p. 70-771, 1981.

GUERREIRO, D.M., CARVALHO, A.D., LIMA, L.F., RODRIGUES, G.Q., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotécnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. **Reprodução & Climatério**, v. 30(2), p. 90–99, 2015.

GURAYA, S.S. Histochemical observations on the interstitial glands cells of dogfish ovary. **General and Comparative Endocrinology**, v. 18, p. 409, 1972.

GUSTAFSSON, J.A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p.479–485, 2003.

HANNON, P.R., FLAWS, J.A. The effects of phthalates on the ovary. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. 8, 2015.

HARA, K., YOSHIZUKA, M., FUJIMOTO, S. Toxic effects of bis (tributyltin) oxide on the synthesis and secretion of zymogen granules in the rat exocrine pancreas. **Archives of Histology and Cytology**, v. 57, p. 201–212, 1994.

HARAZONO, A., EMA, M., OGAWA, Y. Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, p. 224–230, 1996.

HAY, N., SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & Development**, v. 18(16), p. 1926-1945, 2004.

HE, K., ZHANG, J., CHEN, Z. Effect of tributyltin on the food intake and brain neuropeptide expression in rats. **Endokrynologia Polska**, v. 65, p. 485–490, 2014.

HE, W., LI, X., Adekunbi, D., LIU, Y., LONG, H., WANG, L., LYU, Q., KUANG, Y., O'Byrne, K.T. Hypothalamic effects of progesterone on regulation of the pulsatile and surge release of luteinising hormone in female rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 8096, 2017.

HEBEL, R., STROMBERG, M.W. Anatomy and embryology of the laboratory rat. Wörthsee: **BioMed Verlag**, p. 231– 257, 1986.

HEIDRICH, D.D., STECKELBROECK, S., KLINGMULLER, D. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. **Steroids**, v. 66, p. 763–769, 2001.

HEITS, F., STAHL, M., LUDWIG, D., STANGE, E.F., JELKMANN, W. Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, p. 757–760, 1999.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, p. 43–55, 2002.

HERRERA, E., AMUSQUIVAR, E., LÓPEZ-SOLDADO, I., ORTEGA, H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. **Hormone Research**, v. 65(3), p. 59-64, 2006.

HIDEN, U., LANG, I., GHAFARI-TABRIZI, N., GAUSTER, M., LANG, U., DESOYE, G. Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy. **Current Vascular Pharmacology**, v. 7, p. 460-466, 2009.

HIGGINS, L., GREENWOOD, S.L., WAREING, M., SIBLEY, C.P., MILLS, T.A. Obesity and the placenta: A consideration of nutrient exchange mechanisms in relation to aberrant fetal growth. **Placenta**, v. 32, p. 1–7, 2011.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment – an overview. **Applied Geochemistry**, v. 16, p. 719–743, 2001.

HORAN, M.K., MCGOWAN, C.A., GIBNEY, E.R., DONNELLY, J.M., MCAULIFFE, F.M. Maternal low glycaemic index diet, fat intake and postprandial glucose influences neonatal adiposity – secondary analysis from the ROLO study. **Nutrition Journal**, v. 13, p. 78, 2014.

HORIGUCHI, T. Ecotoxicological impacts of organotins: an overview. In: Alessandra Pagliarani, Fabiana Trombetti, Ventrella V (eds) Biochemical and biological effects of organotins, v. 1. **Bentham Science**, p 3–24, 2012.

HSU, M. Clinical characteristics in Taiwanese women with polycystic ovary syndrome. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42(3), p. 86-93, 2015.

HSUEH, A.J.W., KAWAMURA, K., CHENG, Y., FAUSER, B.C.J. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 36(1), p. 1–24, 2015.

HU, M., RICHARD, J.E., MALIQUEO, M., KOKOSAR, M., FORNES, R., BENRICK, A., JANSSON, T., OHLSSON, C., WU, X., SKIBICKA, K.P., STENER-VICTORIN, E. Maternal testosterone exposure increases anxiety-like behavior and impacts the limbic system in the offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 112(46), p. 14348-14353, 2015.

HUANG-DORAN, I., FRANKS, S. Genetic Rodent Models of Obesity-Associated Ovarian Dysfunction and Subfertility: Insights into Polycystic Ovary Syndrome. **Frontiers in Endocrinology** (Lausanne), v. 7, p. 53, 2016.

HUTT, K.J., MCLAUGHLIN, E.A., HOLLAND, M.K. KIT/KIT Ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 421–433, 2006.

HUTZ, R.J., DIERSCHKE, D.J., WOLF, R.C. Role of estradiol in regulating ovarian follicular atresia in rhesus monkeys: a review. **Journal of Medical Primatology**, v. 19(6), p. 553-571, 1990.

INOKI, K., ZHU, T., GUAN, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, p. 577–590, 2003.

ITAMI, T., EMA, M., AMANO, H., MURAI, T., KAWASAKI, H. Teratogenic Evaluation of Tributyltin Chloride in Rats Following Oral Exposure. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 13(4), p. 283-295, 1980.

ITAMI, T., EMA, M., AMANO, H., MURAI, T., KAWASAKI, H. Teratogenic evaluation of tributyltin chloride in rats following oral exposure. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 13, p. 283–295, 1990.

JAYABALAN, N., NAIR, S., NUZHAT, Z., RICE, G.E., ZUÑIGA, F.A., SOBREVIA, L., LEIVA, A., SANHUEZA, C., GUTIÉRREZ, J.A., LAPPAS, M., FREEMAN, D.J., SALOMON, C. Cross Talk between Adipose Tissue and Placenta in Obese and Gestational Diabetes Mellitus Pregnancies via Exosomes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 239, 2017.

JAKUBOWICZ, D.J., IUORNO, M.J., JAKUBOWICZ, S., ROBERTS, K.A., NESTLER, J.E. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87(2), p. 524-529, 2002.

JANSSON, T. Amino acid transporters in the human placenta. **Pediatric Research**, v. 49, p. 141–147, 2001.

JANSSON, T., ILLSLEY, N.P. Osmotic water permeabilities of human placental microvillous and basal membranes. **The Journal of Membrane Biology**, v. 132, p. 147–155, 1993.

JANSSON, T.; POWELL, T.L. Role of placental nutrient sensing in developmental programming. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 56, p. 591–601, 2013.

JANSSON, T., POWELL, T.L. IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: Does the placenta function as a nutrient sensor?—A review. **Placenta**, v. 27, p. S91–S97, 2006.

JANSSON, N., GREENWOOD, S.L., JOHANSSON, B.R., POWELL, T.L., JANSSON, T. Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 1205–1211, 2003.

JANSSON, N., PETTERSSON, J., HAAFIZ, A., ERICSSON, A., PALMBERG, I., TRANBERG, M., GANAPATHY, V., POWELL, T.L., JANSSON, T. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. **The Journal of Physiology**, v. 576, p. 935–946, 2006.

JANSSON, N., ROSARIO, F.J., GACCIOLI, F., LAGER, S., JONES, H.N., ROOS, S., JANSSON, T., POWELL, T.L. Activation of placental mTOR signaling and amino acid

transporters in obese women giving birth to large babies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, p. 105–113, 2013.

JENSEN, F., WOULDWYK, M., TELES, A., WOIDACKI, K., TARAN, F., COSTA, S., MALFERTHEINER, S.F., ZENCLUSSEN, A.C. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. **PLoS One**, v. 5(12), p. e14409, 2010.

JIRTLE, R.L., SKINNER, M.K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 253–262, 2007.

JOHANSSON, M., KARLSSON, L., WENNERGREN, M., JANSSON, T., POWELL, T.L. Activity and protein expression of Na⁺/K⁺ ATPase are reduced in microvillous syncytiotrophoblast plasma membranes isolated from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 2831–2837, 2003.

KANAYAMA, T., KOBAYASHI, N., MAMIYA, S., NAKANISHI, T., NISHIKAWA, J. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 766–774, 2005.

KANDARAKI, E., CHATZIGEORGIOU, A., LIVADAS, S., PALIOURA, E., ECONOMOU, F., KOUTSILIERIS, M., PALIMERI, S., PANIDIS, D., DIAMANTI-KANDARAKIS, E. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): Elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. E480–E484, 2011.

KANNAN, K., FALANDYSZ, J. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34(3), p. 203–207, 1997.

KANNAN, K., SENTHILKUMAR, K., GIESY, J.P. Occurrence of butyltin compounds in human blood. **Environmental Science & Technology**, v. 33(10), p. 1776–1779, 1999.

KANNAN, K., TAKAHASHI, S., FUJIWARA, N., MIZUKAWA, H., TANABE, S. Organotin compounds, including butyltins and octyltins, in house dust from Albany, New York, USA. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 901–907, 2010.

KAWANO, Y., COHEN, D.E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, p. 434-441, 2013.

KEITHLY, J.C., CARDWELL, R.D., HENDERSON, D.G. Tributyltin in seafood from Asia, Australia, Europe, and North America: assessment of human health risks. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 5, n. 2, p. 337–354, 1999.

KEZELE, P., SKINNER, M.K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. **Endocrinology**, v. 144(8), p. 3329–3337, 2003.

KHAN, K., SAHA, A.R. A Study on the Correlation between Cord Blood Glucose Level and the Apgar Score. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7(2), p. 308-3011, 2013.

KING, J.C. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 271–291, 2006.

KIRCHNER, S., KIEU, T., CHOW, C., CASEY, S., BLUMBERG, B. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 24, p. 526–539, 2010.

KIRWAN, J.P., HAUGUEL-DE MOUZON, S., LEPERCQ, J., CHALLIER, J.C., HUSTON-PRESLEY, L., FRIEDMAN, J.E., KALHAN, S.C., CATALANO, P.M. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. **Diabetes**, v. 51(7), p. 2207-2213, 2002.

KISHTA, O., ADEEKO, A., LI, D., LUU, T., BRAWER, J.R., MORALES, C., HERMO, L., ROBAIRE, B., HALES, B.F., BARTHELEMY, J., CYR, D.G., TRASLER, J.M. In utero exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 1–11, 2007.

KISS, A.C.I., WOODSIDE, B., FELÍCIO, L.F., ANSELMO-FRANCI, J., DAMASCENO, D.C. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. **Physiology & Behavior**, v. 107, p. 292–300, 2012.

KLINGER, M.H.F., JELKMANN, W. Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 22, p. 913–922, 2002.

KRAJNC, E.I., WESTER, P.W., LOEBER, J.G., VAN LEEUWEN, F.X., VOS, J.G., VAESSEN, H.A., VAN DER HEIJDEN, C.A. Toxicity of bis(tri-nbutyltin) oxide in the rat. I. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 75, p. 363–386, 1984.

KUHL, C. Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, p. B19–B26, 1998.

KUIPER, G.G.J.M., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, p. 5430-5925, 1996.

LAGER, S., JANSSON, N., OLSSON, A.L., WENNERGREN, M., JANSSON, T., POWELL, T.L. Effect of IL-6 and TNF- α on fatty acid uptake in cultured human primary trophoblast cells. **Placenta**, v. 32(2), p.121–127, 2011.

LANE, R.H., MACLENNAN, N.K., HSU, J.L., JANKE, S.M., PHAM, T.D. Increased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene expression in a rat model of intrauterine growth retardation and subsequent insulin resistance. **Endocrinology** v. 143, p. 2486–2490, 2002.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, p. 274–293, 2012.

LARQUE, E., DEMMELMAIR, H., KLINGLER, M., DE JONGE, S, BONDY, B., KOLETZKO, B. Expression pattern of fatty acid transport protein-1 (FATP-1), FATP-4 and heart-fatty acid binding protein (H-FABP) genes in human term placenta. **Early Human Development**, v. 82, p. 697–701, 2006.

LAWS, S.C., CAREY, S.A., FERRELL, J.M., BODMAN, G.J., COOPER, R.L. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. **Toxicological Sciences**, v. 54, p. 154-167, 2000.

LE, M.A., GRIMALDI, M., ROECKLIN, D., DAGNINO, S., VIVAT-HANNAH, V., BALAGUER, P., BOURGUET, W. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. **EMBO Reports**, v. 10, p. 367–373, 2009.

LEBBE, M., WOODRUFF, T.K. Involvement of androgens in ovarian health and disease. **Molecular Human Reproduction**, v.19(12), p. 828–837, 2013.

LEE, C.J., DO, B., KIM, J.K., YOON, Y. Pentobarbital and ketamine suppress serum concentrations of sex hormones in the female rat. **Journal of Anesthesia**, v. 14, p. 187–190, 2000.

LEGRO, R.S., ARSLANIAN, S.A., EHRMANN, D.A., HOEGER, K.M., MURAD, M.H., PASQUALI, R., WELT, C.K. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, p. 4565–4592, 2013.

LEMALE, J., BLOCH-FAURE, M., GRIMONT, A., EL ABIDA, B., IMBERT-TEBOUL, M., CRAMBERT, G. Membrane progesterin receptors alpha and gamma in renal epithelium. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, p. 2234-2240, 2008.

LEWANDOWSKI, K.C., KOMOROWSKI, J., O'CALLAGHAN, C.J., TAN, B.K., CHEN, J., PRELEVIC, G.M., RANDEVA, H.S. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in women with the polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91(3), p. 1173-1177, 2006.

LI, S., SONG, Z., SONG, M., QIN, J., ZHAO, M., YANG, Z. Impaired receptivity and decidualization in DHEA-induced PCOS mice. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38134, 2016.

LIM, H.J., WANG, H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120(4), p. 1004–1015, 2010.

LING, L., FENG, X., WEI, T., WANG, Y., WANG, Y., ZHANG, W., HE, L., WANG, Z., ZENG, Q., XIONG, Z. Effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS)-pretreated human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation on primary ovarian insufficiency in rats. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8(1), n. 283, 2017.

LINZER, D.I., FISHER, S.J. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 837–840, 1999.

LIU, L., MU, Y., HAN, W., WANG, C. Association of hypercholesterolemia and cardiac function evaluated by speckle tracking echocardiography in arabbit model. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, p. 128, 2014.

LO, S., ALLERA, A., ALBERS, P., HEIMBRECHT, J., JANTZEN, E., KLINGMULLER, D., STECKELBROECK, S. Dithioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 84, p. 569-576, 2003.

LONG, J.A., EVANS, H.M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memorial University of Newfoundland**, v. 6, p. 1-148, 1922.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUDGATE, J. Economic and Technological Impact of TBT Legislation on the USA Marine Industry. Proceedings, **The Oceans - An International Workplace Conference**, v. 4, p. 1309-1313, 1987.

MA, W.G, SONG, H., DAS, S.K., PARIA, B.C., DEY, S.K. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100(5), p. 2963–2968, 2003.

MA, X., FAN, L., MENG, Y., HOU, Z., MAO, Y.D., WANG, W., DING, W., LIU, J.Y. Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, p. 527–535, 2007.

MACUT, D., MICIC, D., CVIJOVIC, G., SUMARAC, M., KENDERESKI, A., ZORIC, S., PEJKOVIC, D. Cardiovascular risk in adolescent and young adult obese females with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 14(5), p. 1353–1359, 2001.

MAGIAKOU, M.A., MASTORAKOS, G., WEBSTER, E., CHROUSOS, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 17, p. 42–56, 1997.

MALAISSSE, W.J., SENER, A., HERCHUELZ, A. HUTTON, J.C. Insulin release: the fuel hypothesis. **Metabolism**, v. 28, p. 373-386, 1979.

MALIQUEO, M., ECHIBURÚ, B., CRISOSTO, N., AMIGO, P., ARANDA, P., SÁNCHEZ, F., SIR-PETERMANN, T. Metabolic parameters in cord blood of newborns of women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 92(1), p. 277-282, 2009.

MANDL, A.M. The phases of the estrous cycle in the adult white rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 576-584, 1951.

MANNERAS, L., CAJANDER, S., HOLMÄNG, A., SELESKOVIC, Z., LYSTIG, T., LÖNN, M., STENER-VICTORIN, E. A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. **Endocrinology**, v. 148(8), p. 3781-3791, 2007.

MARCHESINI, G., BUGIANESI, E., FORLANI, G., CERRELLI, F., LENZI, M., MANINI, R., NATALE, S., VANNI, E., VILLANOVA, N., MELCHIONDA, N., RIZZETTO, M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37(4), p. 917-923, 2003.

MARTINS, W.P., MAUAD-FILHO, F., DE ARAUJO, C.H.M., FERRIANI, R.A., REIS, R.A. Síndrome dos Ovários Policísticos. **Femina**, v. 34(10), p. 659-665, 2006.

MASTORAKOS, G., ILIAS I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 997, p.136-149, 2003.

MATTEONI, C.A., YOUNOSSI, Z.M., GRAMLICH, T., BOPARAI, N., LIU, Y.C., MCCULLOUGH, A.J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v. 116, p. 1413-1419, 1999.

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

MAZHARIAN, A., WATSON, S.P., SÉVERIN, S. Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver-derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation. **Experimental Hematology**, v. 37, p. 1238–1249, 2009.

MCCURDY, C.E., BISHOP, J.M., WILLIAMS, S.M., GRAYSON, B.E., SMITH, M.S., FRIEDMAN, J.E., GROVE, K.L. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 323–335, 2009.

MCGOWAN, C.A., MCAULIFFE, F.M. The influence of maternal glycaemia and dietary glycaemic index on pregnancy outcome in healthy mothers. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 153–159, 2010.

MCVEY, M.J., COOKE, G.M. Inhibition of rat testis microsomal 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity by tributyltin. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, p. 99-105, 2003.

MENG, P., LIN, J., LIU, L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 8–15, 2009.

MENSINK, B.P., TEN HALLERS-TJABLES, C.C., KRALT, J., FRERIKS, I.L., BOON, J. Assessment of imposex in the common whelk, *Buccinum undatum* (L.) from the Eastern Scheldt, the Netherlands. **Marine Environmental Research**, v. 41(4), p. 315–325, 1996.

MERKORD, J., JONAS, L., WEBER, H., KRÖNING, G., NIZZE, H., HENNIGHAUSEN, G. Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions. **Pancreas**, v. 15(4), p. 392-401, 1997.

MERLO, E., PODRATZ, P.L., SENA, G.C., ARAÚJO, J.F., LIMA, L.C., ALVES, I.S., GAMA-DE-SOUZA, L.N., PELIÇÃO, R., RODRIGUES, L.C., BRANDÃO, P.A., CARNEIRO, M.T.,

PIRES, R.G., MARTINS-SILVA, C., ALARCON, T.A., MIRANDA-ALVES, L., SILVA, I.V., GRACELI, J.B. The Environmental Pollutant Tributyltin Chloride Disrupts the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis at Different Levels in Female Rats. **Endocrinology**, v.157(8), p. 2978-2995, 2016.

MICHEL, P., AVERTY, B., ANDRAL, B., CHIFFOLEAU, J.F., GALGANI, F. TBT along the coast of Corsica (Western Mediterranean): a persistent problem. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42(11), p. 1128–1132, 2001.

MIHALIK, S.J., STEINBERG, S.J., PEI, Z., PARK, J., KIM, D.G., HEINZER, A.K., DACREMONT, G., WANDERS, R.J., CUEBAS, D.A., SMITH, K.D., WATKINS, P.A. Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277(27), p. 24771-24779, 2002.

MILLER, B.H., TAKAHASHI, J.S. Central circadian control of female reproductive function. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. 195, 2014.

MINCHIN, D., OEHLMANN, J., DUGGAN, C.B., STROBEN, E., KEATINGE, M. Marine TBT antifouling contamination in Ireland, following legislation in 1987. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30(10), p. 633–639, 1995.

MITRA, S., GERA, R., SIDDIQUI, W.A., KHANDELWAL, S. 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, 2013.

MOHAMMADI, Z., AZARNIA, M., MIRABOLGHASEMI, G., SHIRAVI, A., MOHAMMADI, Z. Histological changes in the liver of fetuses of pregnant rats following citalopram administration. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45(5), p. 517–521, 2013.

MORCILLO, Y., PORTE, C. Monitoring of organotin compounds and their effects in marine mollusks. **Trends in analytical chemistry**, v. 17(2), p. 109–116, 1998.

MORGAN, E., MURPHY, J., LYONS, R. Imposex in *Nucella lapillus* from TBT contamination in South and South-West Wales: a continuing problem around ports. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36(10), p. 840–843, 1998.

MORI, A., ZHAI, Y., TOKI, T., NIKAIDO, T., FUJII, S. Distribution and heterogeneity of mast cells in the human uterus. **Human Reproduction**, v. 12, p. 368–372, 1997.

MOSER, V.C., MCGEE, J.K., EHMAN, K.D. Concentration and persistence of tin in rat brain and blood following dibutyltin exposure during development. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 72(1), p. 47–52, 2009.

MOYSÉS, M.R., BARKER, L.A., CABRAL, A.M. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 949–958, 2001.

MULLANE, K.M., KRAEMER, R., SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 14(3), p. 157–167, 1985.

NAEYE, R.L. Do placental weights have clinical significance? **Human Pathology**, v. 18, p. 387–391, 1987.

NASSIR, F., RECTOR, R.S., HAMMOUD, G.M., IBDAH, J.A. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 11(3), p. 167–175, 2015.

NEGRI, A., MARSHALL, P. TBT contamination of remote marine environments: ship groundings and ice-breakers as sources of organotins in the Great Barrier Reef and Antarctica. **Journal of Environmental Management**, v. 90(1), p. S31–S40, 2009.

NIELSEN, J.B., STRAND, J. Butyltin compounds in human liver. **Environmental Research**, v. 88(2), p. 129–133, 2002.

NELSON, J.F., FELICIO, L.S., RANDALL, P.K., SIMS, C., FINCH, C.E. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of reproduction**, v. 27, p. 327–339, 1982.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A., CALDWELL, S.H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37(5), p. 1202–1219, 2003.

NILSSON, E.E., SKINNER, M.K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 67(3), p. 1018-1024, 2002.

NORMAN, R.J., DEWAILLY, D., LEGRO, R.S., HICKEY, T.E. Polycystic ovary syndrome. **Lancet**, v. 370, p. 685–697, 2007.

NOVAIRA, H.J., FADOJU, D., DIACZOK, D., RADOVICK, S. Genetic mechanisms mediating kisspeptin regulation of GnRH gene expression. **Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 17391–17400, 2012.

OBERDORSTER, E., RITTSCHOF, D., LEBLANC, G.A. Alteration of [14C]- testosterone metabolism after chronic exposure of *Daphnia magna* to tributyltin. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34(1), p. 21–25, 1998.

O'CONNOR, J.C., COOK, J.C., CRAVEN, S.C., VAN PELT, C.S., OBOURN, J.D. An in vivo battery for identifying endocrine modulators that are estrogenic or dopamine regulators. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 33, p. 182–195, 1996.

OGATA, R., OMURA, M., SHIMASAKI, Y., KUBO, K., OSHIMA, Y., AOU, S., INOUE, E. Two- generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 63, p. 127–144, 2001.

OGINO, K., INUKAI, T., MIURA, Y., MATSUI, H., TAKEMURA, Y. Triphenyltin chloride induces glucose intolerance by the suppression of insulin release from hamster pancreatic beta-cells. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 104, p. 409–411, 1996.

OH, C.H. Butyl and phenyl tin compounds in fish and shellfish on the Korean market. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, p. 239–243, 2009.

OLIVEIRA, F.L.C. Metabolismo de lipídios. Uso do ômega-3 e ômega-6, lipídios estruturados e de cadeias média e curta. In: Telles Júnior M, Leite HP. **Terapia nutricional no paciente pediátrico grave**. São Paulo: Atheneu, 2005.

OMAE. I. Organotin chemistry, J. **Organomet. Chem. Library**. Amsterdam: Elsevier, v. 21, 1989.

OMURA, M., OGATA, R., KUBO, K., SHIMASAKI, Y., AOU, S., OSHIMA, Y., TANAKA, A., HIRATA, M., MAKITA, Y., INOUE, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **Toxicological Sciences**, v. 64, p. 224–232, 2001.

O'TIERNEY-GINN, P., ROBERTS, V., GILLINGHAM, M., WALKER, J., GLAZEBROOK, P.A., THORNBURG, K.L., GROVE, K., FRIAS, A.E. Influence of high fat diet and resveratrol supplementation on placental fatty acid uptake in the Japanese macaque. **Placenta**, v. 36(8), p. 903–910, 2015.

OZ, H.S. Multiorgan chronic inflammatory hepatobiliary pancreatic murine model deficient in tumor necrosis factor receptors 1 and 2. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22(21), p. 4988-4998, 2016.

PAPADANTONAKIS, N., RAVID, K. Development of megakaryocytes. In: Wickrema A, Kee B, eds. **Molecular Basis of Hematopoiesis**. New York: Springer, p. 95–257, 2009.

PARIA, B.C., DAS, S.K., DEY, S.K. Embryo implantation requires estrogen-directed uterine preparation and catecholesterol-mediated embryonic activation. **Advances in Pharmacology**, v. 42, p. 840-843, 1998.

PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. Kit ligand on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 55-64, 2000.

PEDERSEN, J. Hyperglycaemia-hyperinsulinism theory and birthweight. In **The Pregnant Diabetic and Her Newborn: Problems and Management Baltimore**, Williams and Wilkins, p. 211–220, 1977.

PEDRUZZI, F.C. **Análise da contaminação por Organoestânicos no litoral do Espírito Santo, sobre a razão sexual de *Leucozonia nassa* (Gmelin, 1791), por meio de duas metodologias: Convencional e Não-destrutiva.** Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**, v. 115, p. 1–112, 1989.

PELLEYMOUNTER, M.A., CULLEN, M.J., BAKER, M.B., HECHT, R., WINTERS, D., BOONE, T., COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269(5223), p. 540-543, 1995.

PENZA, M., JEREMIC, M., MARRAZZO, E., MAGGI, A., CIANA, P., RANDO, G, GRIGOLATO, P.G., DI LORENZO, D. 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, p. 65–75, 2011.

PICKARD, M.R., LEONARD, A.J., OGILVIE, L.M., EDWARDS, P.R., EVANS, I.M., SINHA, A.K., EKINS, R.P. Maternal hypothyroidism in the rat influences placental and liver glycogen stores: fetal growth retardation near term is unrelated to maternal and placental glucose metabolic compromise. **Journal of Endocrinology**, v. 176(2), p. 247-255, 2003.

PIRES, D.A., MARQUES, P.E., PEREIRA, R.V., DAVID, B.A., GOMIDES, L.F., DIAS, A.C.F., NUNES-SILVA, A., PINHO, V., CARA, D.C., VIEIRA, L.Q., TEIXEIRA, M.M., MENEZES, G.B. Interleukin-4 deficiency protects mice from acetaminophen-induced liver injury and inflammation by prevention of glutathione depletion. **Inflammation Research**, v. 63, p. 61–69, 2014.

PODRATZ, P.L., DELGADO FILHO, V.S., LOPES, P.F., SENA, G.C., MATSUMOTO, S.T., SAMOTO, V.Y., TAKIYA, C.M., DE CASTRO MIGUEL, E., SILVA, I.V., GRACELI, J.B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, p. 1035-1046, 2012.

POLLARD, J.W., PACEY, J., CHENG, S.V., JORDAN, E.G. Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. **Cell and Tissue Research**, v. 249(3), p. 533-540, 1987.

PRADA, J.A., TSANG, R.C. Biological mechanisms of environmentally induced causes of IUGR. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. S21–S27, 1998.

PROSSNITZ E.R. Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. **Life Sciences**, v. 75(8), p. 893-899, 2004.

QUNFANG, Z., GUIBIN, J., ZHONGYANG, L., LINA, L., CHUNGANG, Y., YONGNING, W. Survey of butyltin compounds in 12 types of foods collected in China. **Food Additives & Contaminants**, v. 21(12), p. 1162–1167, 2004.

RANTAKOKKO, P., KUNINGAS, T., SAASTAMOINEN, K., VARTIAINEN, T. Dietary intake of organotin compounds in Finland: a marketbasket study. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, p. 749–756, 2006.

RANTAKOKKO, P., TURUNEN, A., VERKASALO, P.K., KIVIRANTA, H., MANNISTO, S., VARTIAINEN, T. Blood levels of organotin compounds and their relation to fish consumption in Finland. **Science of the Total Environment**, v. 399(1–3), p. 90–95, 2008.

RAO, M., REDDY, J.K. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, p. 43–55, 2001.

RECABARREN, S.E., SMITH, R., RIOS, R., MALIQUEO, M., ECHIBURU, B., CODNER, E., CASSORLA, F., ROJAS, P., SIR-PETERMANN, T. Metabolic profile in sons of women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93(5), p. 1820-1826, 2008.

REES, C.M., BRADY, B.A., FABRIS, G.J. Incidence of imposex in Thais orbita from Port Phillip Bay (Victoria, Australia), following 10 years of regulation on use of TBT. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42(10), p. 873–878, 2001.

REID, B.A. A Chemical on Trial. Dailly Press/ **The Times Herald**. New Port News. V.A. Reprinted Section-ceollection of article. 1986.

REINER, R.G., TANNER, A.R., KEYHANI, A.H., WRIGHT, R. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 43(2), p. 376–380, 1981.

REISTER, F., FRANK, H.G., KINGDOM, J.C., HEYL, W., KAUFMANN, P., RATH, W., HUPPERTZ, B. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. **Laboratory Investigation**, v. 81(8), p. 1143-1152, 2001.

REMBIESA, R., MARCHUT, M., WARCHOL, A. Ovarianplacental dependency in the rat. I. Biotransformation of C21 steroids to androgens by rat placenta in vitro. **Steroids**, v. 19, p. 65-84, 1972.

REVANKAR, C.M., CIMINO, D.F., SKLAR, L.A., ARTERBURN, J.B., PROSSNITZ, E.R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, v. 307, p. 1625–1630, 2005.

REYNOLDS, L.P., CATON, J.S., REDMER, D.A., GRAZUL-BILSKA, A.T., VONNAHME, K.A., BOROWICZ, P.P., LUTHER, J.S., WALLACE, J.M., WU, G., SPENCER, T.E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **The Journal of Physiology**, v. 572(1), p. 51-58, 2006.

RICHARDS, J.S. Female reproductive system section. In **Physiology of Reproduction**. Knobil & Neill Eds, Elsevier Academic press, third edition, v. 1, p. 313-770, 2006.

RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. 2 ed. In: Museu Oceanográfico Prof. E. C. Rios da Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 1994.

ROBERTSON, S.A., LEINNINGER, G.M., MYERS, M.G.JR. Molecular and neural mediators of leptin action. **Physiology & Behavior**, v. 94, p. 637–642, 2008.

ROLAND, M.C., FRIIS, C.M., VOLDNER, N., GODANG, K., BOLLERSLEV, J., HAUGEN, G., HENRIKSEN, T. Fetal growth versus birthweight: The role of placenta versus other determinants. **PLoS One**, v. 7, n. e39324, 2012.

ROOS, S., POWELL, T.L., JANSSON, T. Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. **Biochemical Society Transactions**, v. 37(1), p. 295-198, 2009.

ROSARIO, F.J., KANAI, Y., POWELL, T.L., JANSSON, T. Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth. **Obesity (Silver Spring)**, v. 23(8), p. 1663–1670, 2015.

ROTTERDAM. ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 81, p. 19-25, 2004.

ROUX, J.F., MYERS, R.E. In vitro metabolism of palmitic acid and glucose in developing tissue of the rhesus monkey. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 118, p. 385-392, 1974.

RUBIN, L.B., DEANE, H.W., HAMILTON, J.A. Biochemical and histochemical identification of 5-3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the adrenal cortex and ovaries of diverse mammals. **Endocrinology**, v. 73, p. 748-763, 1963.

RUDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56(1), p. 180-189, 2003.

RUVINSKY, I., MEYUHAS, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 6, 2006.

RYAN, E.A., ENNS, L. Role of gestational hormones in the induction of insulinresistance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 67(2), p. 341-7, 1988.

SACKS, D.A., LIU, A.I., WOLDE-TSADIK, G., AMINI, S.B., HUSTON-PRESLEY, L., CATALANO, P.M. What proportion of birth weight is attributable to maternal glucose among infants of diabetic women? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194(2), p. 501-507, 2006.

SALLEY, K.E.S., WICKHAM, E.P., CHEANG, K.I., ESSAH, P.A., KARJANE, N.W., NESTLER, J.E. POSITION STATEMENT: Glucose intolerance in polycystic ovary syndrome—A position statement of the androgen excess society. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, p. 4546–4556, 2007.

SANTILLO, D., JOHNSTON, P., BRIGDEN, K. The presence of brominated flame retardants and organotin compounds in dusts collected from Parliament buildings from eight countries. **Greenpeace Research Laboratories Technical Note 03/2001**. Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter, 2001.

SANTOS, D.M., SANT'ANNA, B.S., GODOI, A.F.L., TURRA, A., MARCHI, M.R.R. Contamination and Impact of Organotin Compounds on the Brazilian Coast. **Nova Science Publishers**, p. 31-59, 2011.

SANTOS, M.M.; REIS-HENRIQUES, M.A.; VIEIRA, M.N.; SOLE, M. Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 155–162, 2006.

SANTOS, S.H., BRAGA, J.F., MARIO, E.G., PÔRTO, L.C., RODRIGUES-MACHADO, G., MURARI, A., BOTION, L.M., ALENINA, N., BADER, M., SANTOS, R.A. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin (1-7). **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, p. 953-961, 2010.

SANTOS-SILVA, A.P., ANDRADE, M.N., PEREIRA-RODRIGUES, P., PAIVA-MELO, F.D., SOARES, P., GRACELI, J.B., DIAS, G.R.M., FERREIRA, A.C.F., DE CARVALHO, D.P., MIRANDA-ALVES, L. Frontiers in endocrine disruption: Impacts of organotin on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 460, p. 246-257, 2018.

SAVARIS, R.F., GROLL, J.M., YOUNG, S.L., DEMAYO, F.J., JEONG, J.W., HAMILTON, A.E., GIUDICE, L.C., LESSEY, B.A. Progesterone resistance in PCOS endometrium: A microarray analysis in clomiphene citrate-treated and artificial menstrual cycles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 1737–1746, 2011.

SCHAEFER-GRAF, U.M., GRAF, K., KULBACKA, I., KJOS, S., DUDENHAUSEN, J., VETTER, K., HERRERA, E. Maternal Lipids as Strong Determinants of Fetal Environment and Growth in Pregnancies With Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 31(9), p. 1858–1863, 2008.

SCHER, Scientific committee on health and environmental risks (SCHER). Revised assessment of the risks to health and the environment associated with the use of the four

organotin compounds TBT, DBT, DOT and TPT. **Health and Consumer Protection Directorate**. Opinion adopted by the SCHER during the 14th plenary of 30 November 2006. European Commission, EC, 2006.

SCHNEIDER, D.J. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 32(4), p. 525–527, 2009.

SCHÖNFELDER, G., FRIEDRICH, K., PAUL, M., CHAHOUD, I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. **Neoplasia**, v. 6, p. 584–594, 2004.

SCRIMSHAW, M.D., WAHLEN, R., CATTERICK, T., LESTER, J.N. Butyltin compounds in a sediment core from the old Tilbury basin, London, UK. **Marine Pollution Bulletin**. v.50. p.1500-1507, 2005.

SELVAN, R.S., BUTTERFIELD, J.H., KRANGEL, M.S. Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13893–13898, 1994.

SEMMLER-BEHNKE, M., LIPKA, J., WENK, A., HIRN, S., SCHÄFFLER, M., TIAN, F., SCHMID, G., OBERDÖRSTER, G., KREYLING, W.G. Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 33, 2014.

SENA, G.C., FREITAS-LIMA, L.C., MERLO, E., PODRATZ, P.L., DE ARAÚJO, J.F.P., BRANDÃO, P.A.A., CARNEIRO, M.T.W.D., ZICKER, M.C., FERREIRA, A.V.M., TAKIYA, C.M., DE LEMOS BARBOSA, C.M., MORALES, M.M., SANTOS-SILVA, A.P., MIRANDA-ALVES, L., SILVA, I.V., GRACELI, J.B. 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, 2017.

SETJI, T.L., HOLLAND, N.D., SANDERS, L.L., PEREIRA, K.C., DIEHL, A.M., BROWN, A.J. Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, p. 1741–1747, 2006.

SHI, D., DYCK, M.K., UWIERA, R.R.E., RUSSELL, J.C., PROCTOR, S.D., VINE, D.F. A Unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. **Endocrinology**, v. 150, p. 4425–4436, 2009.

SHI, H.H., HUANG, C.J., ZHU, S.X., YU, X.J., XIE, W.Y. Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. **Marine Ecology Progress Series**, v. 304, p. 179–189, 2005.

SI, J., LI, P., XIN, Q., LI, X., AN, L., LI, J. Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride reduces sperm count and quality in mice. **Environmental Toxicology**, v. 30, p. 44–52, 2015.

SIRMANS, S.M., PATE, K.A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 1–13, 2013.

SKINNER, M.K. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 2–6, 2008.

SMITH, B.S. Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. **Proceedings of the Malacological Society of London**, v. 39, p. 377–378, 1971.

SMITH, B.S. Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. **Journal of Applied Toxicology**, v. 1(1), p. 22–25, 1981A.

SMITH, B.S. Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. **Journal of Applied Toxicology**, v.1(1), p. 15–21, 1981B.

SMITH, P.J. Selective decline in imposex levels in the dogwhelk *Lepsiella scobina* following a ban on the use of TBT antifoulants in New Zealand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32(4), p. 362–365, 1996.

SOARES, M.J., CHAKRABORTY, D., KARIM RUMI, M.A., KONNO, T., RENAUD, S.J. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. **Placenta**, v. 33, p. 233–243, 2012.

SOFTIC, S., KIRBY, M., BERGER, N.G., SHROYER, N.F., WOODS, S.C., KOHLI, R. Insulin concentration modulates hepatic lipid accumulation in mice in part via transcriptional regulation of fatty acid transport proteins. **Plos One**, v. 7, e38952, 2012.

SOHLSTRÖM, A., KABIR, N., SADURSKIS, A., FORSUM, E. Body composition and fat distribution during the first 2 weeks of gestation in ad lib.-fed and energy-restricted rats. **British Journal of Nutrition**, v. 71(3), p. 317-33, 1994.

SOUSA, A.C.A., OLIVEIRA, I.B., LARANJEIRO, F., TAKAHASHI, S., TANABE, S., CUNHA, M.R., BARROSO, C.M. Organotin levels in Nazare' canyon (west Iberian Margin, NE Atlantic) and adjacent coastal area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64(2), p. 422–426, 2014.

SPOONER N., GIBBS, P.E., BRYAN, G.W., GOAD, L.J. The effects of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. **Marine Environmental Research**, v. 32, p. 37–49, 1991.

STEINBERG, S.J., MORGENTHALER, J., HEINZER, A.K., SMITH, K.D., WATKINS, P.A. Very long-chain acyl-CoA synthetases. Human “bubblegum” represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 35162–35169, 2000.

STERNBERG, R.M.; GOODING, M.P.; HOTCHKISS, A.K.; LEBLANC, G.A. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin induced imposex in prosobranchs. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 4–23, 2010.

STEWART, F.M., FREEMAN, D.J., RAMSAY, J.E., GREER, I.A., CASLAKE, M., FERRELL, W.R. Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placental function throughout pregnancy in lean and obese mothers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92(3), p. 969–975, 2007.

STRAND, J., GLAHDER, C.M., ASMUND, G. Imposex occurrence in marine whelks at a military facility in the high Arctic. **Environmental Pollution**, v. 142(1), p. 98–102, 2006.

STRAND, J., JACOBSEN, J.A. Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. **Science of the Total Environment**, v. 350, p. 72–85, 2005.

SUSA, J.B., NEAVE, C., SEHGAL, P., SINGER, D.B., ZELLER, W.P., SCHWARTZ, R. Chronic hyperinsulinemia in the fetal rhesus monkey. Effects of physiologic hyperinsulinemia on fetal growth and composition. **Diabetes**, v. 33, p. 656-60, 1984.

SZAWKA, R.E., ANSELMO-FRANCI, J.A. A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. **Life Sciences**, v. 75, p. 911-922, 2004.

TAKAHASHI, S., LE, L.T.H., SAEKI, H., NAKATANI, N., TANABE, S., MIYAZAKI, N. Accumulation of butyltin compounds and total tin in marine mammals. **Water Science & Technology**, v. 42, p. 97–98, 2000.

TAKATA, K., FUJIKURA, K., SHIN, B. Ultrastructure of the rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, p. 13–24, 1997.

TALBOTT, E., GUZICK, D., CLERICI, A., BERGA, S., DETRE, K., WEIMER, K., KULLER, L. Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 15, p. 821– 826, 1995.

TALLMON, D. Tributyltin contamination and imposex in Alaska harbors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88(2), p. 245–249, 2012.

TERLIZZI, A., DELOS, A.L., GARAVENTA, F., FAIMALI, M., GERACI, S. Limited effectiveness of marine protected areas: imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) populations from Italian marine reserves. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 188–192, 2004.

THOMÉ, J.W., GIL, G., BERGONCI, P.E.A., TARASCONI, J.C. **As conchas das nossas praias**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Redes, 2010.

TIBBETTS, T.A., MENDOZA-MENESES, M., O'MALLEY, B.W., CONNEELY, O.M. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. **Biology of Reproduction**, v. 59(5), p. 1143-1152, 1998.

TITLEY-O'NEAL, C.P, MUNKITTRICK, K.R, MACDONALD, B.A. The effects of organotin on female gastropods. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 13(9), p. 2360-2388. 2011.

TOYODA, M., SAKAI, H., KOBAYASHI, Y., KOMATSU, M., HOSHINO, Y., HORIE, M. Daily dietary intake of tributyltin, dibutyltin, triphenyltin and diphenyltin compounds according to a total diet study in a Japanese population. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 41, p. 280–286, 2000.

TRAVER, D., MIYAMOTO, T., CHRISTENSEN, J., IWASAKI-ARAI, J., AKASHI, K., WEISSMAN, I.L. Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. **Blood**, v. 98, p. 627–635, 2001.

TSCHOP, M., SMILEY, D.L., HEIMAN, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, p. 908–913, 2000.

TSUDA, T., INOUE, T., KOJIMA, M., AOKI, S. Daily intakes of tributyltin and triphenyltin compounds from meals. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 941–943, 1995.

UENO, S., SUSU, N., FURUKAWA, Y., SUGIYAMA, M. Comparison of hepatotoxicity caused by mono, di- and tributyltin compounds in mice. **Archives of Toxicology**, v. 69(1), p. 30–34, 1994.

VERCRUYSSSE, L., CALUWAERTS, S., LUYTEN, C., PIJNENBORG, R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. **Placenta**, v. 27, p. 22–33, 2006.

VERREY, F., SYSTEM, L. Heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 445, p. 529–533, 2003.

VIGUIÉ, C., MHAOUTY-KODJA, S., HABERT, R., CHEVRIER, C., MICHEL, C., PASQUIER, E. Evidence-based adverse outcome pathway approach for the identification of BPA as an endocrine disruptor in relation to its effect on the estrous cycle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 475, p. 10–28, 2018.

VOS, J.G., DYBING, E., GREIM, H.A., LADEFOGED, O., LAMBRE, C., TARAZONA, J.V., BRANDT, I., VETHAAK, A.D. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000.

YAMAJI, T., DIERSCHKE, D.J., HOTCHKISS, J., BHATTACHARYA, A.N., SURVE, A.H., KNOBIL, E. Estrogen induction of LH release in the rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 89, p. 1034-1041, 1971.

YANG, M., FORTUNE, J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 1153–1161, 2008.

YANIK, S.C., BAKER, A.H., MANN, K.K., SCHLEZINGER, J.J. Organotins are potent activators of PPAR γ and adipocyte differentiation in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. **Toxicological Sciences**, v. 122, p. 476–488, 2011.

YEO, S., HERBISON, A.E. Estrogen-Negative Feedback and Estrous Cyclicity Are Critically Dependent Upon Estrogen Receptor- Expression in the Arcuate Nucleus of Adult Female Mice. **Endocrinology**, v. 155(8), p. 2986-2995, 2014.

YI, A.X., LEUNG, K.M.Y., LAM, M.H.W., LEE, J.S., GIESY, J.P. Review of measured concentrations of triphenyltin compounds in marine ecosystems and meta-analysis of their risks to humans and the environment. **Chemosphere**, v.89(9), p.1015–1025, 2012.

YOSHINAGA, K. Inhibition of implantation by advancement of uterine sensitivity and refractoriness. In: Leroy, F.; Finn, CA.; Psychoyos, A.; Hubinot, PO., editors. **Blastocysts-endometrium relationships: progress in reproductive biology**. Karger; Basel, Switzerland, p. 189-199, 1980.

YOSHINAGA, K. Uterine receptivity for blastocyst implantation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 541, p. 424–431, 1988.

YU, J.S.L., CUI, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/ mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. **Development**, v. 143(17), p. 3050-3060, 2016.

WADA, O., MANABE, S., IWAI, H., ARAKAWA, Y. Recent progress in the study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. **Sangyo Igaku**, v. 24, p. 24–54, 1982.

WAITE, M.E., WALDOCK, M.J., THAIN, J.E., SMITH, D.J., MILTON, S.M. Reductions in TBT concentrations in UK estuaries following legislation in 1986 and 1987. **Marine Environmental Research**, v. 32, p. 89-111, 1991.

WALLACE, J.M., HORGAN, G.W., BHATTACHARYA, S. Placental weight and efficiency in relation to maternal body mass index and the risk of pregnancy complications in women delivering singleton babies. **Placenta**, v. 33, p. 611–618, 2012.

WALTERS, K.A., ALLAN, C.M., HANDELSMAN, D.J. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 86(5), p. 1–12, 2012.

WANG, H., DEY, S.K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nature Reviews Genetics**, v. 7(3), p. 185–199, 2006.

WATKINS, P.A., MAIGUEL, D., JIA, Z., PEVSNER, J. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. **The Journal of Lipid Research**, v. 48(12), p. 2736-2750, 2007.

WATTS, G.F., MORTON, K., JACKSON, P., LEWIS, B. Management of patients with severe hypertriglyceridaemia during pregnancy: report of two cases with familial lipoprotein lipase deficiency. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 99, p. 163-166, 1992.

WIEBKIN, P., SIEG, M.S., NELSON, R.E., HINES, R.N., PROUGHS, R.A. Inhibition of metabolism-mediated cytotoxicity by L,L-disubstituted hydrazines in mouse mastocytoma (line P815) cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 31(18), p. 2921-2928, 1982.

WILD, R.A., CARMINA, E., DIAMANTI-KANDARAKIS, E., DOKRAS, A., ESCOBAR-MORREALE, H.F., FUTTERWEIT, W., LOBO, R., NORMAN, R.J., TALBOTT, E., DUMESIC, D.A. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: A consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, p. 2038–2049, 2010.

WOODING, F.B.P., FLINT, A.P.F. Placentation. In **'Marshall's Physiology of Reproduction'**, G. E. Lamming, 4 Ed, Chapman and Hall, New York, p. 233-460, 1994.

WOOLLETT, L.A. Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. **Placenta**, v. 32, p. S218–S221, 2011.

WU, S., DIVALL, S., NWAOPARA, A., RADOVICK, S., WONDISFORD, F., KO, C., WOLFE, A. Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. **Diabetes**, v. 63, p. 1270–1282, 2014.

WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R., HALL, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, p. 471–484, 2006.

ZAID, S.S., OTHMAN, S., KASSIM, N.M. Potential protective effect of Tualang honey on BPA-induced ovarian toxicity in prepubertal rat. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 509, 2014.

ZAWADSKI, J.K., DUNAIF, A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, editors. Polycystic ovary syndrome. Boston: **Blackwell Scientific Publications**, p. 377-84, 1992.

ZENG, Z., XU, Y., ZHANG, B. Antidiabetic Activity of a Lotus Leaf Selenium (Se)-Polysaccharide in Rats with Gestational Diabetes Mellitus. **Biological Trace Element Research**, v. 176(2), p. 321-327, 2016.

ZHANG, S., LIN, H., KONG, S., WANG, S., WANG, H., WANG, H., ARMANT, R. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. **Molecular Aspects of Medicine**, v., 34(5), p. 939–980, 2013A.

ZHANG, X., ZHANG, C., SHEN, S., XIA, Y.J., YI, L., GAO, Q., WANG, Y. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. **Human Reproduction**, v..28(11), p. 3074–3085, 2013B.

ZHOU, J., BONDY, C.A. Placental Glucose Transporter Gene Expression and Metabolism in the Rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 845-852, 1993.

ZHU, M.J., DU, M., NATHANIELSZ, P.W., FORD, S.P. Maternal obesity upregulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the mid-gestation sheep placenta. **Placenta**, v. 31(5), p. 387–391, 2010.

ZUO, Z., WU, T., LIN, M., ZHANG, S., YAN, F., YANG, Z., WANG, Y., WANG, C. Chronic exposure to tributyltin chloride induces pancreatic islet cell apoptosis and disrupts glucose homeostasis in male mice. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 5179–5186, 2014.

9 ANEXOS

9.1 Artigo publicado vinculado à tese

Reproductive Toxicology 57 (2015) 29–42



FI.SFVIFR

Contents lists available at ScienceDirect

Reproductive Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reprotox

Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats



Priscila L. Podratz^a, Eduardo Merlo^a, Gabriela C. Sena^a, Mariana Morozesk^b, Marina M. Bonomo^b, Silvia T. Matsumoto^b, Mércia B. da Costa^b, Gabriela C. Zamprogno^b, Poliane A.A. Brandão^c, Maria T.W.D. Carneiro^c, Emilio de C. Miguel^d, Leandro Miranda-Alves^e, Ian V. Silva^a, Jones B. Graceli^{a,*}

^a Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^b Department of Biological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceara, Brazil

^e Experimental Endocrinology Research Group, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2014

Received in revised form 21 April 2015

Accepted 7 May 2015

Available online 4 June 2015

Keywords:

Environmental contamination
Organotins accumulated in seafood
Endocrine disruption
Reproductive toxicity

ABSTRACT

Organotins (OTs) are environmental contaminants used as biocides in antifouling paints that have been shown to be endocrine disruptors. However, studies evaluating the effects of OTs accumulated in seafood (LNI) on reproductive health are particularly sparse. This study demonstrates that LNI leads to impairment in the reproductive tract of female rats, as the estrous cycle development, as well as for ovary and uterus morphology. Rats were treated with LNI, and their reproductive morphophysiology was assessed. Morphophysiological abnormalities, such as irregular estrous cycles, abnormal ovarian follicular development and ovarian collagen deposition, were observed in LNI rats. An increase in luminal epithelia and ER α expression was observed in the LNI uteri. Together, these data provide in vivo evidence that LNI are toxic for reproductive morphophysiology, which may be associated with risks to reproductive function.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Organotins (OTs), such as tributyltin (TBT), are considered to be endocrine-disrupting environmental pollutants for sea and non-sea animals [1–3]. These xenobiotics are a diverse group of widely distributed organometallic contaminants, used as biocides in wood treatments and pesticides [4–6]; however, the most important use of TBT is in antifouling paints [1,7,8]. Environmental concerns regarding OTs have considerably increased due to their uncontrolled use, and consequently, high levels of TBT are found in harbors, waterways, and shipping lanes [9]. From previous studies, we learned that the level of TBT contamination in marine sediment may be classified into four categories, such as (i) lightly contaminated site (TBT levels of <0.01–0.05 $\mu\text{g/g}$), which is remote from boat moorings area; (ii) medium contaminated site (TBT levels

varying between 0.06 and 0.2 $\mu\text{g/g}$), which is closer to moorings area; and (iii) highly contaminated site (TBT levels varying between 0.3 and 1 $\mu\text{g/g}$), within high density mooring areas [1,10].

OTs are known to be markedly toxic to oysters and molluscs, impairing reproduction in oyster *Crassostrea gigas* and inducing imposex in gastropod mollusks [1,11,12]. The mechanism of how OTs (such as TBT) lead to imposex is unclear; however, an association with the inhibition of aromatase, which converts testosterone into estrogen, acyl CoA-steroid acyltransferase inhibition; reduction of androgen excretion; abnormal release of APGWamide as results of TBT neurotoxic effect; or activation of retinoid X receptor appears to be involved [13–16]. Imposex is an endocrine syndrome where female molluscs develop male genitalia after exposure to OTs, mainly TBT. As result of TBT anthropogenic input in the environment, TBT can be found in marine biota and sediment (their adsorption was found mainly in fine marine sediments), varying between 2 and 20 years after its contamination [6,17,18]. As a result of TBT use in marine environments, its residues have been found in many organisms of food chains, including molluscs, fish, seabirds and marine mammals [19–22]. Furthermore, TBT has been shown to have highly toxic effects on non-target marine organisms, such as mammals [23–25].

* Corresponding author at: Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, Departamento de Morfologia/CCS, Universidade Federal do Espírito Santo., Av. Marechal Campos, 1468, Prédio do básico I, sala 5, 290440-090 Vitória, ES, Brazil. Tel.: +55 27 33357540x7369; fax: +55 27 33357358.

E-mail address: jbgraceli@gmail.com (J.B. Graceli).

9.2 Outras produções



RESEARCH ARTICLE

Exercise Training Reduces Cardiac Dysfunction and Remodeling in Ovariectomized Rats Submitted to Myocardial Infarction

Simone Alves de Almeida^{1*}, Erick Roberto Gonçalves Claudio¹, Vinicius Franskoviaky Mengal¹, Suelen Guedes de Oliveira¹, Eduardo Merlo², Priscila Lang Podratz², Sônia Alves Gouvêa¹, Jones Bernardes Graceli², Gláucia Rodrigues de Abreu¹

1. Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Espírito Santo, Vitória-ES, Brasil, 2. Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, Brasil

*simoalves@yahoo.com.br



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Almeida SAd, Claudio ERG, Mengal VF, Oliveira SGd, Merlo E, et al. (2014) Exercise Training Reduces Cardiac Dysfunction and Remodeling in Ovariectomized Rats Submitted to Myocardial Infarction. PLoS ONE 9(12): e115970. doi:10.1371/journal.pone.0115970

Editor: Sudhiranjan Gupta, Texas A&M University Health Science Center, United States of America

Received: June 18, 2014

Accepted: December 2, 2014

Published: December 31, 2014

Copyright: © 2014 Almeida et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The aim of this study was to evaluate whether exercise training (ET) prevents or minimizes cardiac dysfunction and pathological ventricular remodeling in ovariectomized rats subjected to myocardial infarction (MI) and to examine the possible mechanisms involved in this process. Ovariectomized Wistar rats were subjected to either MI or fictitious surgery (Sham) and randomly divided into the following groups: Control, OVX+SHAM_{SED}, OVX+SHAM_{ET}, OVX+MI_{SED} and OVX+MI_{ET}. ET was performed on a motorized treadmill (5x/wk, 60 min/day, 8 weeks). Cardiac function was assessed by ventricular catheterization and Dihydroethidium fluorescence (DHE) was evaluated to analyze cardiac oxidative stress. Histological analyses were made to assess collagen deposition, myocyte hypertrophy and infarct size. Western Blotting was performed to analyze the protein expression of catalase and SOD-2, as well as Gp91phox and AT1 receptor (AT1R). MI-trained rats had significantly increased in +dP/dt and decreased left ventricular end-diastolic pressure compared with MI-sedentary rats. Moreover, oxidative stress and collagen deposition was reduced, as was myocyte hypertrophy. These effects occurred in parallel with a reduction in both AT1R and Gp91phox expression and an increase in catalase expression. SOD-2 expression was not altered. These results indicate that ET improves the functional cardiac parameters associated with attenuation of cardiac remodeling in ovariectomized rats subjected to MI. The mechanism seems to be related to a reduction in the expression of both the AT1 receptor and Gp91phox as well as an increase in the antioxidant enzyme catalase,



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas



Bruno D. Bertuloso^a, Priscila L. Podratz^a, Eduardo Merlo^a, Julia F.P. de Araújo^a, Leandro C.F. Lima^b, Emilio C. de Miguel^c, Leticia N. de Souza^a, Agata L. Gava^d, Miriane de Oliveira^e, Leandro Miranda-Alves^f, Maria T.W.D. Carneiro^g, Celia R. Nogueira^e, Jones B. Graceli^{a,*}

^a Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^b Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Brazil

^d Department of Physiology, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^e Department of Internal Medicine, Botucatu School of Medicine, University of São Paulo State, Brazil

^f Experimental Endocrinology Research Group, Institute of Biomedical Sciences, RJ, Brazil

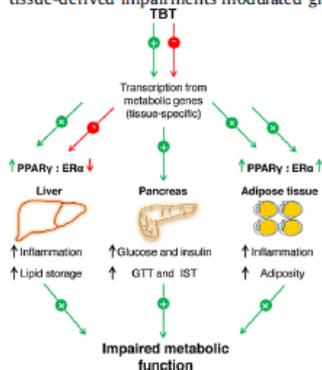
^g Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Brazil

HIGHLIGHTS

- Tributyltin chloride modulates adipose tissue-specific in female rats.
- Tributyltin chloride up-regulated ER- α expression *in vivo*.
- Tributyltin chloride down-regulated ER- α expression in 3T3-L1 cells.
- Tributyltin chloride impairs liver and pancreas morphophysiology.

GRAPHICAL ABSTRACT

Diagram of the tissue-tissue cross-talk in tributyltin chloride (TBT) and metabolic homeostasis. TBT derived from exogenous sources stimulates (green line) or inhibits (red line) transcription from metabolic genes (tissue-specific). TBT stimulates PPAR γ and inhibits ER α protein expression followed with hepatic inflammation and lipid storage. Interestingly, TBT stimulates both PPAR γ and ER α protein expression in adipose tissue associated with inflammation and adiposity. Additionally, liver and adipose tissue-derived impairments modulated glucose tolerance (GTT) and insulin sensitivity (IST) tests.



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2014

Received in revised form 23 February 2015

ABSTRACT

Tributyltin chloride (TBT) is an environmental contaminant used in antifouling paints of boats. Endocrine disruptor effects of TBT are well established in animal models. However, the adverse effects on metabolism are less well understood. The toxicity of TBT in the white adipose tissue (WAT), liver and

* Corresponding author at: Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, Departamento de Morfologia/CCS, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Prédio do básico I, sala 5, 29044-090 Vitória, ES, Brasil. Tel.: +55 27 33357540/7369; fax: +55 27 33357358. E-mail address: jbgraceli@gmail.com (J.B. Graceli).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats



Emilly M. Rossi^b, Vinicius B. Marques^b, Dieli de O. Nunes^b, Maria T.W.D. Carneiro^c, Priscila L. Podratz^a, Eduardo Merlo^a, Leonardo dos Santos^b, Jones B. Graceli^{a,*}

^a Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Brazil

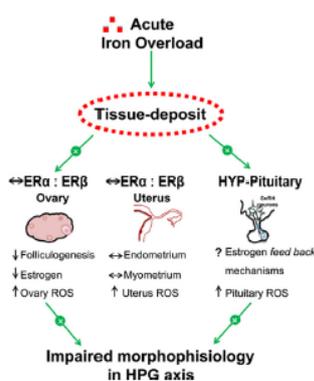
^b Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Brazil

HIGHLIGHTS

- Acute iron overload accumulated in female rat hypothalamic-pituitary-gonadal axis
- Acute iron overload impairs hypothalamic-pituitary-gonadal axis morphophysiology
- Acute iron overload increased oxidative stress in pituitary, uterus and ovary *in vivo*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2015

Received in revised form 28 October 2015

Accepted 28 October 2015

Available online 1 November 2015

Keywords:

Acute iron overload

Iron HPG axis accumulation

Endocrine disruption

HPG axis abnormalities

Pituitary

Uterus and ovary oxidative stress

ABSTRACT

Iron plays a critical role in a mammal's physiological processes. However, iron tissue deposits have been shown to act as endocrine disruptors. Studies that evaluate the effect of acute iron overload on hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis health are particularly sparse. This study demonstrates that acute iron overload leads to HPG axis abnormalities, including iron accumulation and impairment in reproductive tract morphology. Female rats were treated with iron-dextran (Fe rats) to assess their HPG morphophysiology. The increasing serum iron levels due to iron-dextran treatment were positively correlated with higher iron accumulation in the HPG axis and uterus of Fe rats than in control rats. An increase in the production of superoxide anions was observed in the pituitary, uterus and ovary of Fe rats. Morphophysiological reproductive tract abnormalities, such as abnormal ovarian follicular development and the reduction of serum estrogen levels, were observed in Fe rats. In addition, a significant negative correlation was obtained between ovary superoxide anion and serum estrogen levels. Together, these data provide *in vivo* evidence that acute iron overload is toxic for the HPG axis, a finding that may be associated with the subsequent development of the risk of reproductive dysfunction.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, Departamento de Morfologia/CCS, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Prédio do básico I, sala 5, 290440-090 Vitória, ES, Brasil. Fax: +55 27 33357358.

E-mail address: jbgaceli@gmail.com (J.B. Graceli).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.027>

0378-4274/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Hormonal therapy with estradiol and drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats

M.V. Borgo¹, E.R.G. Claudio¹, F.B. Silva¹, W.G. Romero¹, S.A. Gouvea¹, M.R. Moysés¹,
R.L. Santos¹, S.A. Almeida¹, P.L. Podratz², J.B. Graceli² and G.R. Abreu¹

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil

²Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil

Abstract

Drospirenone (DRSP) is a progestin with anti-aldosterone properties and it reduces blood pressure in hypertensive women. However, the effects of DRSP on endothelium-dependent coronary vasodilation have not been evaluated. This study investigated the effects of combined therapy with estrogen (E2) and DRSP on endothelium-dependent vasodilation of the coronary bed of ovariectomized (OVX) spontaneously hypertensive rats. Female spontaneously hypertensive rats (n=87) at 12 weeks of age were randomly divided into sham operated (Sham), OVX, OVX treated with E2 (E2), and OVX treated with E2 and DRSP (E2 + DRSP) groups. Hemodynamic parameters were directly evaluated by catheter insertion into the femoral artery. Endothelium-dependent vasodilation in response to bradykinin in the coronary arterial bed was assessed using isolated hearts according to a modified Langendorff method. Coronary protein expression of endothelial nitric oxide synthase and estrogen receptor alpha (ER- α) was assessed by Western blotting. Histological slices of coronary arteries were stained with hematoxylin and eosin, and morphometric parameters were analyzed. Oxidative stress was assessed *in situ* by dihydroethidium fluorescence. Ovariectomy increased systolic blood pressure, which was only prevented by E2 + DRSP treatment. Estrogen deficiency caused endothelial dysfunction, which was prevented by both treatments. However, the vasodilator response in the E2 + DRSP group was significantly higher at the three highest concentrations compared with the OVX group. Reduced ER- α expression in OVX rats was restored by both treatments. Morphometric parameters and oxidative stress were augmented by OVX and reduced by E2 and E2 + DRSP treatments. Hormonal therapy with E2 and DRSP may be an important therapeutic option in the prevention of coronary heart disease in hypertensive post-menopausal women.

Key words: Menopause; Hypertension; Hormone therapy; Drospirenone; Coronary reactivity

Introduction

Coronary heart disease (CHD) is a major cause of morbidity and mortality worldwide (1), and hypertension is established as one of the main risk factors for the development of CHD (2). Prior to menopause, women exhibit lower blood pressure (BP) compared with age-matched men. However, aging and decreased circulating estrogen (E2) levels are accompanied by increased BP, which contributes to a greater prevalence of hypertension and an increased prevalence of CHD during the post-menopausal period (3), suggesting a protective role for E2. Experimental studies analyzing the effects of estrogen replacement therapy

in ovariectomized (OVX) rats have demonstrated many beneficial effects on the cardiovascular system. These beneficial effects include the capacity to lower BP in normotensive and hypertensive rats (4–6), reduce oxidative stress (4), prevent endothelial dysfunction, improve endothelium-dependent coronary vascular reactivity, and protect against vascular remodeling in early-stage hypertensive rats (7,8).

However, randomized clinical trials such as the Women's Health Initiative and the Heart and Estrogens/progestin Replacement Study, which analyzed primary and secondary prevention, respectively, have failed to

Correspondence: E.R.G. Claudio: <erick_edf@yahoo.com.br>

Received January 16, 2015 | Accepted June 29, 2015

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.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats



João V.S. Coutinho^{a,1}, Leandro C. Freitas-Lima^{a,1}, Frederico F.C.T. Freitas^b, Flávia P.S. Freitas^b, Priscila L. Podratz^a, Rafaella P.L. Magnago^a, Marcella L. Porto^b, Silvana S. Meyrelles^b, Elisardo C. Vasquez^b, Poliane A.A. Brandão^c, Maria T.W.D. Carneiro^c, Francisca D. Paiva-Melo^d, Leandro Miranda-Alves^{d,e}, Ian V. Silva^a, Agata L. Gava^{b,**}, Jones B. Graceli^{a,*}

^a Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^b Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Brazil

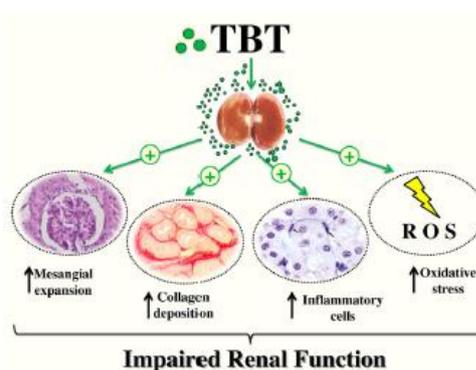
^d Experimental Endocrinology Research Group, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^e Postgraduate Program in Endocrinology, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

HIGHLIGHTS

- TBT reduced GFR and increased proteinuria levels in female rats.
- TBT increased renal mesangial expansion and collagen deposition.
- TBT increased inflammation and oxidative stress in renal tissue.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2016

Received in revised form 9 July 2016

Accepted 8 August 2016

Available online 10 August 2016

ABSTRACT

Tributyltin chloride (TBT) is an organometallic pollutant that is used as a biocide in antifouling paints. TBT induces several toxic and endocrine-disrupting effects. However, studies evaluating the effects of TBT on renal function are rare. This study demonstrates that TBT exposure is responsible for improper renal function as well as the development of abnormal morphophysiology in mammalian kidneys. Female rats were treated with TBT, and their renal morphophysiology was assessed. Morphophysiological

* Corresponding author at: Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, Departamento de Morfologia/CCS, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Prédio do básico I, sala 5, 29044-090 Vitória, ES, Brazil.

** Corresponding author at: Laboratório de Fisiologia Translacional, Departamento de Ciências Fisiológicas/ CCS, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, 29042-755 Vitória, ES, Brazil.

E-mail addresses: agatagava@hotmail.com (A.L. Gava), jbgraceli@gmail.com (J.B. Graceli).

¹ These authors contributed equally to this study.

Pomegranate peel extract attenuates oxidative stress by decreasing coronary angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in hypertensive female rats

Roger L. dos Santos^a, Lais O. Dellacqua^a, Nathalie T. B. Delgado^a, Wender N. Rouver^a, Priscila L. Podratz^a, Leandro C. F. Lima^b, Mariela P. C. Piccin^c, Silvana S. Meyrelles^a, Helder Mauad^a, Jones B. Graceli^d, and Margareth R. Moyses^a

^aDepartment of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil; ^bDepartment of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^cDepartment of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ^dDepartment of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

ABSTRACT

Based on the antioxidant properties of pomegranate, this study was designed to investigate the effects of pomegranate peel extract on damage associated with hypertension and aging in a spontaneously hypertensive rat (SHR) model. The influence of pomegranate consumption was examined on systolic blood pressure (SBP), angiotensin-converting enzyme (ACE) coronary activity, oxidative stress, and vascular morphology. Four- or 28-wk-old SHR model rats were treated for 30 d, with terminal experimental animal age being 8 and 32 wk, respectively, with either pomegranate extract (SHR-PG) or filtered water (SHR). Data showed significant reduction in SBP and coronary ACE activity in both age groups. The levels of superoxide anion, a measure of oxidative stress, were significantly lower in animals in the SHR-PG group compared to SHR alone. Coronary morphology demonstrated total increases in vascular wall areas were in the SHR group, and pomegranate peel extract diminished this effect. Pomegranate peel extract consumption conferred protection against hypertension in the SHR model. This finding was demonstrated by marked reduction in coronary ACE activity, oxidative stress, and vascular remodelling. In addition, treatment was able to reduce SBP in both groups. Evidence indicates that the use of pomegranate peel extract may prove beneficial in alleviating coronary heart disease.

ARTICLE HISTORY

Received 27 November 2015
Accepted 30 May 2016

Systemic arterial hypertension is considered a global public health problem with 9.4 million deaths attributed to it annually (Lima et al., 2012). As this condition is a major cardiovascular manifestation (Kearney et al., 2005), prevention and treatment of systemic arterial hypertension should receive high priority. Age is a significant risk factor in development of cardiovascular disease; however, striking gender differences also exist in the chronological development of heart disease (Rosamond et al., 2007).

In human and experimental hypertension models, such as spontaneously hypertensive rats (SHR), endothelium-dependent relaxation may be attenuated, and the resulting endothelial dysfunction contributes to increased peripheral resistance. Endothelial dysfunction has been linked to decreases in nitric oxide (NO) bioavailability, reflecting impaired generation of NO and/or

enhanced inactivation of NO by free radicals (Púzserová et al., 2010).

Free radicals are any species capable of independent existence with at least one unpaired electron, such as superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) (Forman et al., 2008). The relationship between free radicals and hypertension was first suggested in the 1960s (Romanowskia et al., 1960), but only in the 1990s was this association investigated extensively. The administration of heparin-bound superoxide dismutase (SOD) to SHR animals was associated with a reduction in blood pressure (Nakazono et al., 1991). This decrease in systolic blood pressure (SBP) following administration of SOD may be due to a fall in reactive oxygen species (ROS), which may contribute to elevation in blood pressure, either directly, related to vasoconstrictor effects, or indirectly, by reducing the

CONTACT Prof. Roger Lyrio dos Santos, PhD  rogerlyrio@hotmail.com 

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/uteh

© 2016 Taylor & Francis



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats



Gabriela C. Sena^{a,1}, Leandro C. Freitas-Lima^{a,1}, Eduardo Merlo^a, Priscila L. Podratz^a, Julia F.P. de Araújo^a, Poliane A.A. Brandão^b, Maria T.W.D. Carneiro^b, Marina C. Zicker^c, Adaliene V.M. Ferreira^d, Christina M. Takiya^e, Carolina M. de Lemos Barbosa^e, Marcelo M. Morales^e, Ana Paula Santos-Silva^{e,f,g}, Leandro Miranda-Alves^{f,g}, Ian V. Silva^a, Jones B. Graceli^{a,*}

^a Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^c Department of Food Science, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Brazil

^d Department of Basic Nursing, Nursing School, Federal University of Minas Gerais, Brazil

^e Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^f Experimental Endocrinology Research, Development and Innovation Group, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^g Postgraduate Program in Endocrinology, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2016

Revised 27 January 2017

Accepted 30 January 2017

Available online 2 February 2017

Keywords:

Tributyltin chloride
Endocrine-disrupting chemicals
HPG axis
Kisspeptin
Obesity
Leptin

ABSTRACT

Tributyltin chloride (TBT) is a xenobiotic used as a biocide in antifouling paints that has been demonstrated to induce endocrine-disrupting effects, such as obesity and reproductive abnormalities. An integrative metabolic control in the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis was exerted by leptin. However, studies that have investigated the obesogenic TBT effects on the HPG axis are especially rare. We investigated whether metabolic disorders as a result of TBT are correlated with abnormal hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis function, as well as kisspeptin (Kiss) action. Female Wistar rats were administered vehicle and TBT (100 ng/kg/day) for 15 days via gavage. We analyzed their effects on the tin serum and ovary accumulation (as biomarker of TBT exposure), estrous cyclicity, surge LH levels, GnRH expression, Kiss action, fertility, testosterone levels, ovarian apoptosis, uterine inflammation, fibrosis, estrogen negative feedback, body weight gain, insulin, leptin, adiponectin levels, as well as the glucose tolerance (GTT) and insulin sensitivity tests (IST). TBT led to increased serum and ovary tin levels, irregular estrous cyclicity, and decreased surge LH levels, GnRH expression and Kiss responsiveness. A strong negative correlation between the serum and ovary tin levels with lower Kiss responsiveness and GnRH mRNA expression was observed in TBT rats. An increase in the testosterone levels, ovarian and uterine fibrosis, ovarian apoptosis, and uterine inflammation and a decrease in fertility and estrogen negative feedback were demonstrated in the TBT rats. We also identified an increase in the body weight gain and abnormal GTT and IST tests, which were associated with hyperinsulinemia, hyperleptinemia and hypo adiponectinemia, in the TBT rats. TBT disrupted proper functioning of the HPG axis as a result of abnormal Kiss action. The metabolic dysfunctions co-occur with the HPG axis abnormalities. Hyperleptinemia as a result of obesity induced by TBT may be associated with abnormal HPG function. A strong negative correlation between the hyperleptinemia and lower Kiss responsiveness was observed in the TBT rats. These findings provide evidence that TBT leads to toxic effects direct on the HPG axis and/or indirectly by abnormal metabolic regulation of the HPG axis.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis is the principal modulator of reproductive function. In females, the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron plays a pivotal role in the regulation of the cascade of hormonal events necessary for normal reproduction (Bauer-Dantoin et al., 1995). GnRH is a peptide

* Corresponding author at: Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, Departamento de Morfologia/CCS, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Prédio do básico I, sala 5, 29044-090 Vitória, ES, Brazil

E-mail address: jbgraceli@gmail.com (J.B. Graceli).

¹ GCS and LCFL contributed equally to the study.



RESEARCH ARTICLE

Tributyltin chloride disrupts aortic vascular reactivity and increases reactive oxygen species production in female rats

Carolina Falcão Ximenes¹ · Samya Mere Lima Rodrigues¹ · Priscila Lang Podratz² · Eduardo Merlo² · Julia Fernandez Puñal de Araújo² · Lívia Carla Melo Rodrigues¹ · Juliana Barbosa Coitinho¹ · Dalton Valentim Vassallo¹ · Jones Bernardes Graceli² · Ivanita Stefanon¹

Received: 14 September 2016 / Accepted: 1 September 2017
 © Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Organotin compounds, such as tributyltin (TBT), are environment contaminants that induce bioaccumulation and have potential toxic effects on marine species and mammals. TBT have been banned by the International Maritime Organization in 2003. However, the assessment of butyltin and metal contents in marine sediments has demonstrated high residual levels of TBT in some cases exceeding 7000 ng Sn g⁻¹. The acceptable daily intake (ADI) level for TBT established by the World Health Organization is 0.5 µg/kg bw/day is based on genotoxicity, reproduction, teratogenicity, immunotoxicity, and mainly neurotoxicity. However, their effect on the cardiovascular system is not well understood. In this study, female rats were exposed to 0.5 µg/kg/day of TBT for 15 days with the goal of understanding the effect of TBT on vascular function. Female Wistar rats were treated daily by gavage and divided into control (*n* = 10) and TBT (*n* = 10) groups. The aortic rings were incubated with phenylephrine in both the presence and absence of endothelium. The phenylephrine concentration–response curves were generated by exposing endothelium-intact samples to N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), apocynin, superoxide dismutase (SOD), catalase, tiron, and allopurinol. Acetylcholine (ACh)

and sodium nitroprusside (SNP) were used to evaluate the relaxation response. Exposure to TBT reduced serum 17β-estradiol E₂ levels and increased vascular reactivity. After incubation with L-NAME, the vascular reactivity to phenylephrine was significantly higher. Apocynin, SOD, catalase, and tiron decreased the vascular reactivity to phenylephrine to a significantly greater extent in TBT-treated rats than in the control rat. The relaxation induced by ACh and SNP was significantly reduced in TBT rats. Exposure to TBT induced aortic wall atrophy and increased superoxide anion production and collagen deposition. These results provide evidence that exposing rats to the current ADI for TBT (0.5 µg/kg) for 15 days induced vascular dysfunction due to oxidative stress and morphological damage and should be considered an important cardiovascular risk factor.

Keywords Tributyltin chloride · Aortic vascular reactivity · Oxidative stress · Estrogen

Introduction

Tributyltin (TBT) is an organotin (OT) compound used in the antifouling of ship paints and as an agricultural fungicide (Bryan et al. 1986; Hoch 2001). OTs such as TBT are widely distributed in the oceans, and its high hydrophobicity in the environment promotes bioaccumulation that can result in toxic effects within food webs (Galloway 2006; Antizar-Ladislao 2008).

Although TBT use in paints has been banned by the International Maritime Organization and European Union since 2003, it is still found at high levels that exceed toxicity limits in certain ecosystems and seafood (Antizar-Ladislao 2008). Studies have reported that the toxicological effect of TBT can be expected to persist for years after exposure

Responsible editor: Markus Hecker

✉ Jones Bernardes Graceli
 jbraceli@gmail.com

✉ Ivanita Stefanon
 ivanitaufes@hotmail.com

¹ Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo 29042-755, Brazil

² Department of Morphology/CCS, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo 290440-090, Brazil



Organotin Exposure and Vertebrate Reproduction: A Review

Julia Fernandez Puñal de Araújo[†], Priscila Lang Podratz^{**}, Eduardo Merlo, Isabela Valim Sarmento, Charles Santos da Costa, Oscar Mauricio Santamaria Niño, Rodrigo Alves Faria, Leandro Ceotto Freitas Lima and Jones Bernardes Graceli

Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Riccardo Pierantoni,
Università degli Studi della Campania
"Luigi Vanvitelli" Caserta, Italy

Reviewed by:

Paola Piomboni,
University of Siena, Italy
Gilberto Mosconi,
University of Camerino, Italy

*Correspondence:

Priscila Lang Podratz
priscilapodratz@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Experimental Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 28 November 2017

Accepted: 12 February 2018

Published: 01 March 2018

Citation:

de Araújo JFF, Podratz PL, Merlo E,
Sarmento IV, da Costa CS,
Niño OMS, Faria RA, Freitas Lima LC
and Graceli JB (2018) Organotin
Exposure and Vertebrate
Reproduction: A Review.
Front. Endocrinol. 9:64.
doi: 10.3389/fendo.2018.00064

Organotin (OTs) compounds are organometallic compounds that are widely used in industry, such as in the manufacture of plastics, pesticides, paints, and others. OTs are released into the environment by anthropogenic actions, leading to contact with aquatic and terrestrial organisms that occur in animal feeding. Although OTs are degraded environmentally, reports have shown the effects of this contamination over the years because it can affect organisms of different trophic levels. OTs act as endocrine-disrupting chemicals (EDCs), which can lead to several abnormalities in organisms. In male animals, OTs decrease the weights of the testis and epididymis and reduce the spermatid count, among other dysfunctions. In female animals, OTs alter the weights of the ovaries and uteri and induce damage to the ovaries. In addition, OTs prevent fetal implantation and reduce mammalian pregnancy rates. OTs cross the placental barrier and accumulate in the placental and fetal tissues. Exposure to OTs *in utero* leads to the accumulation of lipid droplets in the Sertoli cells and gonocytes of male offspring in addition to inducing early puberty in females. In both genders, this damage is associated with the imbalance of sex hormones and the modulation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. Here, we report that OTs act as reproductive disruptors in vertebrate studies; among the compounds are tetrabutyltin, tributyltin chloride, tributyltin acetate, triphenyltin chloride, triphenyltin hydroxide, dibutyltin chloride, dibutyltin dichloride, diphenyltin dichloride, monobutyltin, and azocyclotin.

Keywords: organotin compounds, reproduction, vertebrates, endocrinology, environmental pollutants

INTRODUCTION

Organotins (OTs) are organometallic compounds that are widely used in industry, such as in the manufacture of plastics, pesticides, paints, and others (1, 2). Despite being easily degraded in the environment, several studies have shown the toxicological effects in different trophic levels of the food chain (3, 4). In 2008, the World Health Organization decreed a ban on the use of OTs in paints on vessels. However, many countries did not adopt this ban. OTs are classified as endocrine-disrupting chemicals (EDCs), leading to inappropriate endocrine system functioning in various species (5, 6). Thus, their exposure can cause damage, sometimes irreversibly, such as the process of *imposex* in which female gastropods develop male sex organs (3). For humans and other vertebrates, the major route of OTs exposure is by the intake of contaminated seafood, and studies evaluating their toxicological risks are limited (7–11). OTs impair reproductive functioning, and the damage is associated with the imbalance of sex hormones and with improper modulation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis function of rodents (12–14). Here, we report that OTs act as reproductive disruptors in vertebrate



Estrogen Therapy Worsens Cardiac Function and Remodeling and Reverses the Effects of Exercise Training After Myocardial Infarction in Ovariectomized Female Rats

Simone Alves de Almeida¹, Erick R. G. Claudio¹, Vinicius Mengal¹, Girlandia A. Brasil², Eduardo Merlo³, Priscila L. Podratz³, Jones B. Graceli³, Sonia A. Gouvea¹ and Gláucia Rodrigues de Abreu^{1*}

¹ Laboratório de Regulação Neurohumoral da Circulação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, ² Núcleo de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas – Nupecfarma, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Vila Velha, Brazil, ³ Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil

Edited by:

Jinlei Nie,
Macao Polytechnic Institute, Macau

Reviewed by:

Leonardo Roever,
Federal University of Uberlândia, Brazil
Attila Olah,
Semmelweis University, Hungary

***Correspondence:**

Gláucia Rodrigues de Abreu
abreugr1994@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Exercise Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 05 June 2018

Accepted: 16 August 2018

Published: 05 September 2018

Citation:

Almeida SA, Claudio ERG, Mengal V,
Brasil GA, Merlo E, Podratz PL,
Graceli JB, Gouvea SA and Abreu GR
(2018) Estrogen Therapy Worsens
Cardiac Function and Remodeling
and Reverses the Effects of Exercise
Training After Myocardial Infarction
in Ovariectomized Female Rats.
Front. Physiol. 9:1242.
doi: 10.3389/fphys.2018.01242

There is an increase in the incidence of cardiovascular events such as myocardial infarction (MI) after menopause. However, the use of estrogen therapy (E2) remains controversial. The aim of this study was to evaluate the effects of E2, alone and combined with exercise training (ET), on cardiac function and remodeling in ovariectomized (OVX) rats after MI. *Wistar* female rats underwent ovariectomy, followed by MI induction were separated into five groups: S; MI; MI+ET; MI+E2; and MI+ET+E2. Fifteen days after MI or sham surgery, treadmill ET and/or estrogen therapy [17- β estradiol-3-benzoate (E2), s.c. three times/week] were initiated and maintained for 8 weeks. After the treatment and/or training period, the animals underwent cardiac hemodynamic evaluation through catheterization of the left ventricle (LV); the LV systolic and diastolic pressures (LVSP and LVEDP, respectively), maximum LV contraction and relaxation derivatives (dP/dt+ and dP/dt-), and isovolumic relaxation time (Tau) were assessed. Moreover, histological analyses of the heart (collagen and hypertrophy), cardiac oxidative stress [advanced oxidation protein products (AOPPs)], pro- and antioxidant protein expression by Western blotting and antioxidant enzyme activity in the heart were evaluated. The MI reduced the LVSP, dP/dt+ and dP/dt- but increased the LVEDP and Tau. E2 did not prevent the MI-induced changes in cardiac function, even when combined with ET. An increase in the dP/dt+ was observed in the E2 group compared with the MI group. There were no changes in collagen deposition and myocyte hypertrophy caused by the treatments. The increases in AOPP, gp91-phox, and angiotensin II type 1 receptor expression induced by MI were not reduced by E2. There were no changes in the expression of catalase caused by MI or by the treatments, although, a reduction in superoxide dismutase (SOD) expression occurred in the groups subjected to E2 treatment. Whereas there were post-MI reductions in activities of SOD



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

The obesogen tributyltin induces abnormal ovarian adipogenesis in adult female rats

Julia F.P. de Araújo^a, Priscila L. Podratz^a, Gabriela C. Sena^a, Eduardo Merlo^a, Leandro C. Freitas-Lima^a, Júlia Gringorini Mori Ayub^a, Amanda Fidalgo Zogaib Pereira^a, Ana Paula Santos-Silva^{b,c}, Leandro Miranda-Alves^{c,d}, Ian V. Silva^a, Jones B. Graceli^{a,*}

^a Dept of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Brazil

^b Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^c Experimental Endocrinology Research, Development and Innovation Group, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^d Postgraduate Program in Endocrinology, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Tributyltin chloride
Endocrine-disrupting chemicals
Ovarian adipogenesis
Inflammation
Oxidative stress

ABSTRACT

Tributyltin chloride (TBT) is an obesogen associated with various metabolic and reproductive dysfunctions after in utero exposure. However, few studies have evaluated TBT's obesogenic effect on adult ovaries. In this study, we assessed whether TBT's obesogenic effects resulted in adult ovarian adipogenesis and other reproductive abnormalities. TBT was administered to adult female Wistar rats, and their reproductive tract morphophysiology was assessed. We further assessed the ovarian mRNA/protein expression of genes that regulate adipogenesis. Rats exposed to TBT displayed abnormal estrous cyclicity, ovarian sex hormone levels, ovarian follicular development and ovarian steroidogenic enzyme regulation. Rats exposed to TBT also demonstrated abnormal ovarian adipogenesis with increased cholesterol levels, lipid accumulation, and PPAR γ , C/EBP- β and Lipin-1 expression. A negative correlation between the ovarian PPAR γ expression and aromatase expression was observed in the TBT rats. Furthermore, TBT exposure resulted in reproductive tract atrophy, inflammation, oxidative stress and fibrosis. Ovarian dysfunctions also co-occurred with the uterine irregularities. Abnormal ovarian adipogenic markers occurring after TBT exposure may be associated with uterine irregularities. A positive correlation between the ovarian cholesterol levels and uterine inflammation was observed in the TBT rats. These findings suggest that TBT leads to ovarian obesogenic effects directly by abnormal adipogenesis and/or indirectly through adult reproductive tract irregularities.

1. Introduction

Increased industrial advances correlate with substantial changes in the chemical environment resulting from new industrial and agricultural procedures initiated over the past 40 years (Colborn et al., 1993; Casals-Casas and Desvergne, 2011). Synthetic chemicals used in a variety of industrial and agricultural applications are leading to widespread environmental contamination (Colborn et al., 1993; Thomas Zoeller et al., 2012). Although the intended uses of pesticides, solvents and other chemicals are favourable, the effects on the environment and human health are a global concern (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Thomas Zoeller et al., 2012). A subclass of these xenobiotics are called endocrine-disrupting chemicals (EDCs), which disrupt the production, release, metabolism, and elimination of natural hormones; the EDCs can also mimic the occurrence of natural hormones, leading to

developmental, metabolic and reproductive abnormalities (Tabb and Blumberg, 2006; Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

The major industrial chemicals considered EDCs and their classes have been reviewed (Gore, 2016). Current estimates have identified approximately 1000 chemicals that meet the EDC criteria, most of which are poorly studied (FDAUSA, 2010; TEDX, 2015). Obesogens, an EDC subclass, that can disrupt sensitive metabolic processes if exposure occurs during early development, have been identified and act as a metabolic programmer to increase the obesity risk (Grün and Blumberg, 2009; Heindel, 2003). Obesogen chemicals predispose individuals to weight gain due to changes in the metabolic 'set-points', such as with organotins (OTs), particularly if exposure occurs during sensitive periods of early life (Grün et al., 2006; Heindel et al., 2015).

OTs, such as tributyltin (TBT), are persistent organometallic pollutants widely used as agricultural and wood biocides, as molluscicides,

* Corresponding author at: Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, Departamento de Morfologia/CCS, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Prédio do básico I, sala 5, 29044-090 Vitória, ES, Brasil.

E-mail address: jbgraceli@gmail.com (J.B. Graceli).

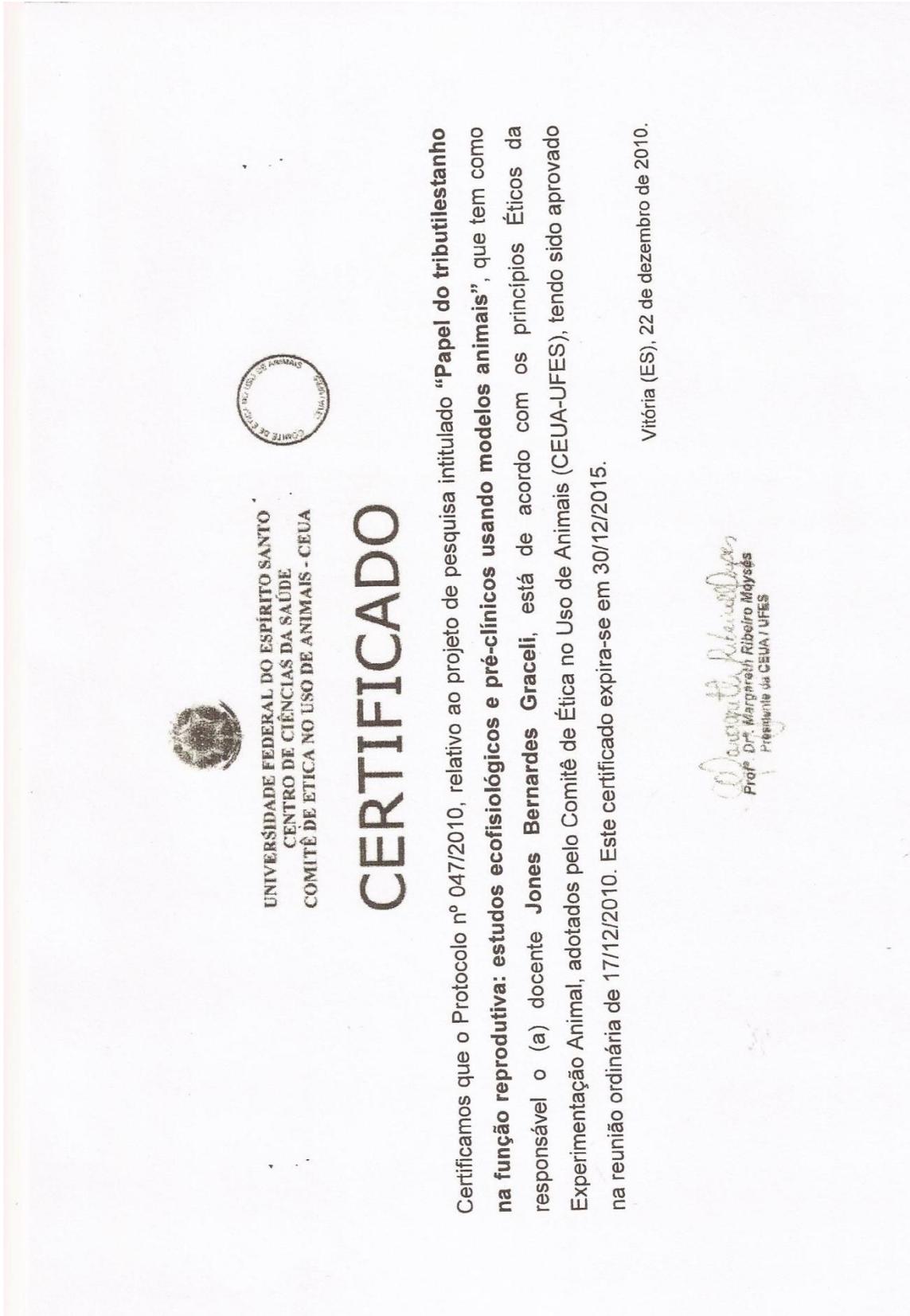
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.1068>

Received 19 February 2018; Received in revised form 7 June 2018; Accepted 12 June 2018

Available online 15 June 2018

0378-4274/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

9.3 Certificados da CEUA





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Mecanismos moleculares envolvidos na função placentária e na caracterização reprodutiva e metabólica de F1 pela herança transgeracional de exposição a mariscos contaminados com organostânios ", **Protocolo nº.01/2017, sob a responsabilidade de** Jones Bernardes Graceli **que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino)encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA),e foi aprovado "Ad Referendum" em 21-03-2017 e ciência aos membros na reunião da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde- Maruípe-Vitória-ES em 07-04-2017.**

Vigência do Projeto	Início: Abril/2017 Término: Novembro/2018
Espécie/Linhagem	<i>Ratus norvegicus albinus</i> , Linhagem: <i>Wistar</i>
Nº de Animais	Experimento Piloto:0 Experimental: 60 fêmeas e 30 machos Total:90
Peso/Idade	Peso:~ 230g Idade:3 meses
Sexo	Ambos
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 07 de abril de 2017.


Prof. Roger Lyfício dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES