



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUDMILLA CARVALHO RANGEL RESGALA

O ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DE DOENÇAS METABÓLICAS

VITÓRIA, ES

2019

LUDMILLA CARVALHO RANGEL RESGALA

O ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DE DOENÇAS METABÓLICAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob orientação da Prof. Dr. Ian Victor Silva e coorientação da Prof^a Dra Letícia Batista de Azevedo Rangel como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

VITÓRIA, ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

R429e RESGALA, LUDMILLA CARVALHO RANGEL, 1980-
O estudo ultraestrutural de doenças metabólicas /
LUDMILLA CARVALHO RANGEL RESGALA. - 2019.
161 f. : il.

Orientador: IAN VICTOR SILVA.

Coorientadora: LETÍCIA BATISTA DE AZEVEDO
RANGEL.

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

1. Metabolismo. 2. Osteoporose. 3. Doença de Alzheimer. 4. Amiloidose. 5. Compostos organoestanhos. 6. Microscopia. I. SILVA, IAN VICTOR. II. RANGEL, LETÍCIA BATISTA DE AZEVEDO. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

O ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DE DOENÇAS METABÓLICAS

Exame de defesa de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob orientação do Prof. Dr. Ian Victor Silva e coorientação da Prof^a Letícia Batista de Azevedo Rangel como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Apresentada em 28/02/2019

LUDMILLA CARVALHO RANGEL RESGALA

Comissão Examinadora:

**Profa. Dra. Letícia Batista Azevedo Rangel – RENORBIO/UFES
(Coorientadora)**

Profa. Dra. Flávia de Paula – RENORBIO/UFES (membro titular)

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa– RENORBIO/UFC (membro titular)

Prof. Dr. Fernando Luiz Herkenhoff Vieira – UFES (membro titular)

Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida– UENF (membro titular)

VITÓRIA,ES

2019

Dedico este trabalho
aos meus amados
Renato, Renan e
Maria Clara.

AGRADECIMENTOS

Para que a realização desse trabalho fosse possível, agradeço a Deus que em toda sua honra e glória permitiu que tudo fosse tangível.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo que permitiu, através de seu Programa de Pós-graduação, que eu tivesse a oportunidade de realizar esse sonho.

Agradeço também à UniRedentor pelo apoio, incentivo e colaboração para realização do doutorado como parte da minha formação acadêmico-científica.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, pela minha formação prévia na graduação e mestrado, que foram fundamentais para que o desenvolvimento do doutorado fosse possível. Além disso, agradeço pela colaboração firmada com os professores Dr^a Maura da Cunha e Dr. André Lacerda, que durante o desenvolvimento desse trabalho me deram acesso irrestrito aos respectivos laboratórios, reagentes e equipamentos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ian Victor da Silva, por me aceitar como aluna e mesmo sem me conhecer confiou em mim e na minha capacidade de pesquisa e execução. Espero não ter decepcionado. Muito obrigada pela orientação, professor.

A professora Dr^a Letícia Rangel, por aceitar a coorientação e nortear e apoiar a fase crucial do doutoramento. Muito obrigada pelos valiosos conselhos.

Agradeço profundamente à minha querida amiga Dr^a. Neuza Gomes-Rochette, pela amizade, ajuda e valiosos conselhos, durante todos os “pontos críticos” do processo. Muito obrigada, minha amiga.

Aos professores Dr^a Cláudia do Ó Pessoa, Dr^a Flávia de Paula, Dr^a Sandra Zeidler, Dr. Fernando Herkenhoff e Dr. João Almeida e por aceitarem, gentilmente, fazer parte desta banca avaliadora.

A todos os alunos de graduação e pós-graduação com os quais tive a oportunidade de conviver em diferentes momentos e que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

Ao meu amado marido Renato Resgala, pelo total apoio, amor e incentivo. Sem você, certamente esse sonho não seria possível. Obrigada por entender toda minha ausência, apoiar e me ajudar em todas as vezes em que precisei. Eu te amo.

Ao meu bem maior, Renan, por entender a ausência da mamãe e me apoiar. Filho, no fim, tudo sempre foi e sempre será por você.

A minha amada Maria Clara, filha que a vida me deu, obrigada por fazer de mim alguém melhor.

A minha família mãe Sírley, pai Luiz, tia Ivone, irmãs, Jackeline e Michelle e prima Thamara. Muito obrigada pelo apoio e pela compreensão da minha ausência em vários momentos. Amo vocês.

E, finalmente, às agências de apoio financeiro que foram fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa: CAPES, CNPq, FAPES e UniREDENTOR.

“You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end each of us must work for his own improvement, and at the same time share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful.”

(Marie Curie)

RESUMO

Os danos celulares podem ser causados por fatores relacionados ao envelhecimento ou provocados por agentes causadores de estresse. Nesse estudo, nosso objetivo geral foi estudar a ultraestrutura de doenças metabólicas. Dentre as doenças metabólicas relacionadas ao envelhecimento destacam-se a osteoporose e a doença de Alzheimer (DA) e, para esse estudo, utilizamos camundongos C57 Black 6, de 12 meses de idade, SHAM, ovariectomizadas (OVX), APOEKO e APOEKO/OVX como modelos de osteoporose e DA. Através da análise ultraestrutural, revelamos que os danos causados no cérebro de animais APOEKO, como arterosclerose, quebra da barreira hematoencefálica, ativação de micróglia, formação de NFT's e perda de neurópilo foram potencializados pela depleção de estrogênio. Nossos dados acerca da ultraestrutura óssea revelaram que os danos à microarquitetura óssea dos animais APOEKO/OVX foram mais graves, tal como ocorreu no cérebro, quando comparados aos outros grupos. Além disso, descrevemos, pela primeira vez, que a amiloidose em animais APOEKO é potencializada pela deficiência de estrogênio (OVX). No que diz respeito ao estudo ultraestrutural da doença metabólica provocada por estresse, utilizamos como modelo ratas Wistar tratadas com 100 ng/kg/dia de tributilestanho (TBT), um organoestanho poluente considerado altamente tóxico, por um período de 15 dias. Nossos resultados revelaram que o estresse por TBT foi capaz de desencadear danos na microarquitetura óssea das vértebras das ratas, em um processo semelhante à osteoporose. Além disso, vimos que a densidade mineral (DMO) óssea foi menor nas ratas tratadas. Nossos estudos demonstram também, pela primeira vez, que o TBT é um poluente capaz de promover graves danos no metabolismo ósseo, como desenvolvimento de osteoporose. Possivelmente, o TBT atua afetando o metabolismo do estrogênio na manutenção da microarquitetura óssea ou ainda substituindo erroneamente outros íons divalentes como Ca^{2+} ou Mg^{2+} na formação da matriz mineral óssea.

Palavras-chave: osteoporose, doenças de Alzheimer, amiloidose, apolipoproteína-E, tributilestanho.

ABSTRACT

Cell damage can be caused by factors related to aging or caused by stressors. In this study, our general objective was to study the ultrastructure of metabolic diseases. Among the metabolic diseases related to aging, osteoporosis and Alzheimer's disease (AD) are highlighted, and for this study we used C57 Black 6, 12 months old, SHAM, ovariectomized (OVX), APOEKO and APEKO/OVX mice as osteoporosis and AD models. Through ultrastructural analysis, we revealed that damage to the brain of APOEKO animals, such as atherosclerosis, breakdown of the blood-brain barrier, microglial activation, NFT's formation, neuropil loss, were potentiated by estrogen depletion. Our data on bone ultrastructure revealed that damage to the bone microarray of the APOEKO / OVX animals was more severe, as occurred in the brain, when compared to the other groups. In addition, we have described for the first time that amyloidosis in APOEKO animals is potentiated by estrogen deficiency (OVX). Regarding the ultrastructural study of metabolic disease caused by stress, we used as a model Wistar rats treated with 100 ng / kg / day of tributyltin (TBT), a pollutant organotin considered to be highly toxic for 15 days. Our results revealed that TBT stress was able to trigger damage in the bone microarchitecture of the vertebrae of the rats, in a process similar to osteoporosis. In addition, we have seen that bone mineral density (BMD) was lower in the treated rats. Our also demonstrate, for the first time, that TBT is a pollutant capable of promoting serious damage to bone metabolism, such as the development of osteoporosis. Possibly TBT affects the estrogen metabolism in the maintenance of the bone microarchitecture or even erroneously replacing other divalent ions such as Ca^{2+} or Mg^{2+} in the formation of the bone mineral matrix.

Keywords: osteoporosis, Alzheimer's disease, amyloidosis, apolipoprotein E, tributyltin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADP – adenosina difosfato
- apo-E – apolipoproteína E
- APOE – gene da apolipoproteína E
- APOE4 – apolipoproteína-E, tipo 4
- APOEKO – animais com ausência do gene APOE
- ATP – adenosina trifosfato
- Au – ouro
- A β – beta amiloide
- BCAR1 - gene da proteína 1 de resistência ao antiestrogênio do câncer da mama
- C. elegans* – *Caenorhabditis elegans*
- Ca²⁺ – íon cálcio
- DA – doença de Alzheimer
- DMO – Densidade mineral óssea
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DXA - Absorciometria por Raios X de dupla emissão
- ELA – esclerose lateral amiotrófica
- ER α – receptor de estrogênio α
- FADH – flavina-adenina-dinucleotídeo
- FSH – hormônio hipofisário folículo estimulante
- GA – glutaraldeído
- H⁺ATPase – enzima próton adenosina trifosfatase
- HDL – proteína de alta densidade
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IL-2 – interleucina-2
- LDL – proteína de baixa densidade
- mDNA – DNA mitocondrial
- MET - microscopia eletrônica de transmissão
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- Mg²⁺ – íon magnésio

NADH – nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NFT – emaranhados neurofibrilares
O₂ – oxigênio singlete
O₂⁻ – superóxido
OEs – organoestênicos
OH – hidroxila
OVX – animais ovariectomizados
PA – paraformaldeído
PBS – tampão fosfato-salino
PIPES - ácido 1,4-pipeazinadietanosulfônico
Pt – platina
PTH – paratormônio
qCT – Tomografia computadorizada quantitativa
RANK – recetor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL – ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
S. pombe – *Schizosacchamomyces pombe*
SHAM – animais que foram submetidos a uma falsa ovariectomia
Sn²⁺ – estanho divalente
Sn³⁺ – estanho trivalente
TBT – Tributilestanho
TNF- α – fator- α de necrose tumoral
TRAF6 - fator 6 associado ao receptor de TNF
TSH – hormônio estimulador da tireoide
VLDL – proteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1	Corte de tecido ósseo, identificando osso compacto e esponjoso..	27
FIGURA 2	Representação esquemática do processo das fases de remodelamento ósseo.....	29
FIGURA 3	Representação esquemática do processo das fases de remodelamento do ósseo.....	30
FIGURA 4	Mecanismo da atuação da apoe no cérebro.....	37
FIGURA 5	Esquema demonstrativo da secção cerebral utilizada para a MET.....	50
FIGURA 6	Microscopia óptica de cortes histológicos cerebrais.....	60
FIGURA 7	Microscopia óptica de cortes histológicos cerebrais.....	62
FIGURA 8	Análise do neurópilo Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do cérebro	65
FIGURA 9	Microscopia Eletrônica de Transmissão de cortes do tecido cerebral de camundongos para análise ultraestrutural.....	67
FIGURA 10	Microscopia Eletrônica de Varredura da coluna vertebral de camundongos.....	69
FIGURA 11	Tomografia Computadorizada quantitativa (qCT) de coluna vertebral de camundongos para análise quali e quantitativa da densidade mineral óssea.....	70
FIGURA 12	Microscopia de Fluorescência Confocal do fígado, rim e fêmur de camundongos para identificação de placas amiloides, utilizando o método Tioflavina S	73
FIGURA 13	Microscopia Óptica do fígado de camundongos, identificação de lipídios utilizando o método Oil red.....	75
FIGURA 14	Determinação da densidade mineral óssea (DMO) de animais controle e tratados com TBT.....	77
FIGURA 15	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da coluna vertebral de ratas.....	79
FIGURA 16	Tomografia Computadorizada Quantitativa (qCT) da coluna vertebral de ratas.....	81
INFOGRÁFICO 1	Esquema dos mecanismos de dano celular, que desencadeiam doenças metabólicas como osteoporose, doença de Alzheimer e estresse por TBT.....	23
GRÁFICO 1	Quantidade de células da micróglia ativada.....	63
GRÁFICO 2	Medida da área de neurópilo perdido no cérebro de camundongos.....	66
GRÁFICO 3	Perda da massa óssea em animais analisados por qCT.....	71
GRÁFICO 4	Intensidade de fluorescência captada no fígado, rim e fêmur indicando a presença de placas amiloides através de T-S.....	74
GRÁFICO 5	Determinação da densidade mineral óssea (DMO) de animais controle e tratados com TBT, por DXA.....	78
GRÁFICO 6	Quantidade de massa mineral óssea analisada em animais controle e animais tratados com TBT.....	81
ORGANOGRAMA METODOLÓGICO.....		46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. DANO CELULAR.....	19
1.1.1. <i>Teoria Determinista</i>	19
1.1.2. <i>Teoria Estocástica</i>	21
1.2. ENVELHECIMENTO.....	24
1.2.1. <i>Osteoporose</i>	25
1.2.2. <i>Doença de Alzheimer (DA)</i>	34
1.3. ESTRESSE.....	39
1.3.1. <i>-Tributilestanho (TBT)</i>	40
2. OBJETIVO GERAL	45
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM MODELOS DE OSTEOPOROSE E ALZHEIMER	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM MODELOS DE INTOXICACAO POR TBT.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 ORGANOGRAMA METODOLÓGICO.....	46
3.1.1 <i>Estratégia metodológica</i>	48
3.2. SEÇÃO I: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE OSTEOPOROSE E DOENÇA DE ALZHEIMER.....	48
3.2.1. <i>Animais utilizados</i>	48
3.2.2. <i>Análise da ultraestrutura do cérebro</i>	49
3.2.3. <i>Análise da morfologia da coluna vertebral</i>	50
3.2.4. <i>Tomografia computadorizada quantitativa (qCT)</i>	51
3.2.5 <i>Identificação de placas amiloides</i>	52
3.2.6 <i>Identificação de agregados neurofibrilares e microglia ativada</i> . 53	
3.2.7 <i>Análise do acúmulo de lipídios</i>	54
3.3 SEÇÃO II: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE ESTRESSE POR TBT.....	56
3.3.1 <i>Animais utilizados</i>	56
3.3.2 <i>Quantificação da densidade mineral óssea</i>	57
3.3.3 <i>Análise da morfologia da coluna vertebral</i>	57
3.3.4 <i>Tomografia computadorizada quantitativa (qCT)</i>	58

4. RESULTADOS.....	59
4.1 SEÇÃO I: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE OSTEOPOROSE E DOENÇA DE ALZHEIMER.....	59
4.1.1 <i>Análise da presença de lipídios no cérebro.....</i>	59
4.1.2 <i>Análise histológica cerebral.....</i>	60
4.1.3 <i>Análise da ultraestrutura do cérebro.....</i>	64
4.1.4 <i>Análise da morfologia da coluna vertebral.....</i>	67
4.1.5 <i>Análise da densidade óssea mineral.....</i>	69
4.1.6 <i>Análise da presença de placas amiloides.....</i>	71
4.1.7 <i>Análise da presença de lipídios no fígado.....</i>	74
4.2 SEÇÃO II: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE ESTRESSE POR TBT.....	76
4.2.1 <i>Determinação da densidade mineral óssea (DMO).....</i>	77
4.2.2 <i>Análise da morfologia da coluna vertebral.....</i>	78
4.2.3 <i>Tomografia computadorizada quantitativa (qCT).....</i>	80
5. DISCUSSÃO.....	82
5.1 SEÇÃO I: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE OSTEOPOROSE E DOENÇA DE ALZHEIMER.....	82
5.2 SEÇÃO II: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE ESTRESSE POR TBT.....	94
6. CONCLUSÃO.....	101
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
8. CERTIFICADOS DO CEUA.....	117
ANEXO I.....	119
ANEXO II.....	143

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do corpo ocorre a partir de uma única célula e resulta na formação de um organismo composto de milhares de células a partir de sucessivas mitoses. À medida que o organismo se desenvolve, os tecidos se reparam e se regeneram a todo instante, em um processo altamente dinâmico (ALVARENGA, 2002). Porém, quando as células perdem a capacidade de se adaptar ou de reparar um dano, a morte celular apresenta-se como um dos recursos inevitáveis do organismo (NOCELLI, 2002). Essa incapacidade celular de se adaptar e realizar o reparo pode ser motivada por um processo natural classificado como envelhecimento ou ainda por agentes considerados como causadores de estresse (WEINERT & TIMIRAS, 2003). De toda forma, grande parte das pesquisas científicas buscam incessantemente, meios de descobrir as causas, os tratamentos e a cura das doenças com o objetivo de melhorar a qualidade e a expectativa de vida.

Estima-se que, em 2025, existirão 1,2 bilhão de pessoas no mundo com mais de 60 anos, sendo que idosos mais velhos (acima de 80 anos) constituirão um grupo etário de expressiva importância numérica (DUNCAN, *et al.*, 2012). No Brasil, em 76 anos (de 1940 a 2016) a expectativa de vida aumentou mais de 30 anos, passando a 75,8 anos atualmente (IBGE, 2017); a previsão é que em 2031, pela 1ª vez, o número de idosos (acima de 60 anos) supere o de crianças e adolescentes (0 a 14 anos), invertendo a pirâmide etária. O aumento significativo desse grupo etário deve-se a vários fatores como: melhorias no saneamento básico populacional, condições de vida mais adequadas, avanço no controle de doenças e nas tecnologias relacionadas à saúde.

O envelhecimento populacional acarretou profundas transformações na incidência e prevalência das doenças a ele relacionadas, sobretudo as chamadas Doenças Metabólicas. Dentre essas doenças, diversos estudos destacam a Osteoporose, a Doença de Alzheimer (DA) e as desencadeadas pela exposição a substâncias químicas ou agentes causadores de estresse, como sendo de suma importância no que se refere à prevalência na população idosa.

A osteoporose é a principal causa da queda e DA é o principal tipo da demência em pessoas senis. A osteoporose é definida como um distúrbio osteometabólico caracterizado pela diminuição da densidade mineral, deterioração da microarquitetura, aumento da fragilidade e aumento do risco de fraturas do esqueleto. Dentre os fatores de risco relacionados à osteoporose, destacam-se (FRÓES *et al.*, 2009): idade; depleção hormonal (estrógenos e PHT); fatores ambientais e comportamentais (COOPER *et al.*, 1992); e fatores genéticos (CAULEY *et al.*, 1999).

Dentre os fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento da osteoporose, estudos indicam que a presença de alelos APOE4 (apolipoproteína-E, tipo 4) está relacionada a uma diminuição da densidade mineral óssea, resultando no aumento no risco de fratura no grupo de mulheres estudado (SONSINE *et al.*, 2018). Na menopausa, a depleção de estrogênio resulta em um aumento da reabsorção óssea, devido a um aumento da atividade osteoclástica, a qual não é acompanhada pela atividade osteoblástica, levando a uma diminuição da massa óssea (JOHNSTON & SLEMENDA, 1995).

Já a doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por depósitos extracelulares β -amiloides ($A\beta$); agregação intracelular da proteína tau fosforilada; neurites distróficas; perda de sinapses; morte de neurônios; alterações na morfologia e função da micróglia e astrócitos. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento dessa neuropatologia, (REITZ & MAYEUX, 2014) encontram-se a idade, os fatores ambientais, comportamentais e, sobretudo, os fatores genéticos. Estudos indicam que a presença do alelo APOE4 é um importante fator de risco para o desenvolvimento dessa neuropatia, pois a presença dessa lipoproteína no cérebro promove a formação de placas amiloides e de agregados neurofibrilares (HAROLD *et al.*, 2009; LAMBERT *et al.*, 2009; SHINOHARA *et al.*, 2013).

Contudo, não são apenas as doenças reconhecidamente relacionadas ao envelhecimento celular que apresentam destaque nos estudos científicos atuais. Doenças relacionadas ao estresse por contaminantes ambientais também têm sido motivo de intensos estudos por importantes grupos de pesquisa, sendo a população idosa o grupo etário com o maior fator de risco, no que diz respeito ao tempo de exposição e aos mais diferentes tipos de estresse. Dentre os contaminantes ambientais que têm sido alvo desses estudos, pode-se destacar o Tributilestanho (TBT), que é uma classe dos organoestânicos (OEs) que contém em sua composição $(C_4H_9)_3Sn$. Esses compostos são poluentes organometálicos presentes em uma ampla variedade de produtos domésticos, industriais e agrícolas, utilizados como um poderoso composto biocida que funciona contra uma ampla variedade de organismos, como fungos e bactérias (ALZIEU *et al.*, 1986; AONO *et al.*, 2008).

O TBT especificamente é utilizado em muitos produtos industriais, como na preservação da madeira extraída, tintas anti-incrustantes para barcos e navios, desinfecção da água de circulação de resfriamento industrial, como um controle de produção de lodo em indústrias do papel e, finalmente, como estabilizante em embalagens plásticas contendo PVC (SHAWKY., 1997).

Apesar da importância econômica do uso dos OEs na indústria, diversos estudos têm relacionado esses compostos a potentes desreguladores químicos hormonais, identificados como desencadeadores de doenças metabólicas (CHAPMAN *et al.*, 1988; MALINS *et al.*, 1993; MANAHAM *et al.*, 1991; STANLEY *et al.*, 1996; FENT *et al.*, 1996)

A exposição prolongada a agentes tóxicos presentes no ambiente podem promover profundas alterações no organismo submetido ao estresse. A ampla presença de OEs no ambiente e na cadeia alimentar coloca os seres vivos em uma posição de risco a esse poluente (STANLEY *et al.*, 1996; FENT *et al.*, 1996).

O uso de diferentes técnicas de imagens para avaliar as alterações ultraestruturais em modelos experimentais para o estudos de doenças

metabólicas como a Osteoporose, Doença de Alzheimer e estresse por TBT parece ser mais uma promissora ferramenta para elucidar os mecanismos dessas doenças metabólicas.

1.1 DANO CELULAR

O processo de dano celular pode ser explicado como sucessivos eventos que podem afetar o correto funcionamento da célula, levando-a eventualmente à morte (LITHGOW, 1996; MACKAY *et al.*, 1990; ORR *et al.*, 1994; HOLLOSZY & SCHECHTMAN, 1991; SOHAL *et al.*, 1995). Diversos estudos sugerem várias teorias sobre as diferentes causas de dano à célula, dentre essas podemos destacar a Teoria Determinista e a Teoria Estocástica.

1.1.1 Teoria Determinista

Weinert & Timiras (2003) descrevem que a teoria determinista defende que o envelhecimento é desencadeado por uma programação essencialmente genética e inclui teorias como a teoria somática, a teoria neuroendócrina, a imunológica e a das telomerasas.

De acordo com a teoria somática, a longevidade celular depende do menor número de erros na replicação do seu DNA celular e da capacidade das respectivas enzimas reparadoras deste processo. Deste modo, o maior ou menor tempo de vida das diferentes espécies animais estaria associado a uma maior ou menor da acumulação de mutações nas respectivas células somáticas (MARTIN *et al.*, 1980; CRISTOFALO *et al.*, 1994; LITHGOW & KIRKWOOD, 1996). Quando a acumulação de mutações nas células somáticas impossibilita a manutenção da fidelidade e replicação do material genético, a célula começa a evidenciar um fenótipo de dano e de perda da funcionalidade.

A teoria neuroendócrina descreve que o nível de dano celular é o resultado do declínio de diversos hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, que controlam o sistema reprodutor, o metabolismo e outros aspectos do

funcionamento normal de um organismo (FINCH, 1994; LEVIN, 2001; MILLER, 1994). O sistema neuroendócrino, controlado pelo hipotálamo e pela hipófise, regula a liberação e inibição dos hormônios secretados para a circulação sanguínea sob a influência dos neurotransmissores e neuropeptídeos (SARKAR *et al.*, 1998; TERRY & HALTER *et al.*, 1994). Esta teoria defende que a atividade do hipotálamo depende da expressão de genes específicos, os quais, independentemente da influência dos fatores estocásticos, alteram a sua expressão com a idade, condicionando um conjunto de funções diretamente dependentes do sistema neuroendócrino (JOHNSON & FINCH, 1996). A incapacidade funcional do sistema reprodutor feminino – menopausa – e suas características – diminuição da secreção hormonal do ovário e aumento das gonadotrofinas – (WELLS, 1991; WISE *et al.*, 1996, SOUZA *et al.*, 2018) constituem fenótipos de envelhecimento. Assim, a teoria neuroendócrina considera que a incapacidade fisiológica do organismo associada à idade pode ser explicada com base na alteração hormonal resultante da modificação da expressão genética. Os hormônios têm um importante papel trófico e integrativo na manutenção da função dos tecidos e sua deficiência tem como resultado a deterioração da função tissular (SONNTAG *et al.*, 1999). A constatação de que a alteração hormonal associada à idade e o fenótipo de envelhecimento são similares entre os indivíduos da mesma espécie reforça a importância da influência genética na regulação neuroendócrina (MARTIN *et al.*, 1980).

A teoria imunológica (WALFORD, 1969) aborda as alterações nas respostas imunológicas associadas à idade. Os humanos e roedores idosos evidenciam declínios em vários aspectos da proteção imunológica, incluindo a formação de autoanticorpos com elevada afinidade, diminuição da resposta das células T e menor resistência à infecção e à doença (CRISTOFALO *et al.*, 1994; ERNST *et al.*, 1990; MILLER, 1994; MOTA., 2003). Paralelamente, a produção de interleucina-2 (IL-2) e do ácido ribonucleico mensageiro da IL-2 (RNAm IL-2) diminui com a idade, em células T de humanos e roedores (FONG & MAKINODAN, 1989).

Finalmente, a teoria das telomerasas indica a existência de um tempo de vida finito nas células eucariotas normais, e a capacidade das células cancerosas em superá-lo pode depender dos telômeros (MARX, 1994). Essas estruturas compreendem sequências de nucleotídeos que protegem as extremidades dos cromossomos da sua degeneração e da fusão com outros cromossomos, prevenindo a instabilidade genômica (BLACKBURN, 1997; CECH, 1994; ITAHANA *et al.*, 2001; KURENOVA & MASON, 1997; MARX, 1994; MU *et al.*, 2002). Na ausência da telomerase, uma enzima que adiciona repetições sucessivas de bases de DNA telomérico aos telômeros, em cada duplicação celular, a célula perderá entre 50 e 201 pares de bases (bp) de DNA telomérico (ITAHANA *et al.*, 2001; MU *et al.*, 2002). Aparentemente, as células humanas deixam de se dividir quando o comprimento final do DNA telomérico atinge aproximadamente 4-7 bp (15 a 20 nas células germinativas), prevenindo, assim, a fusão com outros cromossomos (ITAHANA *et al.*, 2001), algo em torno de 50 divisões sucessivas. O encurtamento dos telômeros ocorre porque a maioria das células somáticas normais não sintetiza telomerase (KURENOVA & MASON, 1997).

1.1.2 Teoria Estocástica

A teoria estocástica defende que o dano celular é consequência de sucessivas lesões do ácido desoxirribonucleico (DNA), inibindo o funcionamento celular e a expressão apropriada dos genes. Essa inclui teorias como a da lesão/reparação do DNA, da oxidação dos radicais livres, do DNA mitocondrial e das radiações. As Teorias Estocásticas sugerem que a perda de funcionalidade é causada pela acumulação aleatória de lesões, associadas à ação ambiental, em moléculas vitais, que provocam um declínio fisiológico progressivo (CRISTOFALO *et al.*, 1994), *in summa*, o dano celular.

Hart e Setlow (1974) desenvolveram a “Teoria da Reparação do DNA” e, de acordo com os autores, é a velocidade de reparação do DNA que determina o tempo de vida de indivíduos de espécies diferentes e entre indivíduos da mesma espécie. Estas conclusões foram retiradas com base na constatação de diferentes velocidades de reparação de fibroblastos em cultura, expostos

à luz ultravioleta, de doadores de sete espécies de mamíferos. Diversos estudos constataram uma perda progressiva da capacidade de reparação do DNA lesado pelas radiações ionizantes, com a idade (GOUKASSIAN *et al.*, 2000; LAMBERT *et al.*, 1979; ISHIKAWA & SAKURAI, 1986), acompanhada por uma diminuição da velocidade de remoção dos produtos da lesão do DNA e dos níveis de proteína p53 com a idade (GOUKASSIAN *et al.*, 2000).

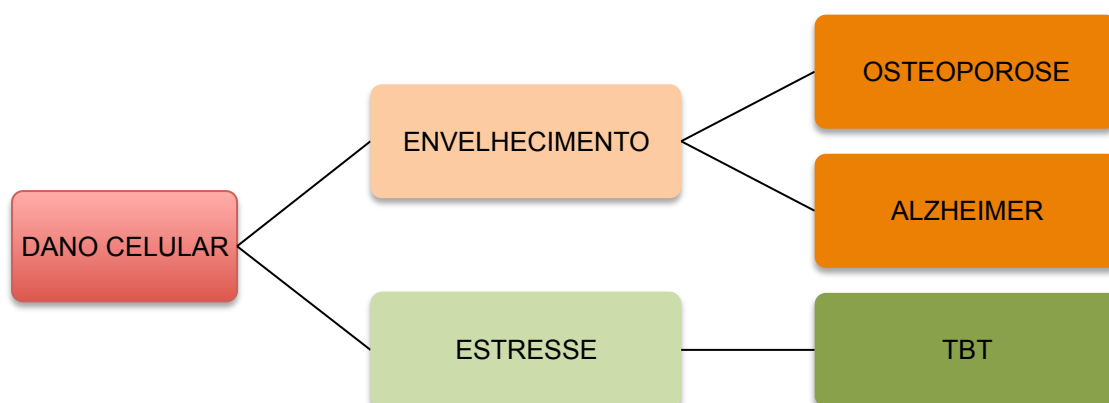
A teoria dos radicais livres, proposta em 1956 por Denham Harman, estabelece que o envelhecimento advém dos efeitos deletérios nas organelas celulares, causados pelas espécies reativas de oxigênio (BECKMAN & AMES, 1998). As espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete (O_2), os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH), são geradas fisiologicamente nos organismos aeróbios (BECKMAN & AMES, 1998). Esse processo ocorre em compartimentos intracelulares, a partir de proteínas localizadas dentro da membrana plasmática, do metabolismo lipídico no interior dos peroxissomos e da atividade enzimática do citosol como as ciclo-oxigenases (LAMBETH, 2004). Aproximadamente 90% das espécies reativas de oxigênio são produzidas por mitocôndrias em decorrência da fosforilação oxidativa. A fosforilação oxidativa utiliza a oxidação controlada de NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) e de FADH (flavina-adenina-dinucleotídeo) para a produção de energia potencial para fosforilar ADP, via F1-F0 ATPase. Os elétrons derivados do NADH ou FADH podem reagir diretamente com o oxigênio ou com outros receptores de elétrons em vários pontos da cadeia transportadora, gerando espécies reativas de oxigênio (BALABAN *et al.*, 2005).

A ação das espécies reativas de oxigênio pode ter efeitos cumulativos, causando alterações no número, na morfologia e na atividade enzimática das mitocôndrias. Em situações extremas, esses processos resultariam na perda de eficiência funcional dessas organelas e na morte celular (BALABAN *et al.*, 2005). Há sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que buscam preservar a integridade celular e neutralizar esses efeitos danosos. É provável, no entanto, que os erros na síntese de enzimas contribuam para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, levando a célula ao

desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, o que é chamado de estresse oxidativo (BECKMAN & AMES, 1998).

A teoria dos radicais livres com base no DNA mitocondrial (mtDNA), denominada teoria mitocondrial do envelhecimento, postula que os mecanismos regulatórios da produção de radicais livres vão se tornando ineficientes com o envelhecimento (JOHNSON *et al.*, 1999). O acúmulo desses superóxidos causa danos nas membranas, provocando uma disfunção mitocondrial que pode culminar em lesões teciduais e morte.

De acordo com essas teorias, o processo de dano e, conseqüentemente, de morte celular pode ser desencadeado por 2 amplos fatores: envelhecimento natural celular e estresse ambiental. Neste trabalho, ferramentas e técnicas de alta tecnologia foram utilizadas com o intuito de se avaliar os efeitos ultraestruturais de danos causados pelo envelhecimento e pelo estresse.



Infográfico 1. Esquema dos mecanismos de dano celular, que desencadeiam doenças metabólicas como osteoporose, doença de Alzheimer e estresse por TBT.

Os mecanismos biológicos atuam de uma forma coordenada e equilibrada de modo que, quando um sistema é perturbado, muitos outros também o serão. É necessário ter conhecimento desta inter-relação entre os fatores que influenciam o envelhecimento e os danos causados por estresse para que os mecanismos que envolvam a causa e a prevenção de doenças sejam devidamente elucidados.

1.2 – ENVELHECIMENTO

Uma das hipóteses originais de longevidade postula que o envelhecimento é o resultado natural da entropia nas células, tecidos e órgãos do animal – um lento e inexorável deslizamento para a não funcionalidade causada pela degradação estocástica de suas partes (MARTIN *et al.*, 1980; CRISTOFALO *et al.*, 1994; LITHGOW & KIRKWOOD, 1996).

Balcombe e Sinclair (2001) afirmam que os termos envelhecimento e senescência são usados como sinônimos porque ambos se referem às alterações progressivas que ocorrem nas células, nos tecidos e nos órgãos. O envelhecimento biológico é um processo que se inicia no nascimento e progride até a morte. O termo senescência descreve um período de mudanças relacionadas à passagem do tempo que causam efeitos deletérios no organismo. A senescência representa um fenótipo complexo da biologia que se manifesta em todos os tecidos e órgãos. Esse processo afeta a fisiologia do organismo e exerce um impacto na capacidade funcional do indivíduo ao torná-lo susceptível às doenças crônicas (AUSTAD, 2001).

A senescência celular é um processo no qual as células deixam de se dividir e sofrem alterações fenotípicas distintas, incluindo profundas alterações na cromatina, nos mecanismos de secreção e ativação do genes supressores de tumor (CAMPISI, 2013; KUILMAN *et al.*, 2010; LÓPEZ-OTIN *et al.*, 2013; ADAMS, 2009; NEWGARD & SHARPLESS, 2013). Hayflick e Moorhead (1961) introduziram pela primeira vez o termo senescência para descrever o fenômeno da parada irreversível do crescimento de cepas de células diploides humanas, após extensas passagens em série em cultura.

O fator mais importante apontado no desenvolvimento do envelhecimento celular é o genético somado a fatores não genéticos, como os ambientais e culturais, que interferem de modo aleatório no tempo de vida das células. Assim, fatores como alimentação, qualidade do ar, radiações ionizantes, exposição a produtos químicos podem interferir na funcionalidade da célula, acelerando seu envelhecimento ou a conduzindo à morte (GUARENTE, 1999; GUARENTE & KENYON, 2000; HAYFLICK, 1997).

A manutenção da qualidade proteica ou proteostase é crítica para a saúde e longevidade da célula. A proteostase assegura um suprimento de proteína de alta qualidade ao eliminar proteínas mal enoveladas e danificadas do *pool* celular e substituí-las por proteínas recém-formadas (POWERS *et al.*, 2009). As chaperonas moleculares direcionam as cadeias de aminoácidos para o enovelamento correto (HARTL & HAYER-HARTL, 2002; DOBSON, 2003; KIM *et al.*, 2013), direcionam também as proteínas deformadas para as vias de degradação (BUKAU *et al.*, 2006; HARTL *et al.*, 2011) e redobram proteínas deformadas (WICKNER *et al.*, 1999), antes de iniciarem suas funções celulares. O desequilíbrio da proteostase altera o proteoma (DAVID *et al.*, 2010; WALTHER *et al.*, 2015), que é acelerado pelo estresse (BEN-ZVI *et al.*, 2009) e sinaliza o envelhecimento do organismo em *C. Elegans*, por exemplo (BEN-ZVI *et al.*, 2009; DAVID *et al.*, 2010).

O citoesqueleto é fundamental para manter a forma e a integridade das células, sendo que sua desregulação é apontada como um forte indicador do envelhecimento celular (GOURLAY & AYSCOUGH, 2005). Em leveduras, a desagregação dos monômeros de actina aumenta o risco de formação de espécies reativas de oxigênio (GOURLAY *et al.*, 2004) e a interrupção da via Ras com a idade (HO & BRETSCHER, 2001). Em outro estudo envolvendo a morfofisiologia de eucariotos e utilizando como modelo a levedura *S. Pombe*, identificou-se que a intoxicação por metais pesados como o alumínio promove alterações drásticas no citoesqueleto, especialmente nos microtúbulos, resultando em profundos danos morfológicos, de divisão e organização celular interna e levando essas células à morte (RANGEL *et al.*, 2007). Diversos trabalhos correlacionam os danos no citoesqueleto, na estrutura e na morfologia celular como indicativo de envelhecimento (HO & BRETSCHER, 2001; GOURLAY & AYSCOUGH, 2005; RANGEL *et al.*, 2007).

1.2.1 – Osteoporose

Junto ao envelhecimento da população, a incidência de condições associada à idade aumenta, além de mais atenção e recursos são necessários para o auxílio desses transtornos na população idosa. A osteoporose é uma doença

esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e do risco de fraturas (COOPER *et al.*, 1992; SAMBROOK & COOPER., 2006; COSMAN *et al.*, 2010). A incidência de fraturas associadas à osteoporose aumenta com a idade, sendo esse um desafio devido à extensão do problema e do ônus significativo em termos de morbidade, mortalidade e custos econômicos.

Composição, estrutura, formação e manutenção do tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido altamente dinâmico, pois está em contínuo processo de formação e destruição, denominado remodelamento. O remodelamento ósseo serve a dois propósitos: reparação tecidual e manutenção das concentrações séricas de íons como cálcio (Ca^{2+}), fosfato (Pi) e magnésio (Mg^{2+}), essenciais para diferentes funções do organismo, por exemplo, a contração muscular e a sinapse (TORTORA, 2010). Além de ser essencial para manutenção das funções metabólicas do corpo, o tecido ósseo também fornece suporte e proteção a diferentes órgãos do organismo além de ser essencial para o sistema locomotor.

O tecido ósseo pode ser classificado como esponjoso ou trabecular e cortical ou compacto, com base na sua organização estrutural. A superfície de corte do tecido ósseo compacto aparece sólida e bastante homogênea, ao passo que a do tecido ósseo esponjoso tem a aparência de uma esponja (FIGURA 1). O tecido ósseo cortical e o tecido ósseo esponjoso possuem os mesmos elementos constitutivos no que diz respeito a células e matriz óssea tendo, no entanto, importantes diferenças estruturais e funcionais (TORTORA, 2010).

O osso é formado por diversos tecidos dentre os quais encontram-se o tecido ósseo propriamente dito, a cartilagem, tecidos conjuntivos densos, epitélio, tecido adiposo e tecido nervoso associado (TORTORA, 2010). O tecido ósseo propriamente dito consiste em células de duas diferentes origens embrionárias, em diferentes graus de diferenciação, imersas numa matriz intercelular mineralizada (sais de cálcio, magnésio e fósforo na forma de hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A mineralização da matriz óssea é realizada

sobre um molde de substâncias orgânicas em cuja composição encontram-se principalmente proteínas e glicoproteínas. Dentre estas proteínas, destaca-se o colágeno (WILLIANS *et al.*, 1995). Por consequência, a matriz óssea adquire propriedades biomecânicas únicas, dentre elas uma dureza característica, que propicia a execução do papel deste tecido nas funções locomotora e estrutural (ROBLING *et al.*, 2006).

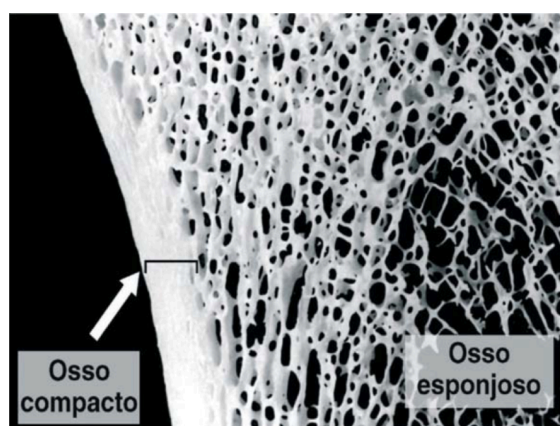


Figura 1 – Corte de tecido ósseo, identificando osso compacto e esponjoso. Fonte: Junqueira & Carneiro, 2008.

Além da matriz mineralizada abundante no tecido, o osso é composto também de células que desempenham um papel fundamental na manutenção do tecido. O tecido ósseo é formado por duas diferentes linhagens celulares: a linhagem osteoblástica, que inclui células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos; a linhagem monocítica-macrofágica, de onde derivam os osteoclastos. As células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos por um mecanismo regulador que envolve uma série de fatores de crescimento e de transcrição, presentes na camada interna do perióstio e do endóstio (revestimento da cavidade medular dos ossos longos). Os osteoblastos se diferenciam em osteócitos quando se encontram em lacunas presentes na matriz mineralizada que produziram. Os osteócitos são células plenamente diferenciadas da linhagem osteoblástica e mantêm a matriz extracelular do osso (TORTORA, 2010). As células osteoprogenitoras persistem na vida adulta e são reativas durante o reparo de fraturas ósseas e outras lesões. Os

osteoblastos, por sua vez, formam uma monocamada que recobre todos os locais ativos de formação óssea. São células altamente polarizadas que depositam matriz orgânica não mineralizada do osso. Os osteoblastos iniciam e controlam a mineralização do osso (GRAY, 1995). Portanto, as células osteoblásticas desempenham um papel fundamental na síntese de tecido ósseo.

As células precursoras de osteoclastos são monócitos que atingem o osso através da circulação sanguínea e se fusionam em células de até 30 núcleos, formando osteoclastos por um processo regulado pelos osteoblastos e pelas células do estroma da medula óssea (ABRAHAM, 2004). Após aderir a matriz óssea, os osteoclastos geram um microambiente ácido segregado e necessário para a reabsorção óssea. Primeiro há a dissolução dos componentes inorgânicos do osso (desmineralização) mediada pela enzima próton adenosina trifosfatase ($H^+ATPase$) (CHARLES & ALIPRANTIS, 2013) seguida da degradação enzimática do componente orgânico pela protease lisossomal catepsina K (CURREY, 1984) (FIGURA 2). Morfologicamente, o osteoclasto é uma célula grande (até $100\mu m$ de diâmetro) e altamente polarizada, multinucleada, ocupando uma concavidade rasa chamada lacuna de Howship ou compartimento subosteoclástico. O citoplasma do osteoclasto é rico em mitocôndrias fonte de adenosina trifosfato (ATP), subsidiando a $H^+ATPase$ na acidificação do compartimento subosteoclástico. Os osteoclastos são ativos em resposta à demanda metabólica de cálcio do osso para o sangue, em processos que envolvem hormônios como o paratormônio e a vitamina D (ESBRIT & ALCARAZ, 2014).

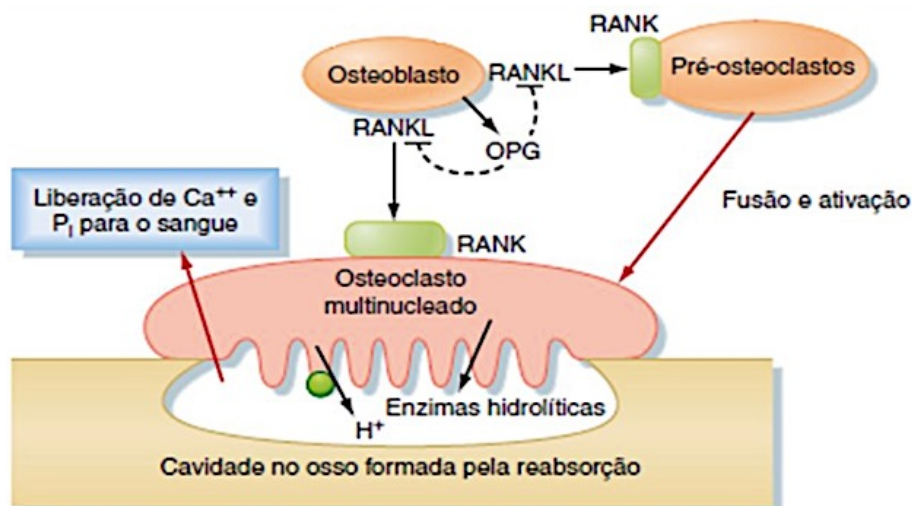


Figura 2 - Representação esquemática do processo das fases de remodelamento ósseo. Adaptado de Berne & Levy, 6ª edição, 2008.

A atividade osteoclástica também é regulada diretamente pela calcitonina (sintetizada pelas células parafoliculares, derivadas da crista neural, as células C do folículo tireóideo) e por moléculas reguladoras, tais como prostaglandinas e leucotrienos, produzidas pelos osteoblastos e células do estroma da medula óssea. Conclui-se, portanto, que o tecido ósseo interage com o sistema endócrino, tanto na manutenção de seu conteúdo mineral quanto na comunicação entre suas células. Portanto, a interação entre os osteoblastos e os osteoclastos é essencial no remodelamento e renovação óssea.

Mecanismos da remodelamento ósseo

O remodelamento ósseo é um processo altamente dinâmico que repara microfraturas e substitui o osso antigo por um tecido ósseo novo. Este processo serve a dois propósitos distintos, mas interligados - um propósito estrutural e uma finalidade homeostática do cálcio (JUNQUEIRA, 2008). O papel estrutural revisa o esqueleto para otimizar sua forma, massa e força para cargas mecânicas atualmente experimentadas, e o papel cálcio-homeostático constitui um sistema de fluxos minerais controlados por células

dentro e fora do osso que pode ser rapidamente ajustado como parte de um sistema complexo que mantém a constância de $[Ca^{2+}]$ no fluido extracelular. A conexão entre os dois está no fato de que o paratormônio (PTH), o principal responsável pelo sistema cálcio-homeostático, também estabelece o limiar de resposta para o remodelamento estrutural (ROBLING et al., 2006).

O processo normal de remodelamento ósseo consiste nas fases: ativação, reabsorção, reversão e formação da fase de repouso. Na fase de ativação do remodelamento, os osteoclastos são recrutados para a superfície do osso. Posteriormente, na fase de reabsorção, na qual os osteoclastos geram um microambiente ácido entre a célula e a superfície do osso, dissolvendo ou reabsorvendo o conteúdo mineral do osso. Na fase de reversão, os osteoclastos sofrem apoptose e os osteoblastos são recrutados para a superfície óssea. Finalmente, na fase de formação, os osteoblastos depositam colágeno, sintetizando uma nova matriz que será mineralizada para formar novo osso (COXON, 2004), (FIGURA 3).

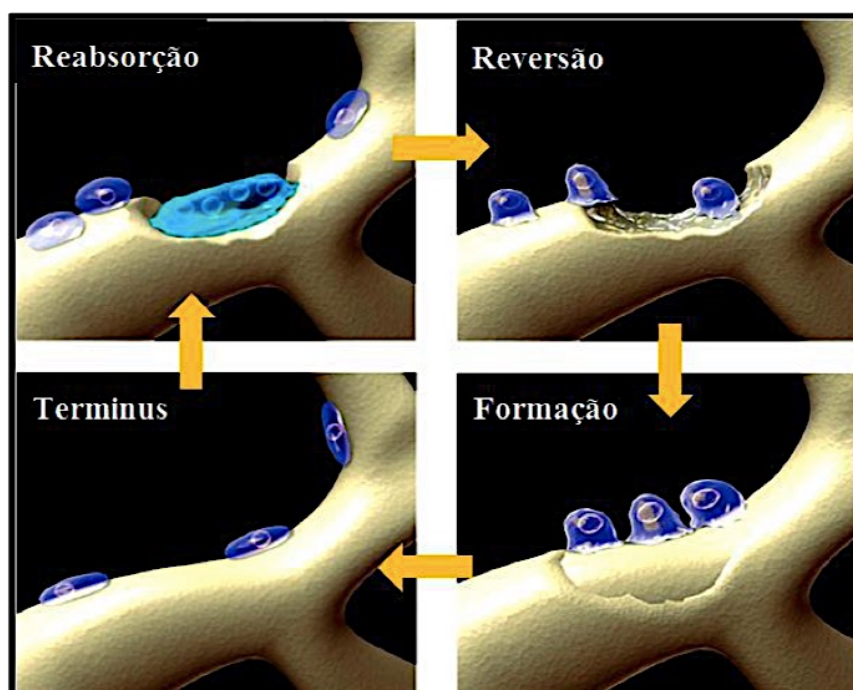


Figura 3 – Representação esquemática do processo das fases de remodelamento do osso esponjoso. Adaptado de Coxon, J.P. (2004).

Ainda que a associação e alinhamento sequencial entre os processos de reabsorção osteoclástica e formação osteoblástica sejam mecanismos finamente ajustados, o balanço final em termos de massa óssea pode variar consideravelmente. A maior parte das doenças metabólicas e inflamatórias que atinge o tecido ósseo manifesta-se geralmente por perturbações na dinâmica do remodelamento resultando, quase invariavelmente, num decréscimo da massa óssea.

Osteoporose pós-menopausa

Com o avançar da idade, a redução da massa óssea é um processo inevitável e, conseqüentemente, altera o ciclo de remodelamento ósseo, levando à fragilidade e a um aumento no risco de fraturas (ALIMANOVIC., 2010). O declínio da função ovariana na menopausa resulta em diminuição da produção de estrogênio e um aumento paralelo nos níveis do hormônio hipofisário folículo estimulante (FSH) (RIGGS *et al.*, 2002). Os efeitos combinados da privação de estrogênio e aumento da produção de FSH causam uma estimulação acentuada da reabsorção óssea e um período de rápida perda de massa óssea, sendo este um fator crucial para o início da osteoporose pós-menopausa. Vários fatores de risco estão implicados no favorecimento da perda óssea pós-menopausa. Preditores importantes não modificáveis de desmineralização óssea são: a idade, sexo, período de amenorreia e histórico familiar de fratura (LIU *et al.*, 2003; BROUSSARD & MAGNUS, 2004; SHEA *et al.*, 2007). Fatores importantes modificáveis são: a ingestão dietética de cálcio, baixo índice de massa corporal (SHEA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2003; BROUSSARD & MAGNUS, 2004), tabagismo, atividade física reduzida e alto consumo de álcool (LIU *et al.*, 2003).

O estrogênio é o principal regulador hormonal do metabolismo ósseo e esse hormônio inibe a ativação do remodelação óssea, mais provavelmente através dos osteócitos, e também inibe a reabsorção óssea, em grande parte por ações diretas nos osteoclastos, mas também pela modulação da atividade entre osteoclastos/osteócitos.

Os efeitos diretos do estrogênio nos osteoclastos incluem a indução de apoptose e a inibição da formação dos osteoclastos, reduzindo a reabsorção da massa óssea. Em particular, esse hormônio inibe a diferenciação de monócitos em osteoclástica estimulada por RANKL (MASSEY & FLANAGAN, 1999; BOYLE *et al.*, 2003), pela ligação do receptor de estrogênio ($ER\alpha$) a uma proteína de suporte, BCAR1; o complexo $ER\alpha$ / BCAR1 então sequestra o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), levando à diminuição da ativação de $NF-\kappa B$ e prejudicando a osteoclastogênese induzida por RANKL (FIGURA 2), (ROBINSON *et al.*, 2009).

Além desses efeitos diretos sobre os osteoclastos, o estrogênio também regula a atividade dos osteoclastos indiretamente. Estudos combinados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o estrogênio suprime a produção de RANKL por osteoblastos e células T e B (EGHBALI-FATOURECHI *et al.*, 2003) e também aumenta a produção do receptor de RANKL em células osteoprogenitoras (ONAL *et al.*, 2012) .

Em murinos, o estrogênio modula a produção de citocinas de reabsorção óssea, incluindo interleucinas (IL)-1, IL-6, fator- α de necrose tumoral (TNF- α), M-CSF, e prostaglandinas (MANOLAGAS & JILKA, 1995; TANAKA *et al.*, 1993; KIMBLE *et al.*, 1994; AMMANN *et al.*, 1997; KIMBLE *et al.*, 1996) Embora essas vias indiretas possam ter um papel mais importante no papel do estrogênio na diferenciação dos osteoclastos, a deficiência de estrogênio induz a diminuição da massa mineral óssea. Em relação ao papel do estrogênio nos osteoblastos, foi demonstrado que elas inibem a apoptose e aumentam o tempo de vida dessas células (BREUIL *et al.*, 2010).

O papel da APOE na densidade mineral óssea

A densidade mineral óssea é um dos principais determinantes da força óssea, agindo sob substancial regulação genética. Dentre esses fatores genéticos, a apolipoproteína pertence a uma classe das lipoproteínas cuja função é o transporte de colesterol e triglicerídios no corpo, em que a APOE

(APOE) atua como um ligante para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), bem como outros receptores de lipoproteína ricos em triglicerídios, sendo, portanto, amplamente responsável pela captação celular de lipoproteínas ricas em triglicerídios (BACHNER *et al.*, 1999; LONG *et al.*, 2004; SCHOFIS *et al.*, 2004). Em camundongos APOE mutantes, há aumento da formação óssea que tem sido atribuído a uma menor captação de lipoproteínas ricas em triglicerídeos pelos osteoblastos (KOHLMEIER *et al.*, 1998). Em humanos, três alelos comuns, compostos de substituições de aminoácidos nas posições 112 e 158, são encontrados na população e são conhecidos como E2, E3 e E4, cujas frequências são aproximadamente de 8%, 78% e 14%, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2018)

A variação no gene APOE tem sido estudada por seu potencial papel no risco de osteoporose. Alguns estudos de associação encontraram menor DMO ou maior risco de fratura em portadores do alelo E4 em comparação àqueles sem o alelo E4 (WONG *et al.*, 2005), enquanto outros não encontraram essa associação (SNNELS, 2003; PETER *et al.*, 2011). Em um recente trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa acerca do papel da APOE na densidade mineral óssea, dados coletados com uma população de 413 mulheres em pós-menopausa revelaram que tanto a isoforma E4, principalmente quando associada ao alelo E2, promove uma baixa densidade mineral óssea e um aumento no risco de fratura, ao passo que, a isoforma E3 parece estar associada a um aumento da densidade mineral óssea, agindo como um alelo protetor para o desenvolvimento da osteoporose (SOUZA *et al.*, 2018).

Embora os mecanismos moleculares envolvidos no papel da apolipoproteína da ApoE na densidade mineral óssea em humanos ainda não estejam esclarecidos, algumas hipóteses envolvem a atividade dos osteoblastos devido à participação dessas células na formação da matriz orgânica do osso (ZAJICKOVA *et al.*, 2003; LONG *et al.*, 2004).

O estrogênio tem um papel fundamental na fisiologia das mulheres. Apesar de seu papel fundamental na reprodução, há muitos relatos apontando a ação desse hormônio no metabolismo das lipoproteínas e na formação

óssea. Portanto, pesquisas envolvendo a relação entre o envelhecimento, depleção de estrogênio, osteoporose e APOE nos parecem uma linha promissora na elucidação de um dos mais importantes mecanismos causadores de doença metabólica da população idosa.

1.2.2 – Doença de Alzheimer (DA)

Segundo a OMS, estima-se que existam no mundo em torno de 50 milhões de pessoas com Doença de Alzheimer (DA) e apontam que esse número deverá triplicar nos próximos 30 anos.

A DA é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado por déficits cognitivos e funcionais gradativamente progressivos, alterações comportamentais, e está associado ao acúmulo de placas amiloides e agregados neurofibrilares da proteína tau no cérebro (VELLEMAGNE *et al.*, 2013). Os sintomas cognitivos mais comumente descritos na DA incluem déficits na memória de curto prazo, disfunção executiva e visoespacia, além de praxia embora seja o comprometimento da memória a característica mais difundida deste distúrbio.

Muitas neuropatias relacionadas à idade, incluindo a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica (ELA), estão associadas a proteínas agregadas e mal enoveladas. Defeitos conformacionais promovem a formação de agregados proteicos (POLYMERPOULOS *et al.*, 1997), que podem se expandir em placas macroscópicas (JARRETT *et al.*, 1993), levando à degeneração tecidual. Assim, a regulação adequada da produção proteica está fortemente correlacionada com o envelhecimento saudável (BALCH *et al.*, 2008).

Embora a idade seja um importante fator de risco para o desenvolvimento de DA, o envelhecimento, por si só, não é requisito suficiente para o desenvolvimento desta neuropatia. Outros fatores de risco importantes incluem a presença de um ou mais alelos do gene E4 da apolipoproteína APOE4, baixo nível educacional e ocupacional, história familiar de DA, lesões

cerebrais traumáticas moderadas ou graves e fatores de risco cardiovascular (FARRER *et al.*, 2009; MAYEUX *et al.*, 1998; VILLEMAGNE *et al.*, 2013).

A apolipoproteína E (APOE) e a Doença de Alzheimer

A APOE é uma glicoproteína polimórfica com 317 aminoácidos, sendo uma das principais proteínas existentes no plasma humano, envolvida no transporte de colesterol. Em humanos, existem três alelos principais do gene APOE, decorrentes de apenas duas alterações no DNA, chamados de E2, E3 e E4. As isoformas proteicas produzidas por esses alelos se diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e/ou 158 (WEISGRABER *et al.*, 1981; RALL *et al.*, 1982; WEISGRABER *et al.*, 1982). A APOE desempenha um papel fundamental para o catabolismo de componentes ricos em triglicerídeos no corpo humano.

A APOE é transportada para a corrente sanguínea após ser sintetizada no fígado, local onde ocorre a produção de cerca de 3/4 da APOE plasmática. O cérebro humano é o segundo local de maior produção de APOE, sendo sintetizada principalmente pelas células da glia como os astrócitos, micróglia e oligodendrócitos. Outros estudos sugerem que, pelo menos sob certas condições, os neurônios humanos podem sintetizar APOE em quantidades significantes (ROSES *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1999), possivelmente como uma parte de um programa compensatório para conter a neurodegeneração (BOSCHERT *et al.*, 1999). A APOE é a principal apolipoproteína presente no cérebro, onde executa um importante papel na matriz impedindo a formação de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares e nos locais de regeneração da membrana neuronal e na manutenção da bainha de mielina (HUANG & MALHEY, 2014; KIM *et al.*, 2015)

Estudos demonstraram que a deficiência da APOE no organismo causa inúmeras doenças envolvidas com o aumento do colesterol e de triglicerídeos na circulação, devido ao não reconhecimento dessas moléculas pelos receptores de membrana dos quilomícrons e pelas moléculas de

lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), responsáveis por sua captação no fígado, onde são metabolizados (QUARFORDT *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1992; KUIPERS *et al.*, 1997). Devido ao seu envolvimento no aumento na concentração do colesterol e de triglicerídeos na circulação é que a APOE é muito estudada em doenças cardiovasculares, apresentando uma relação direta com estenoses e infartos. Além de seu envolvimento na osteoporose e na arterosclerose, a APOE é o maior fator de risco genético, sendo o alelo E4 um fator de risco para doença de Alzheimer, ao passo que o alelo E2 é considerado um neuroprotetor.

A identificação do alelo E4 como sendo um fator determinante de DA sugere que o colesterol pode ter importância na patogênese da doença (MAHLEY & RALL, 2000; MAHLEY *et al.*, 2006; VERGHESE *et al.*, 2011) O alelo E4 está relacionado a um aumento do risco da doença e este efeito é mais pronunciado em indivíduos homozigóticos comparativamente aos heterozigóticos (VERGHESE *et al.*, 2011). Um estudo (ZERBI *et al.*, 2014) demonstrou uma maior frequência do alelo E4 em pacientes classificados como possíveis portadores de DA, quando comparados com a frequência observada em indivíduos controle. Em estudos envolvendo o papel da APOE com ratos transgênicos, pesquisadores verificaram que a APOE contribui para a deposição e formação de placas β -amilóide ($A\beta$), sendo este efeito mais acentuado na presença da isoforma apoE4 (KIM *et al.*, 2009; CASTELLNO *et al.*, 2011).

Outros estudos (KOLDAMOVA *et al.* 2014) sugerem que, além da APOE4 facilitar diretamente a entrada de $A\beta$ na célula e sua agregação, também pode aumentar a síntese de $A\beta$, através do aumento da concentração do colesterol intracelular. Após a endocitose mediada por receptor e degradação enzimática das lipoproteínas, o colesterol é libertado para as membranas celulares. As lipoproteínas com a isoforma E4 contêm mais colesterol, e o aumento nos níveis de esterol nas membranas intracelulares promove um aumento da taxa de formação de $A\beta$ e liberação desta proteína para o meio extracelular (FIGURA 4).

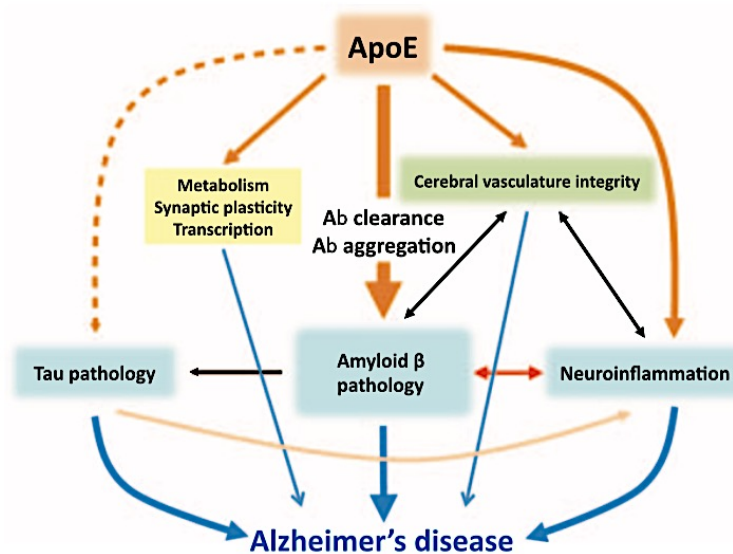


Figura 4– Mecanismo da atuação da apoe no cérebro. *Fonte: Adaptado de Liao et al., 2017.*

O papel do citoesqueleto na Doença de Alzheimer

A proteína ligadora dos monômeros actina SM22 (PRINJHA et al., 1994) foi identificada como um biomarcador do envelhecimento em vários organismos, incluindo levedura, *Drosophila* e humanos (PRINJHA et al., 1994; CAMORETTI-MERCADO et al., 1998). Em helmintos, a perda de pat-10 / troponina leva ao colapso do citoesqueleto, enquanto a superexpressão leva a maior estabilidade do citoesqueleto e resistência ao estresse (BAIRD et al., 2014).

Danos no citoesqueleto podem causar doenças neurais degenerativas características do envelhecimento. A apolipoproteína E4 (apoE4) é um indicador de risco para o início precoce da doença de Alzheimer em humanos (SANDO et al., 2008). A ApoE4 é degradada em neurônios, formando fragmentos tóxicos que interagem com o citoesqueleto de actina (MAHLEY et al., 2006), assegurando o envelhecimento celular, o estresse oxidativo (AKSENOV et al., 2001) e, eventualmente, desencadeando declínio e apoptose. A hiperfosforilação da proteína tau associada aos microtúbulos leva à formação de emaranhados neurofibrilares (NFT) (BRAAK & BRAAK,

1991), que é outra característica da doença de Alzheimer, e inibe a atividade proteossômica adequada (KELLER *et al.*, 2000), permitindo a formação desordenada de emaranhados neurofibrilares (KECK *et al.*, 2003).

A hipótese da proteína tau e dos NFT sugere que, na doença de Alzheimer, a função normal da proteína tau de estabilizar os microtúbulos neuronais é prejudicada; mais ainda, esses microtúbulos de neurônios doentes são gradualmente substituídos por NFT (KOLDAMOVA *et al.*, 2014). As características histopatológicas presentes no parênquima cerebral de pacientes portadores da doença de Alzheimer incluem depósitos fibrilares amiloidais localizados nas paredes dos vasos sanguíneos, associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau e consequente formação NFT, perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação (KOLDAMOVA *et al.*, 2014).

Outros estudos indicaram que o colesterol foi capaz de regular o processo proteolítico da proteína pré-amiloide (APP), favorecendo a formação da substância A β , ao passo que uma redução dos níveis plasmáticos do colesterol foi capaz de reduzir a formação amiloidal (LIAO *et al.*, 2017)

Segundo DiLoreto e Murphy (2015), a saúde celular é controlada por diversos aspectos biológicos celulares, dentre esses a manutenção da integridade do citoesqueleto e a regulação na correta manutenção da matriz extracelular. Dessa forma, alterações na forma celular e na composição da matriz seriam sinais de profundos danos celulares.

Plano de Ação Global para as Demências

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde aprovou, em Genebra – Suíça, o Plano de Ação Global para as Demências 2017–2025, adotado por 194 países, incluindo o Brasil, ressaltando a necessidade urgente de respostas por parte da saúde pública em relação ao cuidado e apoio às pessoas com demência. Dados revelam que mais da metade dos indivíduos com demência

residem nos países de baixo e médio rendimentos. O referido Plano possui sete áreas de atuação: Demência como uma prioridade de Saúde Pública; Conscientização para a Demência e criação de sociedades amigas das pessoas com demência; Redução de Risco de Demência; Diagnóstico, Tratamento e Apoio nas Demências; Apoio aos cuidadores de pessoas com Demência; Disponibilização de informação sobre Demências; Investigação e Inovação nas Demências.

O presente trabalho traz consigo uma contribuição para o Plano de Ação Global para as Demências, uma vez que nossos estudos fazem o uso de ferramentas para auxiliarem na compreensão das causas e consequências do desenvolvimento de doenças como o Alzheimer. Entender os processos morfofisiológicos envolvidos no controle da saúde da célula levará a uma maior compreensão do envelhecimento, o que pode nos permitir tratar e prevenir doenças neurodegenerativas senis, como Alzheimer, melhorando a qualidade de vida da população futura.

1.3 – ESTRESSE

A maioria dos organismos está exposta a agentes estressores ambientais em vários momentos da vida, porém as reações do organismo humano às mudanças do ambiente interno ou externo, denominadas como resposta ao estresse, têm estado no centro do interesse das pesquisas nas últimas décadas. Várias teorias foram elaboradas para descrever os mecanismos reguladores que mantêm a estabilidade das funções fisiológicas vitais sob condições de ameaça (YARIBEYGI *et al.*, 2017).

A resposta ao estresse é uma resposta metabólica evolutivamente conservada que protege as células de danos. É desencadeada por agentes químicos, físicos ou biológicos que excedem a capacidade celular de manter homeostase, desencadeando injúria ou a morte celular (SORLETE *et al.*, 2009). Dentre as ameaças por agentes biológicos comuns encontram-se os vírus, bactérias, fungos e parasitas. As ameaças físicas incluem temperatura,

pH, radiação ultravioleta (UV) ou, ainda, a ionizante. Os agentes químicos causadores de estresse celular incluem os metais pesados e traços como chumbo, mercúrio, cádmio, alumínio, arsênico e níquel, certos produtos químicos aromáticos eletrofilicos como o plastificante bisfenol A, os retardadores de chama químicos como os éteres difenílicos bromados (BDEs) e certos pesticidas halogenados como o cloro - pirifos e DDT, além de compostos organometálicos como o tributilestanho (TBT) (MYERS, 1994; MANAHAN, 1991).

1.3.1 –Tributilestanho (TBT)

O metabolismo normal depende criticamente da presença de um grande número de metais como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{4+} , Se^{2+} e Co^{2+} que interagem com nucleotídeos e outros metabólitos, e com proteínas para estabilizar a estrutura e criar centros de reação organometálicos. Porém muitos outros metais como Pb, Hg, As, Ni, Al, Cd, Cr e, finalmente, Sn são tóxicos (CHAPMAN *et al.*, 1968; FENT, 1996; MALINS & OSTRANDER, 1994).

Segundo Wayne (1995), uma vez que o elemento tóxico é biodisponível, talvez por metilação aos microrganismos, estes apresentam enzimas no seu metabolismo capazes de transformar tais compostos em formas moleculares solúveis em água, na tentativa de favorecer uma fácil excreção. De acordo com o mesmo autor, o sistema Citocromo P-450 (complexo multienzimático) é um sistema oxidativo de funções mistas localizado principalmente na membrana do retículo endoplasmático liso. Este sistema contém importantes enzimas envolvidas em duas fases, onde a Fase I é oxidativa e a Fase II é de conjugação com radicais como Glutathiona e Sulfatos. O organoestanho junto com o cádmio e outros elementos químicos fazem parte do grupo de inibidores de determinados mecanismos dominantes deste *pool* enzimático (MALINS, 1994), reduzindo a atividade bioprotetora desse complexo.

A denominação organometálico se dá pelo poder de associação covalente do metal com o átomo de carbono, o que lhe confere a propriedade de solubilidade em solventes apolares (NORMAN, 1978). Dentre os compostos classificados como organoestanhos, o tributilestano (TBT) é descrito na literatura como capaz de induzir múltiplos efeitos tóxicos em células eucarióticas animais, incluindo sua função de dano metabólico por desregular as funções endócrinas (LUDGATE, 1987;). O TBT é um composto polar, hidrofóbico, e lipofílico. Os compostos organoestânicos (OEs) têm como fórmula geral R_nSnX_{4-n} , em que R é um grupo alquila, X uma espécie aniônica (carga negativa), como o cloro (Cl) ou outro grupo funcional, e n varia entre 1 e 4. O número de ligações carbono-estanho (C-Sn) caracteriza as propriedades dos OEs (FELIZZOLA, 2005)

O interesse voltado para o estudo do estanho deve-se também à sua representatividade frente aos outros metais, uma vez que apresenta o maior número dentre os organometálicos utilizados comercialmente, cuja produção global alcança a ordem de 40.000 toneladas por ano (STANLEY, 1991). A necessidade humana frente aos organoestanhos se dá pela sociedade moderna, a qual depende de muitos dos materiais artificiais contendo tais substâncias como tintas de cascos de embarcações com a finalidade de impedir a adesão de algas, mexilhões e outros organismos (FELIZZOLA, 2005). Produtos industriais como plásticos, biocidas no combate a macro e micro organismos, entre outros (LUDGATE *et al.*, 1987; HOCH, 2001) também utilizam o TBT como principal composto.

Efeito do TBT em Sistemas Biológicos

Os efeitos tóxicos e o impacto do uso indiscriminado do TBT foram inicialmente observados nas ostras (*Crasostrea gigas*) que eram comercializadas na França (GODOI *et al.*, 2003). Estudos realizados verificaram que a população dessas ostras teve decréscimo significativo além de apresentar uma má formação na estrutura das conchas (HUGGETT *et al.*, 1992; CLARK *et al.*, 2000).

A bioacumulação do TBT ao longo da cadeia trófica pode causar danos à saúde humana, já que o homem pode se contaminar pela ingestão de peixes e mariscos. Segundo Castro e colaboradores (2007), a exposição a compostos orgânicos de estanho pode gerar ocorrência de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos. Esse mesmo processo de modificação do aparelho reprodutor em moluscos foi descrito em outros trabalhos (CRISTALE *et al*, 2009). Essa alteração anatomofisiológica tem sido empregada como bioindicador de baixo custo para esse tipo de poluição, pois possui atributos mensuráveis. A família *Muricidae* é provavelmente o táxon de molusco mais utilizado como bioindicador de contaminação por compostos organoestânicos em todo o mundo.

Existem estágios de desenvolvimento sensíveis ao TBT em uma série de organismos aquáticos, especialmente em certas espécies de moluscos, algas e zooplânctons que possuem habilidade limitada para metabolizá-lo. Esse envenenamento do sistema biológico pode originar mutações nas espécies afetadas, condenando-as à extinção (GODOI, FAVORETO & SANTIAGO-SILVA, 2003). Logo, a biotransferência desses compostos a outros níveis tróficos da cadeia alimentar informa o risco ambiental potencial relacionado à presença desse composto no ambiente (FENT, 1996).

O comprometimento com a homeostase dos indivíduos expostos a este tóxico pode começar ainda no desenvolvimento embrionário. O estudo da intoxicação por TBT em peixes (*Phoxinus phoxinus*) revelou que essa espécie apresentou altos índices de mortalidade, deformação na coluna vertebral, paralisia e olhos opacos quando expostos por 3 a 10 dias de TBT (MEIER, 1992). Uma vez no sistema biótico, o TBT pode vir a ser degradado por enzimas presente no metabolismo natural dos organismos e, assim, perpassar por todos os níveis tróficos da cadeia alimentar de maneira acumulativa. FENT (1996) descreve que os peixes carnívoros, encontrados no topo das cadeias tróficas do ecossistema marinho, são os que irão apresentar maior nível de concentração do xenobionte devido ao processo de bioacumulação e biomagnificação, podendo ser mais afetados e funcionarem como veículo para contaminação humana.

Uma vez absorvidos, as concentrações endógenas de TBT no organismo variam consideravelmente uma vez que depende de fatores como tempo e forma de exposição e da concentração. Recentes estudos acerca dos mecanismos de toxicidade de organoestânicos, como o tributilestanho (TBT) em mamíferos, indicam que TBT é um potente inibidor da ATP sintase mitocondrial sugerindo que o TBT se liga diretamente à ATP sintase, comprometendo a atividade mitocondrial e o funcionamento da célula como um todo (VON BALMOOS *et al.*, 2004). Outros trabalhos envolvendo os efeitos do TBT em modelos animais revelaram que o composto age desregulando gravemente os equilíbrio hormonal (DELGADO FILHO *et al.*, 2010; DELGADO FILHO *et al.*, 2011; PODRATZ *et al.*, 2015). O efeito tóxico no sistema endócrino, inclui a desregulação dos hormônios sexuais. Em machos, a toxicidade parece afetar negativamente a produção de células germinativas e a motilidade dos gametas, além de promover uma diminuição no tamanho dos testículos e epidídimo (CHEN *et al.*, 2018; MITRA, *et al.*, 2017). Em fêmeas, o TBT age induzindo a puberdade precoce, reduzindo a fertilidade, além de ser capaz de atravessar a barreira placentária e se acumular na placenta e nos tecidos fetais (SENA *et al.*, 2017; PODRATZ *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2014). O TBT, portanto, é um importante agente desregulador dos hormônios sexuais.

No sentido de tentar compreender melhor o comportamento do TBT nos diferentes extratos, e com isso caracterizar o seu potencial tóxico para as espécies aquáticas, muitos cientistas utilizaram o TBT como foco principal de suas pesquisas nas últimas duas décadas (GODOI *et al.*, 2003; SENA *et al.*, 2017; SANTOS-SILVA *et al.*, 2016) No entanto, os dados sobre a permanência do tributilestanho (TBT) em ambiente aquático, disponíveis na literatura ainda não são suficientes. De acordo com Fent (1996), o TBT apresenta uma resistência à degradação de 7 a 30 dias na água com temperaturas de verão para padrões nórdicos. Porém, para temperaturas de inverno, a degradação pode levar de 2 meses ou mais. Informações quanto à presença e ao comportamento deste composto para climas tropicais são poucas ou inexistentes ainda.

A utilização indiscriminada do TBT foi regulamentada em vários países ao longo das duas últimas décadas, porém a ineficácia das medidas introduzidas levou à proibição da aplicação de tintas com TBT em todo tipo de embarcações, tendo que ser removidas ou seladas dos cascos das embarcações até janeiro de 2008 (IMO, 1999). Enquanto no exterior o TBT sofre restrições há 20 anos, no Brasil ainda não existe controle sobre esse composto nas embarcações. O país pretende seguir as recomendações da Organização Marítima Internacional (IMO) para banir o uso dessas substâncias; mas o acordo, que deveria ter entrado em vigor em 2003, só passará a ter validade quando for ratificado por 25 países (FERNANDEZ, 2001).

Segundo Manaham (1991), o comportamento cinético de uma substância química tóxica ao organismo pode seguir as seguintes vias: ser absorvido pelo organismo e eliminado através de diferentes tipos de mecanismos; ser excretado sem qualquer alteração na sua estrutura molecular; ou ainda, ser metabolizado e se tornar apto para ser um ativo componente químico na fase dinâmica. Na fase dinâmica, o composto ou elemento tóxico pode interagir com células e tecidos ou órgãos do organismo, o que pode lhe conferir algumas respostas tóxicas. Estas respostas podem ser uma reação primária, uma resposta bioquímica ou, ainda, os chamados efeitos observáveis, sendo estes últimos considerados como representativos do máximo efeito de uma substância tóxica.

Dentre os efeitos observáveis, o estudo ultraestrutural revela-se um importante meio de avaliação de alterações promovidas pela intoxicação por TBT no metabolismo.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a ultraestrutura de doenças metabólicas, como a Osteoporose, a Doença de Alzheimer e a por estresse de Tributilestanho (TBT).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM MODELOS DE OSTEOPOROSE E ALZHEIMER

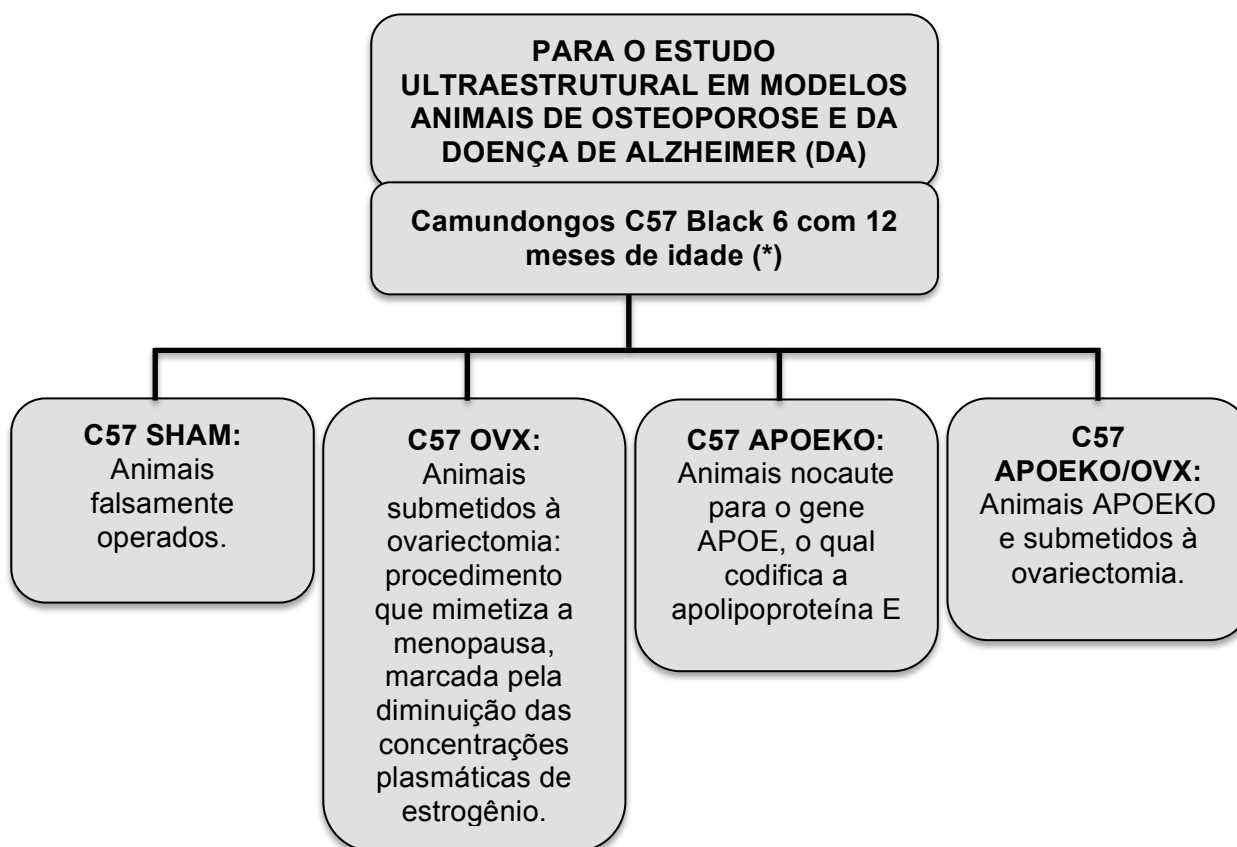
- Investigar as alterações na ultraestrutura óssea;
- Identificar as alterações na densidade mineral óssea;
- Avaliar as alterações nas ultraestruturas neuronais;
- Analisar o acúmulo de lipídios no cérebro e fígado;
- Investigar a presença de placas amiloides no fígado, rim e fêmur;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM MODELOS DE INTOXICACAO POR TBT

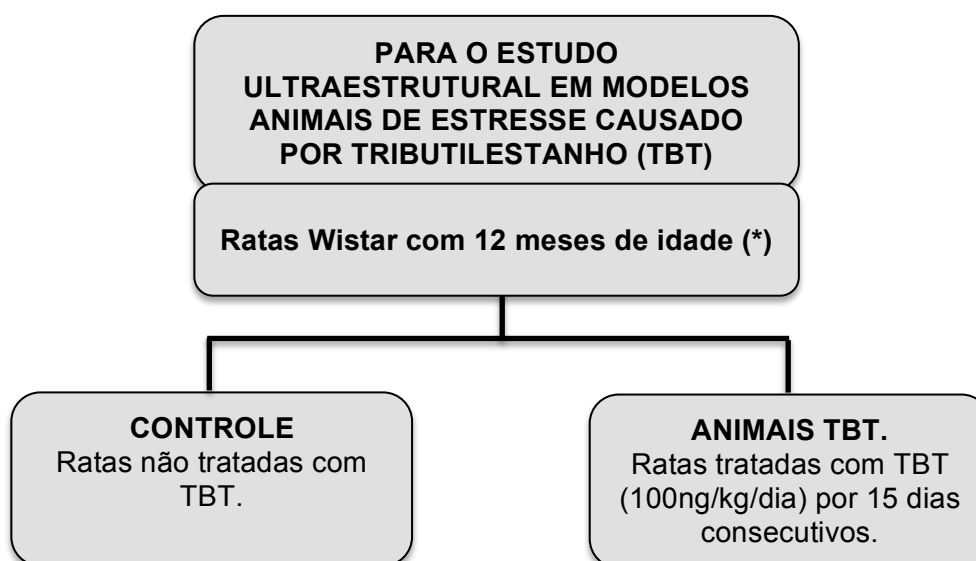
- Identificar alterações provocadas pela intoxicação por TBT na ultraestrutura óssea;
- Identificar alterações provocadas pela intoxicação por TBT na densidade mineral óssea;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

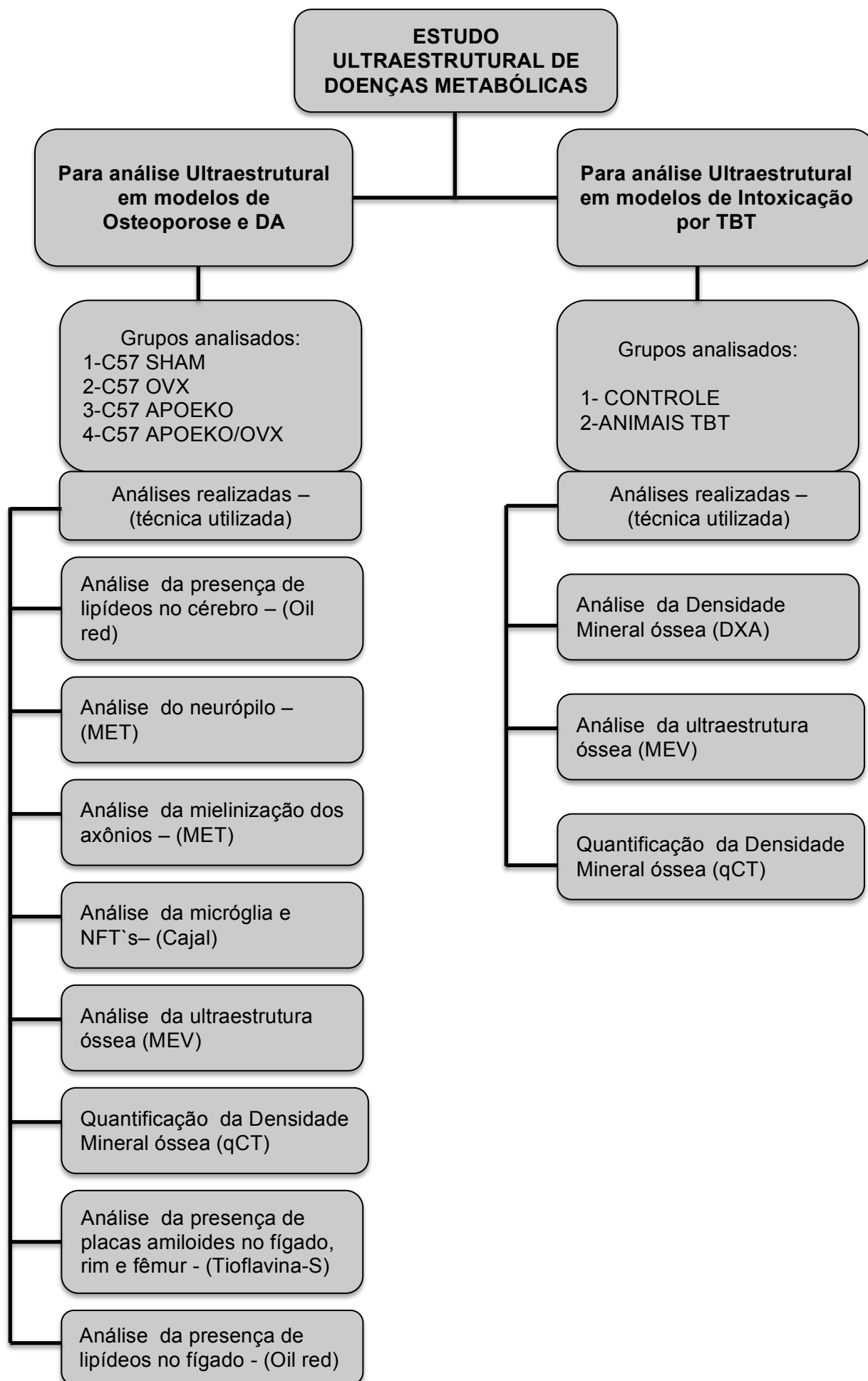
3.1 ORGANOGRAMA METODOLÓGICO



(*) Os animais de todos os grupos foram submetidos às mesmas condições de temperatura, alimentação e luminosidade



(*) Os animais de todos os grupos foram submetidos às mesmas condições de temperatura, alimentação e luminosidade.



3.1.1 *Estratégia metodológica*

Tendo como objetivo principal uma melhor compreensão do delineamento do estudo acerca da utilização de ferramentas para o estudo ultraestrutural de doenças metabólicas, como estratégia metodológica, então, dividiremos o trabalho em duas seções: 3.2 Seção I: análise ultraestrutural em modelos de osteoporose e doença de Alzheimer e 3.3 Seção II: análise ultraestrutural em modelos de estresse por TBT.

3.2. SEÇÃO I: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE OSTEOPOROSE E DOENÇA DE ALZHEIMER

3.2.1 *Animais utilizados*

Para o estudo ultraestrutural das doenças metabólicas de originadas pelo envelhecimento Alzheimer e Osteoporose foram utilizados camundongos fêmeas C57 Black 6 (*Mus musculus*) ovariectomizadas (OVX) como modelo para osteoporose pós-menopausa, visando a estudar fenômenos associados à ultraestrutura do tecido ósseo em condições que possam ser de grande importância para o tratamento da doença. Além disso, para o estudo ultraestrutural da doença de Alzheimer foram utilizados animais mutantes APOEKO. Os animais foram mantidos por doze meses de vida, em gaiolas com temperatura controlada entre 23° e 25° C e alimentados com ração e água/água, mantidos em ciclo claro/escuro de 12h/12h. Os animais foram então eutanasiados, sendo que órgãos e fluidos foram devidamente estocados para posterior análise. Todos experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Pesquisa Biomédica para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório disponíveis on-line e seguiram as recomendações das Diretrizes da Associação Americana de Medicina Veterinária (2007). O uso dos modelos animais nesta pesquisa, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais (CEUA), desta instituição (página 116).

Foram então utilizados quatro grupos, a saber: C57 SHAM operado (selvagem ou *wild type* (WT) ou controle; C57 ovariectomizado (OVX); APOEKO SHAM, animais nocaute submetidos à falsa ovariectomia (APOE SHAM) e APOEKO ovariectomizado (APOE OVX).

3.2.2 Análise da ultraestrutura do cérebro

Para analisar e avaliar os danos ultraestruturais causados pela deficiência de estrogênio e da APOE, no cérebro dos quatro grupos, utilizamos como ferramenta a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Os cérebros desses animais foram lavados três vezes 2% de tampão PIPES (ácido 1,4-pípeazinadietanosulfônico, pH 7,4). Posteriormente, os cérebros foram seccionados na região de interesse (FIGURA 5). Os órgãos foram incubados em uma solução fixadora contendo 1% de PIPES, 2% de glutaraldeído (GA) e 2% de paraformaldeído (PA) por 2 horas em temperatura ambiente. Após essa etapa, os órgãos foram lavados novamente com tampão PIPES e pós-fixadas com uma solução contendo 1% de OsO₄ e 1% tampão PIPES, seguida de uma nova lavagem com tampão PIPES por 30 minutos. Após esse período, as células foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90, 100%), seguida da inclusão gradual de EPON® (resina epóxi), diluída em etanol, nas seguintes proporções: 3:1, 2:1 (por 6 horas), 1:1 (por 12 horas), 1:2, 1:2 (por 6 horas), 1:3 (por 12 horas) e, finalmente, EPON® puro por 24 horas. O EPON® foi trocado mais uma vez e o material foi submetido à polimerização a 60°C por 48 horas. Os blocos de resina contendo as amostras foram então seccionados com faca de diamante numa espessura de aproximadamente 70 nm. Os cortes foram dispensos sobre uma grade de níquel (300 *mesh*) e contrastados primeiramente com uma solução de acetato de uranila (5%, diluída em H₂O), por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram contrastados com uma solução de citrato de chumbo (composta de 4% de nitrato de chumbo e 3% de citrato de sódio), por 5 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram visualizadas no microscópio Zeiss 900 a 80 kV.

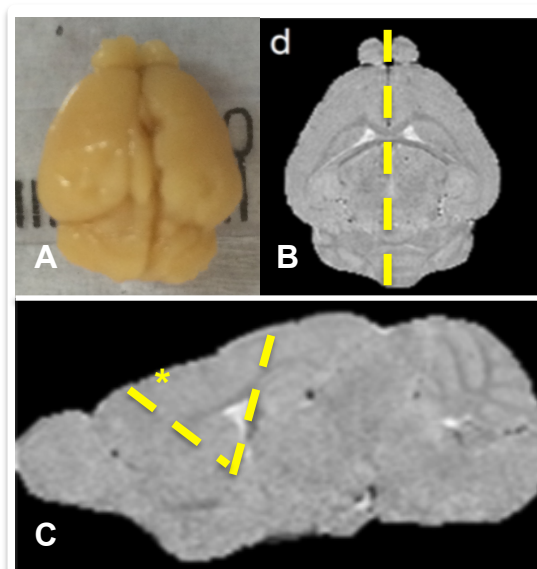


Figura 5 – Esquema demonstrativo da secção cerebral utilizada para microscopia. A- Cérebro de animal C57 desse estudo; B – Corte Sagital; C- *região seccionada. Fonte: B e C imagens adaptadas Totenhagen et al., 2017.

3.2.3. Análise da morfologia da coluna vertebral

Para analisar a morfoestrutura óssea da coluna vertebral de todos os animais, utilizamos como ferramenta a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Os ossos foram limpos mecanicamente, com o uso de água destilada e retirada de tecidos adjacentes de forma manual, sem o uso de qualquer agente corrosivo para não danificar a ultraestrutura óssea. As colunas vertebrais foram lavadas com PBS (0,9% NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) cinco vezes, com o objetivo de promover a retirada de proteínas existentes, além de manter o pH estável, a fim de evitar artefatos e também manter a osmolaridade do material. Após a lavagem, os ossos foram submetidos à fixação. A fixação foi feita com 2% glutaraldeído (GA) e 2% paraformaldeído (PA) em tampão PIPES (ácido 1,4-pipeazinadietanosulfônico, pH 7,4), por 24h. Após essa etapa, foi iniciado o processo de desidratação, em série com etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes 100%, por 40 minutos), seguido pelo

Ponto Crítico (Bal-Tec CPD 030), no qual etanol foi substituído gradativamente por CO₂ líquido. O ponto crítico acontece no momento em que a interface entre CO₂ líquido/gasoso não existe, pois a quantidade de moléculas líquidas que se tornam gás é exatamente igual à quantidade de moléculas de gás que se tornam líquidas. A temperatura foi então elevada e todo o líquido se tornou gás, deixando a amostra totalmente seca. As amostras foram fixadas, com o auxílio da fita de carbono e tinta de prata sobre o suporte, que estará em contato direto com o porta-amostras do microscópio.

O material foi metalizado no aparelho Bal-Tec FCD 050, sob uma atmosfera de argônio e foi coberto com platina (Pt), o uso da platina foi uma opção em detrimento da cobertura com ouro (Au), utilizado como técnica de rotina, em função da platina ter uma melhor e maior interatividade com os elétrons liberados pelo filamento de tungstênio no momento da visualização no microscópio. As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL 1400 PLUS) à 25 KV.

3.2.4 Tomografia computadorizada quantitativa (qCT)

A tomografia computadorizada da coluna vertebral dos animais utilizados neste trabalho foi realizada na Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, UENF. As amostras foram posicionadas no tomógrafo modelo 2290468 GE Healthcare® em decúbito esternal para realização do procedimento; as imagens tomográficas obtidas foram reconstruídas através do software OsiriX, lite versão 2.0. Como referência para a densidade mineral óssea, foi utilizado um padrão (*phantom*) de hidroxapatita e água, para calibração de valores de atenuação.

3.2.5 Identificação de placas amiloides

Para identificar a presença de placas amiloides foi utilizado o protocolo Tioflavina S (GUNTERN et al., 1992). Este corante é bastante utilizado para a visualização e quantificação de agregados amiloides de proteínas, tanto *in vitro* como *in vivo* (e.g. placas β -amiloides e agregados da proteína *tau*, associados à doença de Alzheimer). Quando se liga às estruturas ricas em folhas β , a Tioflavina S apresenta um aumento da sua fluorescência e um *red shift* característico no seu espectro de emissão. Adicionalmente, a alteração da fluorescência deste composto já foi associada com interações com DNA de cadeia dupla. Assim, as placas senis e os emaranhados neurofibrilares ficam fluorescentes, com background preto. Foram utilizados para essa análise fígado, rim e fêmur dos animais selecionados, de forma a avaliarmos a presença de placas senis nesses órgãos. Antes de iniciar o processamento das amostras, os fêmures dos animais foram colocados em uma solução 1M de EDTA, 4°C, por 3 semanas, trocando a solução 3 vezes. O EDTA que atua como um quelante de Ca^{2+} desmineralizando o osso, mantendo intacta a matriz orgânica. Posteriormente, os fêmures foram retirados da solução fixadora; a partir desta etapa todos os órgãos foram processados seguindo o mesmo protocolo. As amostras foram lavadas em água deionizada por 30 minutos; desidratadas em série crescente com etanol (70%, 90% e 3 vezes 100%, por 1 hora) diafanizadas com Xilol durante 30 minutos (3x); banhadas em parafina a 56°C por 30 minutos (3x) e incluídas em blocos de parafina. Esses foram cortados em seções de 10 μm de espessura utilizando micrótomo. As seções obtidas foram montadas em lâminas previamente tratadas com solução de gelatina 1% e permaneceram durante 24 horas em estufa a 56°C. Os cortes foram desparafinados utilizando Xilol por 2 minutos (2x); álcool absoluto por 1 minuto (2x); álcool 95% por 1 minuto (2x); álcool 70% por 1 minuto (2x) e hidratados com água deionizada em 3 etapas por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de Permanganato de Potássio 0,25% por 20 minutos; lavadas com água deionizada por 1 minuto; submetidas à solução Bleaching (Branqueamento) por 2 minutos; enxaguadas com água deionizada por 1 minuto; mergulhadas na solução Blocking (Bloqueio) por 20 minutos; enxaguadas com água

deionizada por 1 minuto; imersas em solução de Ácido acético 0,25% por 5 segundos e enxaguadas novamente com água deionizada por 5 minutos. Após a completa secagem das lâminas as seções foram imersas em solução de Tioflavina S (0,0125% de Tioflavina S em q.s.p. 100,0 mL de Etanol 50%) por 5 minutos; secas a temperatura ambiente; lavadas 2X com solução de etanol 50%; enxaguadas com água deionizada 2X por 1 minuto e montadas com lamínula empregando-se geléia de glicerina (16% de gelatina; 53% de glicerina; q.s.p. 100,0 mL água deionizada) como agente selante. A solução *Bleaching* foi preparada adicionando-se 1,0g de Metabissulfito de Potássio e 1,0g de Ácido Oxálico em q.s.p. 100,0 mL de água deionizada. Para o preparo da solução *Blocking* foram utilizados 1,0 g de Hidróxido de sódio e 3,0 mL de Peróxido de Hidrogênio 30% em q.s.p. 100,0 mL de água deionizada. As soluções *Bleaching* e *Blocking* foram descartadas sempre após a passagem de cada lâmina sendo substituídas por solução nova.

3.2.6 *Identificação de agregados neurofibrilares e microglia ativada*

Para identificar agregados neurofibrilares e a ativação microglial foi utilizado o protocolo Cajal (BEHMER et al., 2003), que consiste em uma técnica em que os sais de prata que se ligam às estruturas nervosas são reduzidos pela ação de um único agente oxidante com o intuito de se visualizar a prata metálica. Os hemisférios cerebrais foram fixados embebidos em solução fixadora tamponada (PBS/Formalina 4%) a 4°C (LITCHFIELD & NAGY, 2001) para posterior processamento. Após a retirada de um dos hemisférios da solução fixadora, o tecido cerebral foi tratado com 1,5% de Nitrato de Prata (AgNO_3) a 37°C no escuro, por 05 dias, até que o tecido desenvolvesse uma cor marrom escuro. O excesso de AgNO_3 do tecido foi lavado com H_2O deionizada por 02 horas. Para a redução química da prata metálica e posterior visualização dos constituintes celulares do tecido estudado, utilizou-se hidroquinona a 2% em Formalina neutra 5% por 24 horas. Posteriormente, o tecido foi desidratado em série crescente com etanol (70%, 90% e 3 vezes 100%, por 1 hora). Em seguida, os hemisférios permaneceram durante 30 minutos (3x) em Xilol, foram banhados em parafina a 56°C por 30 minutos (3x) e incluídos em bloco

de parafina. Subsequentemente, os blocos foram cortados em micrótomo obtendo-se seções de 10 µm de espessura. As seções obtidas foram montadas em lâminas previamente impregnadas com solução de gelatina 1% e acondicionadas a 56°C overnight para secagem. Em seguida as lâminas foram desparafinizadas utilizando Xilol por 2 minutos (2x); álcool absoluto por 1 minuto (2x); álcool 95% por 1 minuto (2x); álcool 70% por 1 minuto (2x) e hidratadas com água deionizada em 3 etapas por 2 minutos sendo seladas com lamínula e resina sintética média – Bálsamo do Canadá.

3.2.7 Análise do acúmulo de lipídios

Para identificar possíveis acúmulos de lipídios no fígado, rim e fêmur foi utilizada como protocolo a marcação por *Oil Red*. A coloração *oil red* marca de cor vermelho-alaranjado os acúmulos lipídicos, o que identifica a diferenciação adipogênica (PROPHET, 1994). Foram utilizados para essa análise fígado, rim e fêmur dos animais selecionados, de forma a avaliarmos a presença de placas senis nesses órgãos. Antes de iniciar o processamento das amostras, os fêmures dos animais foram colocados em uma solução 1M de EDTA, 4°C, por 3 semanas, trocando a solução 3 vezes. O EDTA que atua como um quelante de Ca^{2+} desmineralizando o osso, mantendo intacta a matriz orgânica. Posteriormente, os fêmures foram retirados da solução fixadora; a partir desta etapa, todos os órgãos foram processados seguindo o mesmo protocolo. As amostras foram lavadas em água deionizada por 30 minutos; desidratadas em série crescente com etanol (70%, 90% e 3 vezes 100%, por 1 hora) diafanizadas com Xilol durante 30 minutos (3x); banhadas em parafina a 56°C por 30 minutos (3x) e incluídas em blocos de parafina. Estes foram cortados em seções de 10 µm de espessura utilizando micrótomo. As seções obtidas foram montadas em lâminas previamente tratadas com solução de gelatina 1% e permaneceram durante 24 horas em estufa a 56°C. Os cortes foram desparafinados utilizando Xilol por 2 minutos (2x); álcool absoluto por 1 minuto (2x); álcool 95% por 1 minuto (2x); álcool 70% por 1 minuto (2x) e hidratados com água deionizada em 3 etapas por 2 minutos. A lâmina foi coberta com solução de *oil red O* (Merck, Darmstadt,

Alemanha) 0,5% diluída em propileno glicol (*Synth*, Diadema, São Paulo, Brasil) e aguardados dois minutos. Logo após, foi lavada em solução de propileno glicol 85% por um minuto, lavada duas vezes em água, corada rapidamente na hematoxilina de *Mayer's* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e lavada novamente em água. A lâmina foi deixada à temperatura ambiente para secagem e quando seca foi realizada a montagem, pingando-se uma gota de glicerina (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e coberta por lamínula (*Perfecta*, Mooca, São Paulo, Brasil).

A avaliação qualiquantitativa foi realizada por 2 avaliadores experientes independentes, havendo concordância entre os mesmos quanto aos resultados observados. Todas as imagens foram analisadas quantitativamente utilizando o programa Image J[®], versão 1.51S (Wayne Rasband National Institute of Healths, USA).

3.3 SEÇÃO II: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE ESTRESSE POR TBT

3.3.1 *Animais utilizados*

Para o estudo ultraestrutural das doenças metabólicas originadas pelo estresse de tributilestanho (TBT), ratos Wistar fêmeas adultas (12 meses de idade) foram mantidas sob temperatura controlada entre 23° e 25° C e alimentados com ração e água/água, com um ciclo claro/escuro de 12/12h.

Todos experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Pesquisa Biomédica para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório disponíveis on-line e seguiram as recomendações das Diretrizes da Associação Americana de Medicina Veterinária (2007). Os ratos foram divididos em dois grupos. Grupos controle (CTRL, n = 6) foram tratados diariamente com veículo (etanol a 0,4%) e ratos do grupo TBT100 (TBT100, n = 5) foram tratados diariamente com 100 ng / kg / dia de TBT, respectivamente, por 15 dias. Após o período de 15 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados.

Todos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg / kg, ip., Fontoveter, Brasil). As doses e rotas de exposição foram escolhidas com base em protocolos de estudos anteriores (PODRATZ *et al.*, 2012; BERTULOSO *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016) e outros (ZHOU *et al.*, 2013).

Todos experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Pesquisa Biomédica para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório disponíveis on-line e seguiram as recomendações das Diretrizes da Associação Americana de Medicina Veterinária (2007). O uso dos modelos animais nesta pesquisa, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais (CEUA), desta instituição (página 115).

3.3.2 *Quantificação da densidade mineral óssea*

O quantificação da densidade mineral óssea (DMO) foi realizado por meio de medidas de Absorciometria por Raios X de dupla emissão (DXA), utilizando Faxitron 6000c, Suíça. Os dados foram expressos em g / cm^2 e categorizados como osteopênico / osteoporótico ($<-2,0$) ou normal ($-1,0 <t> -1,5$). Todos os animais com intervalo de pontuação t entre -1,5 e -2,0 foram classificados para minimizar as chances de falsos negativos (n = um excluído do grupo controle). Além disso, os cortes de raios X de uma dimensão integrados (g / cm^2) foram então normalizados por cortes tridimensionais utilizando a determinação da pontuação t (também da Faxitron, Suíça). Os dados também foram normalizados pelo peso corporal do animal, assim como as imagens dos raios X também foram registradas.

3.3.3 *Análise da morfologia da coluna vertebral*

Para analisar a morfoestrutura óssea da coluna vertebral de todos os animais, utilizamos como ferramenta a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Os ossos foram limpos mecanicamente, com o uso de água destilada e retirada de tecidos adjacentes de forma manual, sem o uso de qualquer agente corrosivo para não danificar a ultraestrutura óssea. As colunas vertebrais foram lavadas com PBS (0,9% NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) cinco vezes, com o objetivo de promover a retirada de proteínas existentes, além de manter o pH estável, a fim de evitar artefatos e também manter a osmolaridade do material. Após a lavagem, o ossos foram submetidos à fixação. A fixação foi feita com 2% glutaraldeído (GA) e 2% paraformaldeído (PA) em tampão PIPES (ácido 1,4-pipeazinadietanosulfônico, pH 7,4), por 24h. Após essa etapa, foi iniciado o processo de desidratação, em série com etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes 100%, por 40 minutos), seguido pelo Ponto Crítico (Bal-Tec CPD 030), no qual etanol foi substituído gradativamente por CO_2 líquido. O ponto crítico acontece no momento em

que a interface entre CO₂ líquido/gasoso não existe, pois a quantidade de moléculas líquidas que se tornam gás é exatamente igual à quantidade de moléculas de gás que se tornam líquidas. A temperatura foi então elevada e todo o líquido se tornou gás, deixando a amostra totalmente seca. As amostras foram fixadas, com o auxílio da fita de carbono e tinta de prata sobre o suporte *stubs*, que estará em contato direto com o porta-amostras do microscópio.

O material foi metalizado no aparelho Bal-Tec FCD 050, sob uma atmosfera de argônio e foi coberto com platina (Pt), o uso da platina foi uma opção em detrimento da cobertura com ouro (Au), utilizado como técnica de rotina, em função da platina ter uma melhor e maior interatividade com os elétrons liberados pelo filamento de tungstênio no momento da visualização no microscópio. As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL 1400 PLUS) à 25 KV.

3.3.4 Tomografia computadorizada quantitativa (qCT)

A tomografia computadorizada da coluna vertebral dos animais utilizados neste trabalho foi realizada na Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, UENF. As amostras foram posicionadas no tomógrafo modelo 2290468 GE Healthcare® em decúbito esternal para realização do procedimento, as imagens tomográficas obtidas foram reconstruídas através do software OsiriX, lite versão 2.0. Como referência para a densidade mineral óssea, foi utilizado um padrão (*phantom*) de hidroxapatita e água, para calibração de valores de atenuação. A avaliação quali-quantitativa foi realizada por 2 avaliadores experientes independentes, havendo concordância entre os mesmos quanto aos resultados observados. Todas as imagens foram analisadas quantitativamente utilizando o programa Image J®, versão 1.51S (Wayne Rasband National Institute of Healths, USA). E os valores foram analisados estatisticamente por ANOVA® seguida do teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 SEÇÃO I : ANÁLISE ULTRAESTRUTURALEM MODELOS DE OSTEOPOROSE E DOENÇA ALZHEIMER

4.1.1 *Análise da presença de lipídios no cérebro*

Utilizando a microscopia ótica e através da técnica de marcação de lipídios por oil red, foi possível observar a presença de lipídios no cérebro dos animais estudados. Em animais controle (Figura 6A, B e C) observamos uma fraca marcação, ao passo que em animais OVX (Figura 6D, E e F), APOEKO (Figura 6G, H e I) e (Figura 6J, K e L) verificamos marcações mais forte, indicando um acúmulo de lipídios nas amostras estudadas. Especificamente, no cérebro de animais ovariectomizados além do acúmulo de lipídios no interior dos vasos sanguíneos (FIGURA 6D, 7E), também foi possível observar a presença de espaçamento do tecido vascular com a presença de lipídios em meio às células que compõem os tecidos vasculares. Em animais APOEKO, foi possível observar a presença de um grande acúmulo de lipídios no interior de vasos sanguíneos, além de locais específicos de grande quantidade de lipídios extravasando em meio aos tecidos vasculares e uma possível quebra da barreira hematoencefálica (FIGURA 6H-I). Em tecidos cerebrais de animais APOEKO/OVX, foi possível visualizar um grande acúmulo de lipídios em um vaso dilatado e uma espessa camada de tecido vascular (FIGURA 6J, 1K), onde também foi possível identificar a presença de acúmulo de lipídios (FIGURA 6L).

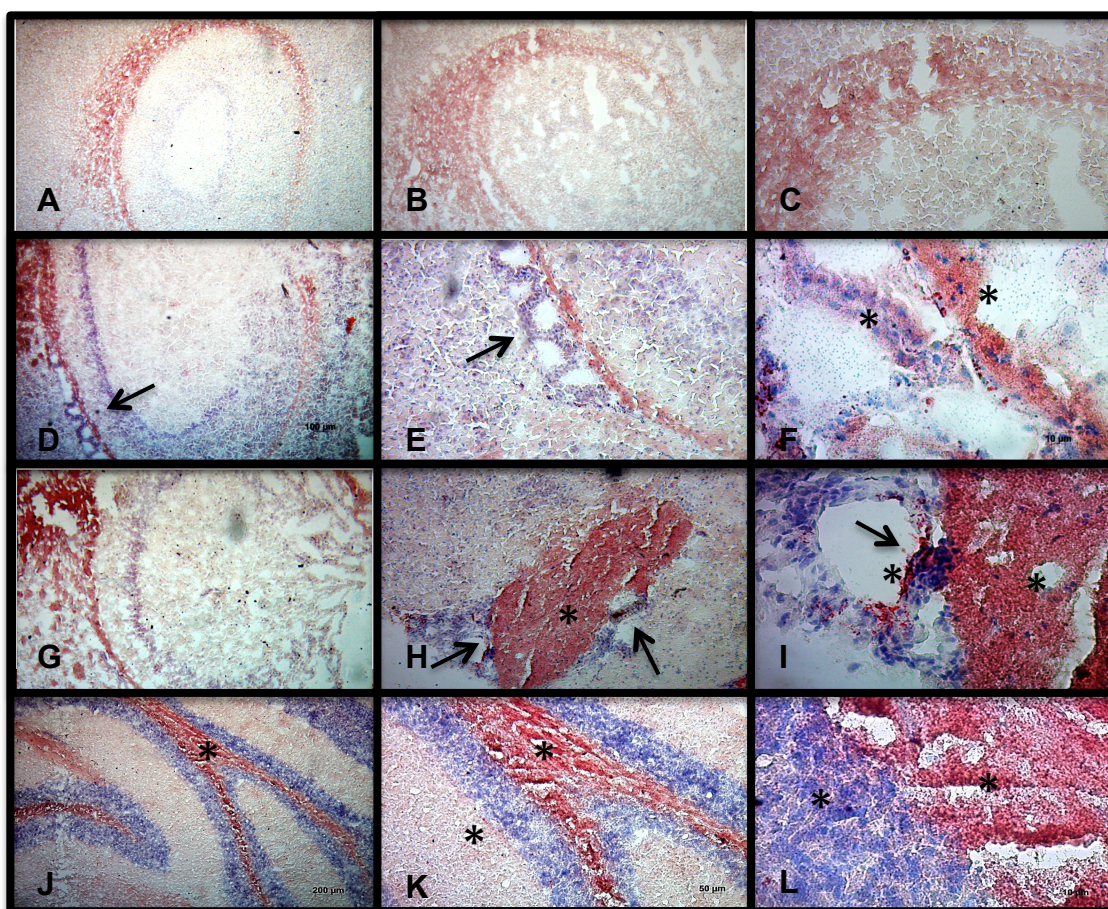


Figura 6: Microscopia óptica de cortes histológicos cerebrais. Histoquímica utilizando oil red e HE. A, B e C – controle C57 (WT); D, E e F - C57 ovariectomizados (OVX); G, H e I - APOE-KO (ApoE/SHAM); J, K e L – APOEKO ovariectomizados (ApoE/OVX). Asteriscos – presença de lipídios marcados por oil red; setas – parede do vaso sanguíneo com a presença de lipídios em meio aos tecidos vasculares.

4.1.2 Análise histológica cerebral

Para observar as possíveis alterações estruturais presentes no cérebro e a presença de estruturas específicas como placas β -amiloides e agregados neurofibrilares, utilizamos o método histológico Cajal. Os resultados dessa análise revelaram a presença de placas amiloides no cérebro de animais APOEKO e APOEKO/OVX (Figura 7H, K e L). Além disso, foi possível identificar os diversos emaranhados neurofibrilares nas amostras (Figura 7G-L) APOEKO e APOEKO/OVX. Nas amostras APOEKO/OVX esses

emaranhados tornam-se mais evidentes por toda a extensão da amostra (Figura 7J-L). Os neurônios observados na amostra controle (Figura 7A- C) apresentam citoplasma claro, característico neste tipo de amostra. Nas amostras OVX, os neurônios apresentam diversas vesículas eletrodensas no seu interior (Figura 7F). Essas mesmas características histológicas foram identificadas nas amostras APOEKO, neurônios com muitas vesículas eletrodensas, identificadas como vesículas lisossômicas (Figura 7I).

Ao analisarmos as células gliais, especificamente a micróglia, foi possível observar células de micróglia ativadas, caracterizadas por células arredondadas com núcleo eletrodense escuro. A presença desse tipo celular foi observado em amostras OVX e APOEKO (Figura 7A-C). Interessantemente, no cérebro de animais APOEKO/OVX (Figura 7J-L) não foram identificadas células da micróglia ativadas, mas, sim, placas β -amiloides e intensos emaranhados neurofibrilares (NFTs).

Ao realizarmos a contagem celular no cérebro dos grupos estudados, verificamos que a quantificação de micróglia ativadas foi possível de ser realizada em cérebro de animais OVX (69 ± 5) e APOEKO (111 ± 8 , $n=10$), $n=10$, $p<0,005$. Não houve a presença de micróglia ativada no cérebro de animais controle (SHAM) e no cérebro de animais APOEKO/OVX, devido a presença intensa de NFTs também não foi possível identificarmos a micróglia ativada (GRÁFICO 1). A quantificação numérica de micróglia ativada foi realizada por contagem individual encontrada da área total do campo observado. Para cada grupo, foram analisados 10 campos aleatórios.

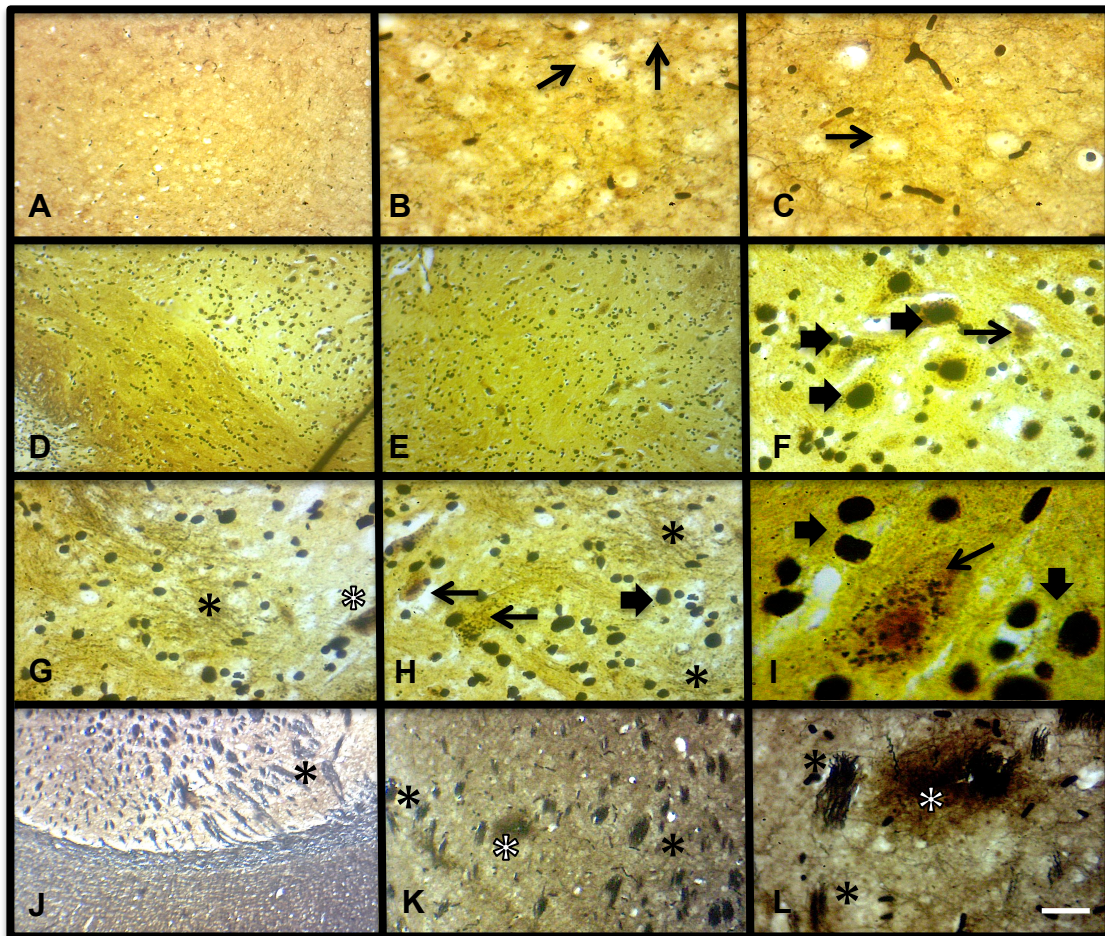


Figura 7: Microscopia óptica de cortes histológicos cerebrais. Histoquímica utilizando o método de Cajal. A, B e C – controle C57 (WT); D, E e F - C57 ovariectomizados (OVX); G, H e I - APOE-KO (ApoE/SHAM); J, K e L – APOEKO ovariectomizados (ApoE/OVX). Setas simples – neurônios; Setas largas – micróglia ativada; Asteriscos escuros – emaranhados neurofibrilares; Asteriscos claros – placas β -amiloides. A,D,E,J – barra 300 μ m; B,G,H,K – barra 100 μ m; C,F,I,L – barra 30 μ m.

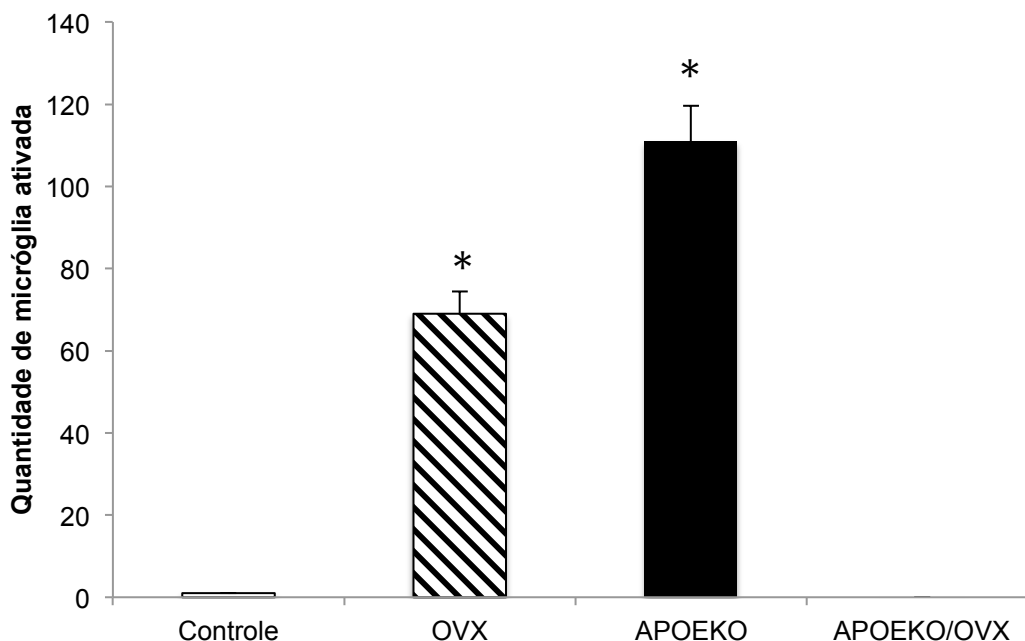


Gráfico 1: Quantidade de células da micróglia ativada. Controle – animais C57 SHAM; OVX – animais C57 ovariectomizados; APOEKO – animais sem apolipoproteína-E; APOEKO/OVX – animais APOE ovariectomizados. * $p < 0,005$, comparados ao grupo controle. Os valores foram analisados estatisticamente por ANOVA© seguida do teste de Tukey.

4.1.3 Análise da ultraestrutura do cérebro

Diversos estudos descrevem o papel central da apolipoproteína E (apoE) no transporte de lipídios e a isoforma 4 (apoE4) como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças vasculares, como a arterosclerose. Além disso, a apoE4 é também considerada um fator de risco crucial para o desenvolvimento da DA (FARRER *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2015). Vários mecanismos pelos quais APOE-4 promove DA foram propostos; após a lesão cerebral, a apoE é produzida pelas células gliais para transportar o colesterol para as membranas sinápticas e neuronais danificadas, restabelecendo as morfoestruturas cerebrais e, conseqüentemente, suas funções; no entanto, a reparação e a remodelagem de estruturas danificadas parecem ser menos eficazes por apoE-4 do que outras isoformas (MAHLEY *et al.*, 2006; VERGHESE *et al.*, 2011; FARRER *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2015).

No que diz respeito aos estudos acerca da influência de estrogênio na manutenção das estruturas cerebrais e no desenvolvimento da DA, estes são ainda controversos (LI *et al.*, 2014; SPENCER *et al.*, 2014). Tal fato proporciona uma importância ainda maior às pesquisas que possam contribuir na elucidação dessas questões.

Sendo assim, para que pudéssemos analisar as implicações da deficiência de estrogênio e da apoE na ultraestrutura cerebral, realizamos a técnica de MET nos quatro grupos de animais C57 SHAM, OVX, APOEKO e OVX/APOEKO utilizados neste estudo.

Os resultados revelaram que a deficiência da proteína apoE promove uma perda do neurópilo evidenciado por um aumento do espaço intercelular (FIGURA 8C), quando comparado aos animais controle (FIGURA 8A). Quando analisamos o cérebro dos animais OVX, observamos que não houve uma perda significativa de neurópilo (FIGURA 8B); porém, em animais APOEKO/OVX, observamos que a ausência da APOEKO combinada à deficiência de estrogênio, provocada pela ovariectomia, promove uma perda significativa de neurópilo (FIGURA 8D). O gráfico (GRÁFICO 2) mostra que a área de perda de neurópilo no cérebro foi de 10 vezes mais em animais APOEKO/OVX ($151.286 \pm 0.200 \mu\text{m}^2$), em relação ao cérebro de animais controle ($14.549 \pm 0.150 \mu\text{m}^2$, $n = 10$; $p < 0.001$).

A quantificação da perda de neurópilo foi realizada subtraindo a área sem neurópilo pela área total do campo visual de todos os quatro grupos estudados.

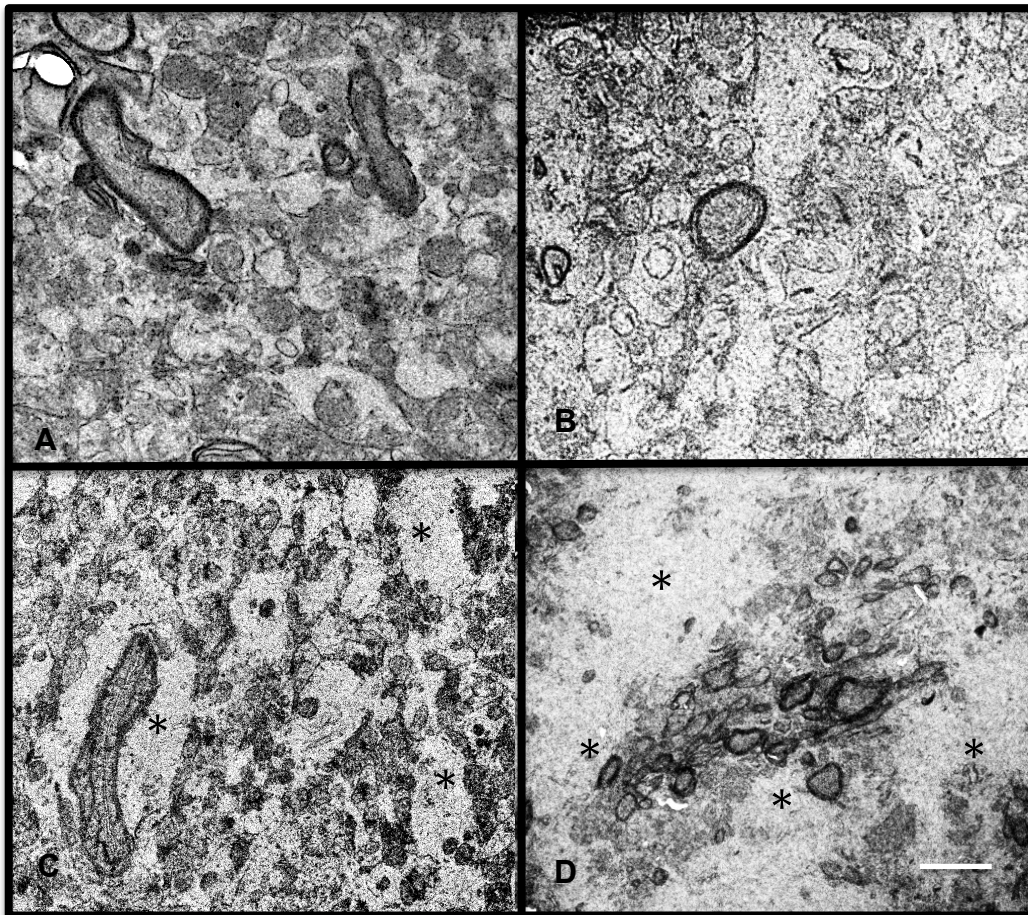


Figura 8: Análise do neurópilo Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do cérebro. Em A, neurópilo do cérebro de animais controle; B, neurópilo de cérebro de animais OVX; C, neurópilo de cérebro de animais APOEKO e D, neurópilo de cérebro de animais APOEKO/OVX. A, B, C, D – barra 1 μ m.

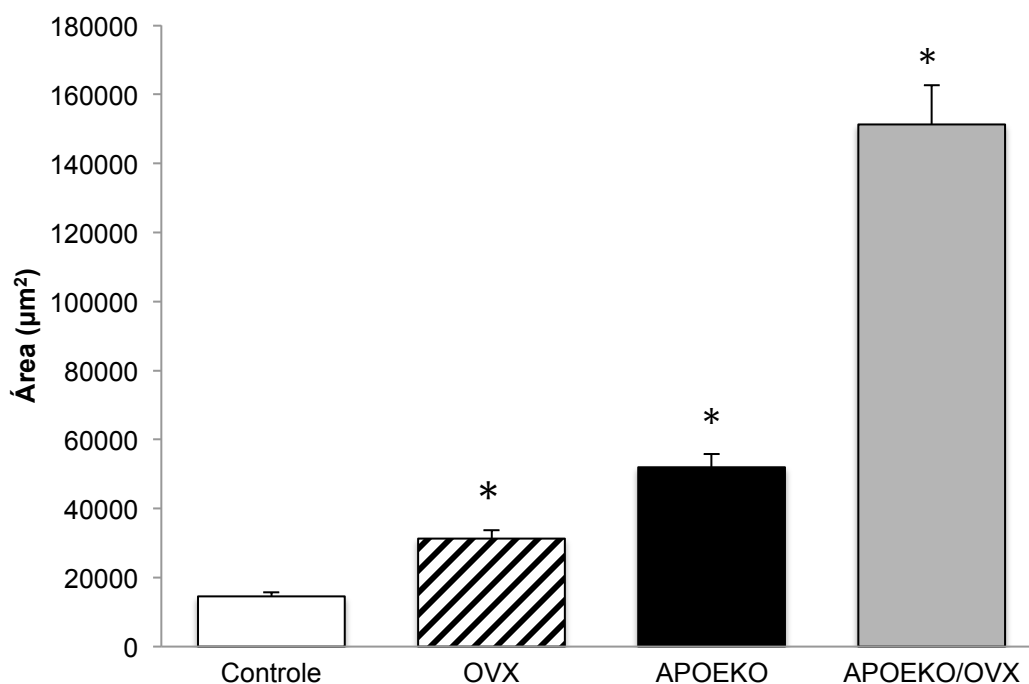


Gráfico 2: Medida da área de neurópilo perdido no cérebro de camundongos (μm^2). Controle - animais SHAM; OVX - animais ovariectomizadas; APOEKO - animais sem apoE; APOEKO/OVX - animais sem apoE e ovariectomizadas. * $p < 0,001$, comparados ao grupo controle. Os valores foram analisados estatisticamente por ANOVA© seguida do teste de Tukey.

Ao analisarmos as demais ultraestruturas presentes no cérebro dos animais investigados, foram identificados muitos axônios mielinizados, principalmente na amostra WT (FIGURA 9A), já na amostra APOEKO/OVX, os axônios identificados estavam em processo de desmielinização (FIGURA 9D), também é possível observar diversos fragmentos de oligodendrócitos devido a desmielinização. Nas amostras OVX e APOEKO (FIGURA 9B e 9C), verificamos poucos neurônios mielinizados. Em uma visão geral da amostra foi possível observar algumas regiões mais eletrodensas em amostras APOEKO e APOEKO/OVX, que foram analisadas posteriormente utilizando um maior aumento.

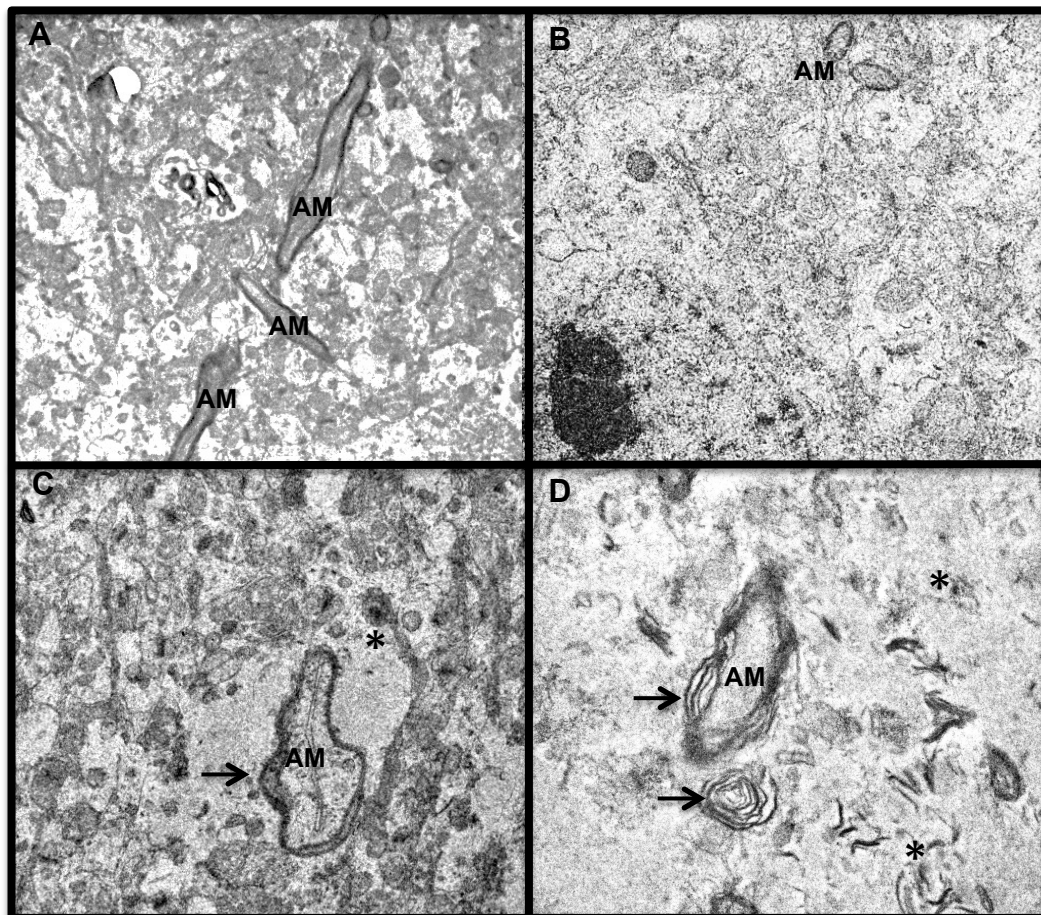


Figura 9: Microscopia Eletrônica de Transmissão de cortes do tecido cerebral de camundongos para análise da ultraestrutural. A – controle C57-SHAM (WT); B - C57 ovariectomizados (OVX); C - APOEKO ; D – APOEKO ovariectomizados (ApoE/OVX). AM – axônios mielinizados; Setas – processo de desmielinização; Asterisco – fragmentos de oligodendrócitos.

4.1.4 Análise da morfologia da coluna vertebral

A deficiência estrogênica é a causa mais comum de osteoporose, porém a ação do hormônio estrogênico combinado a uma deficiência da apoE sobre o tecido ósseo ainda não foi claramente definida. Para que pudéssemos observar as possíveis alterações na morfoestrutura óssea dos animais utilizados nessa pesquisa, realizamos a microscopia eletrônica de varredura (MEV) na coluna vertebral.

A análise da morfologia da coluna vertebral das amostras controle mostrou uma superfície uniformizada, com a presença de periósteo íntegro, canais de Volkmann claramente observáveis com bordas preservadas contendo em seu interior vasos sanguíneos, também foi possível visualizar o periósteo em toda sua uniformidade revestindo a estrutura óssea (FIGURA 10 A-C). A análise da coluna vertebral de animais que haviam sido ovariectomizados (OVX) mostrou uma superfície uniforme, porém com uma aparente perda do periósteo e poros vasculares dos canais de Volkmann com bordas irregulares (FIGURA 10D – F). Ao observarmos as amostras da coluna vertebral de animais APOEKO (FIGURA 10G – I), verificamos que a superfície óssea não se apresentava uniforme e, em aumentos maiores dessas áreas, foi possível observar a presença de muitas fossas de reabsorção óssea e perda da integridade do periósteo (FIGURA 10J).

Quando as colunas vertebrais de animais APOEKO/OVX foram analisadas, mais fossas de reabsorção na superfície óssea foram observadas, indicando sinais de uma maior deterioração (FIGURA 10J – L), além da perda da integridade do periósteo.

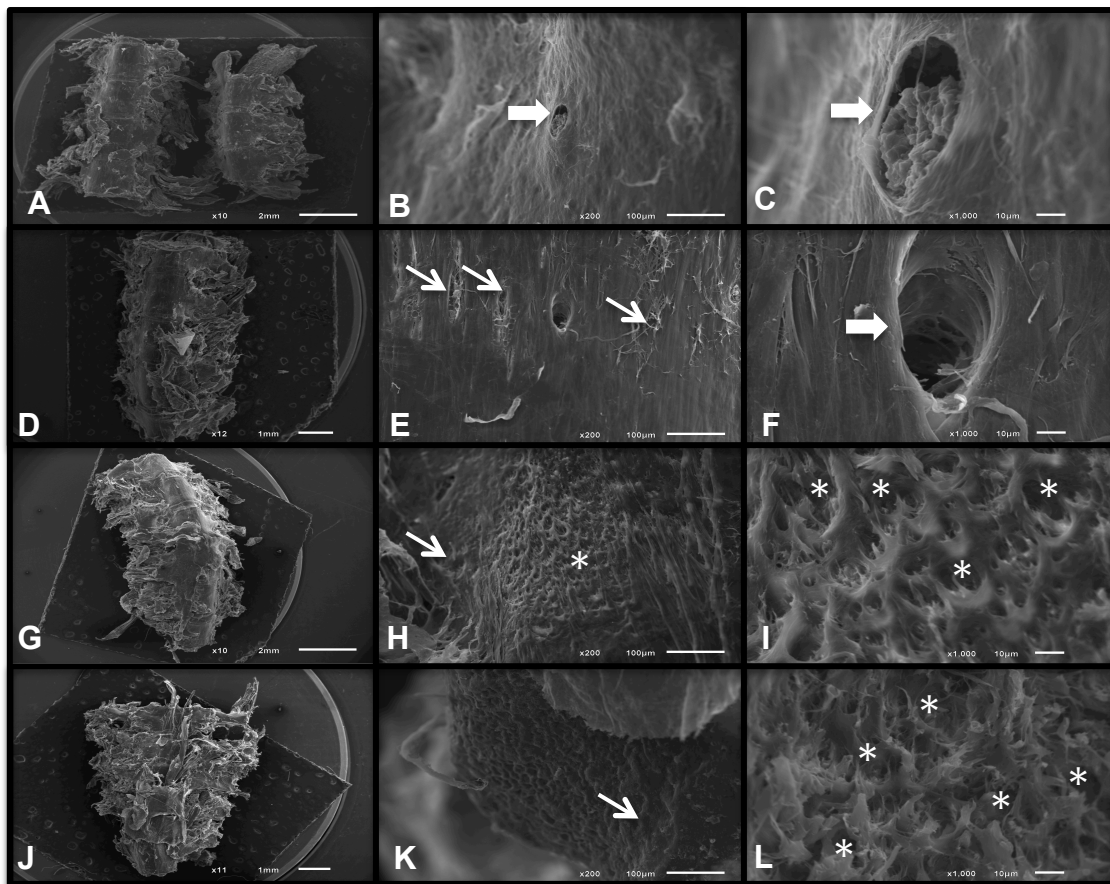


Figura 10: Microscopia Eletrônica de Varredura da coluna vertebral de camundongos. A, B e C – controle C57 (WT); D, E e F - C57 ovariectomizados (OVX); G, H e I - APOE-KO (ApoE/SHAM); J, K e L – APOEKO ovariectomizados (ApoE/OVX). Setas simples – sinais de perda do periósteo; Setas largas – canais de Volkmann; Asteriscos – superfície óssea apresentando processo de reabsorção;

4.1.5 Análise da densidade óssea mineral

Para que pudéssemos compreender os efeitos da presença das cavidades e das alterações na uniformidade da superfície óssea encontrada na coluna vertebral dos animais OVX, APOEKO e APOEKO, quando comparados ao controle, foi realizada uma Tomografia Computadorizada quantitativa (qCT). Nossos resultados indicam que a deficiência de estrogênio promove uma redução da massa óssea mineral (FIGURA 11B) que também pode ser observada em animais APOE (FIGURA 11C). A análise por qCT da coluna vertebral de animais APOE/OVX indicou que a perda da massa óssea é

maior em animais com deficiência de estrogênio e da proteína apoE (FIGURA 11C), quando comparados ao controle (FIGURA 11A).

A quantificação da perda de massa óssea, nos mostrou que em animais OVX, APOEKO e APOEKO/OVX foi de 24,36%, 34,23% e 38,31%, respectivamente (GRÁFICO 3, n= 130 secções, p<0,001). A quantificação foi realizada através do comparativo entre as emissões intensidades captadas entre as amostras controle e os outros grupos analisados.

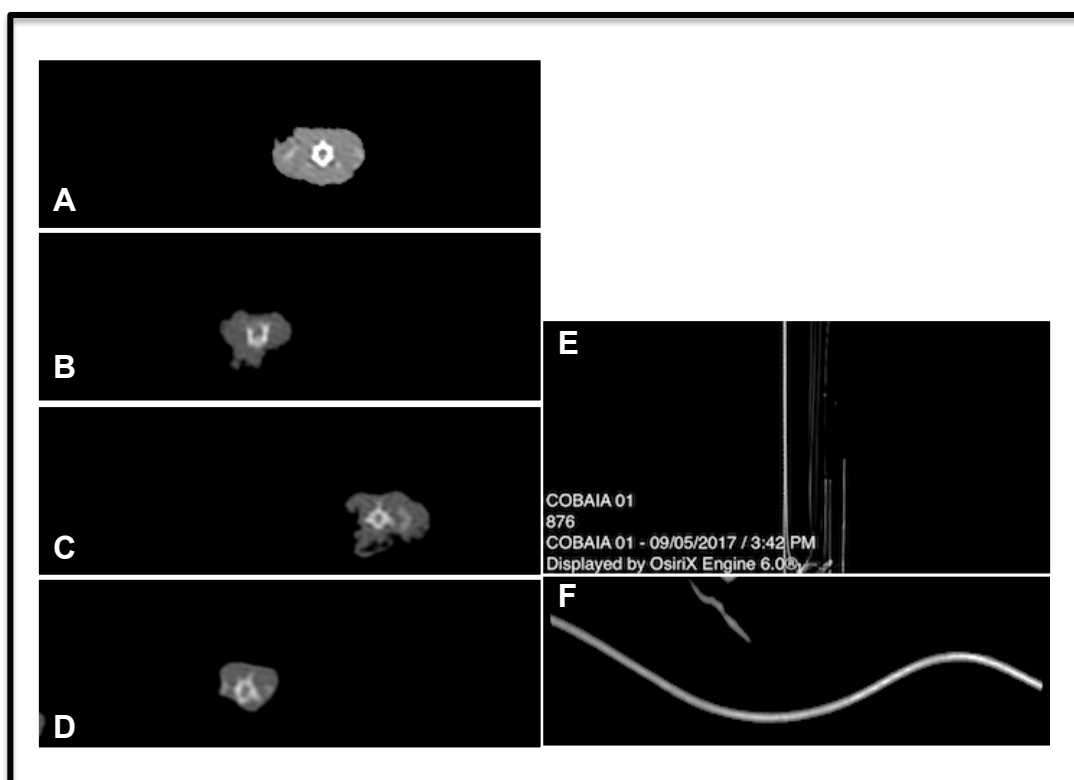


Figura 11: Tomografia Computadorizada quantitativa (qCT) de coluna vertebral de camundongos para análise quali e quantitativa da densidade mineral óssea. A – controle C57 (WT); B - C57 ovariectomizados (OVX); C - APOE-KO (ApoE/SHAM); D – APOEKO ovariectomizados (ApoE/OVX); E – padrão da captação de por emissão iônica; F – phantom (padrão de densidade).

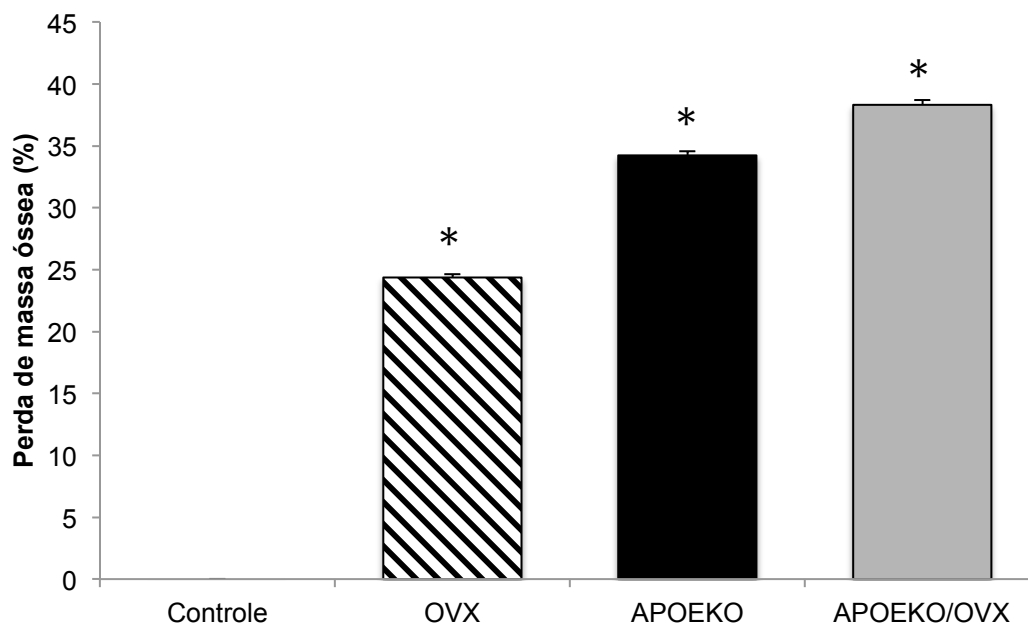


Gráfico 3: Perda da massa óssea, encontrada nos animais analisados por qCT, comparados ao controle, em porcentagem. Controle – animais SHAM; OVX – animais ovariectomizadas; APOEKO – animais sem apoE; APOEKO/OVX – animais sem apoE e ovariectomizadas. * $p < 0,001$, comparados ao grupo controle. Os valores foram analisados estatisticamente por ANOVA® seguida do teste de Tukey.

4.1.6 Análise da presença de placas amiloides

Para que fosse possível identificar uma possível presença de placas b-amiloides em outros órgãos, analisamos outros órgãos como fígado, rim e fêmur, utilizando o método por marcação com Tioflavina-S (TS). Nossos resultados demonstraram a presença de placas amiloides em todos os órgãos analisados somente de animais APOEKO e APOEKO/OVX (FIGURA 12G-L). A intensidade da fluorescência indicou que a deficiência de APOE acoplada à deficiência de estrogênio das amostras APOEKO/OVX promoveu uma maior formação de placas b-amiloides nesses animais (FIGURA 12J-L). Em animais controle (FIGURA 12A-C) e OVX (FIGURA 12D-F) não houve a captação significativa de emissão de luz, indicando que nessas amostras não há acúmulo de placas amiloides nos órgãos investigados.

O gráfico (GRÁFICO 4) mostra que somente o fígado de animais APOEKO (12.398 ± 0.138) e APOEKO/OVX (22.619 ± 0.205), assim como o rim de animais APOEKO (15.698 ± 0.009), de animais APOEKO/OVX (27.148 ± 0.116), do fígado de animais APOEKO (17.489 ± 0.178) e de animais APOEKO/OVX (31.994 ± 0.098) emitiram fluorescência, indicando a deficiência da apolipoproteína-E, que foi crucial para o acúmulo de placas amiloides. Porém, a depleção de estrogênio foi importante para potencializar, em quase 2x a amiloidose no fígado ($n = 15$; $p < 0.005$), rim ($n = 15$; $p < 0.011$) e fêmur ($n = 15$; $p < 0.001$). A quantificação foi realizada através do comparativo entre as emissões intensidades de fluorescência captadas entre as amostras de animais OVX e APOEKO/OVX, pois apenas estas apresentaram reação com a Tioflavina-S.

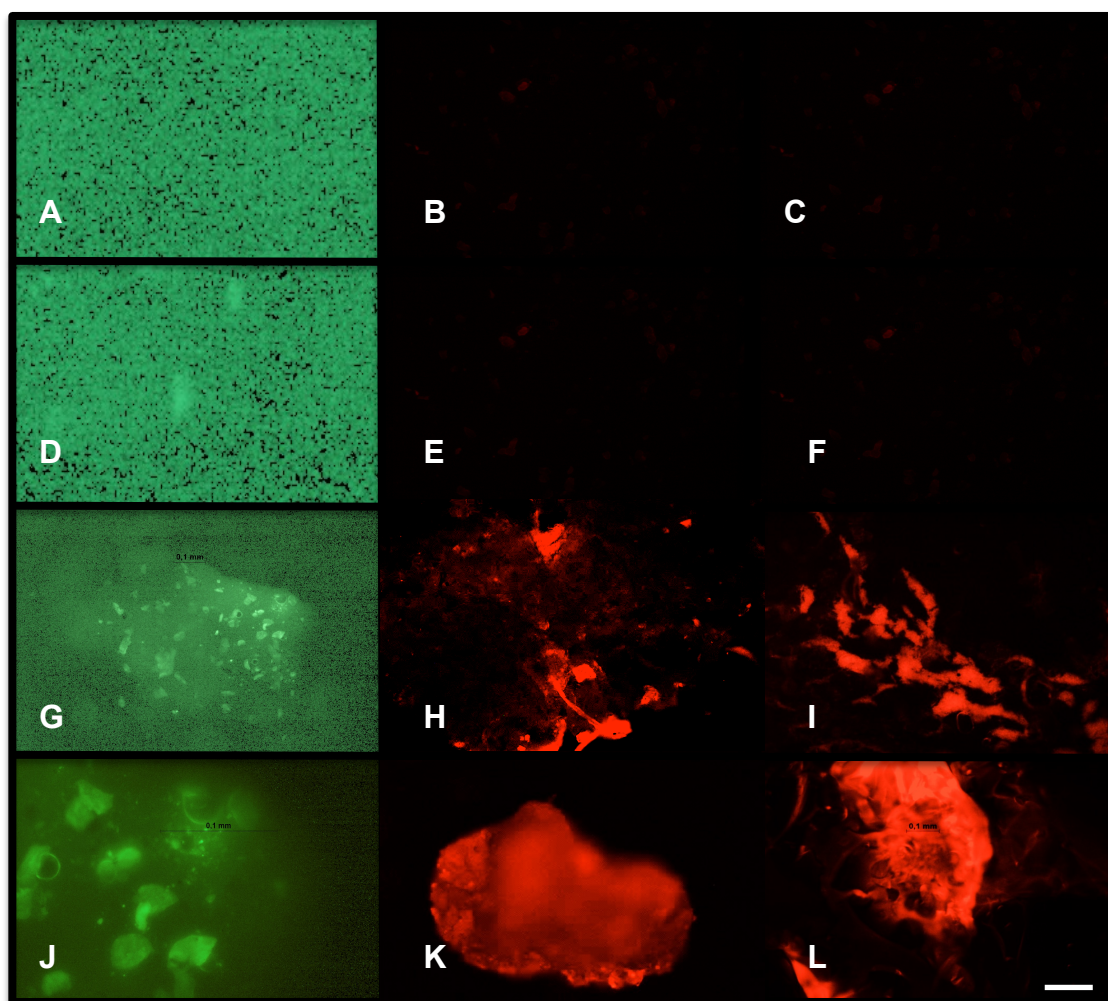


Figura 12: Microscopia de Fluorescência Confocal do fígado (A, D, G e J), rim (B, E, H, K) e fêmur (C, F, I e L) de camundongos para identificação de placas amiloides, utilizando o método Tioflavina S. A, B e C – controle C57 (WT); D, E e F - C57 ovariectomizados (OVX); G, H e I - APOE-KO (ApoE/SHAM); J, K e L – APOEKO ovariectomizados (ApoE/OVX). Barra – 300 μm .

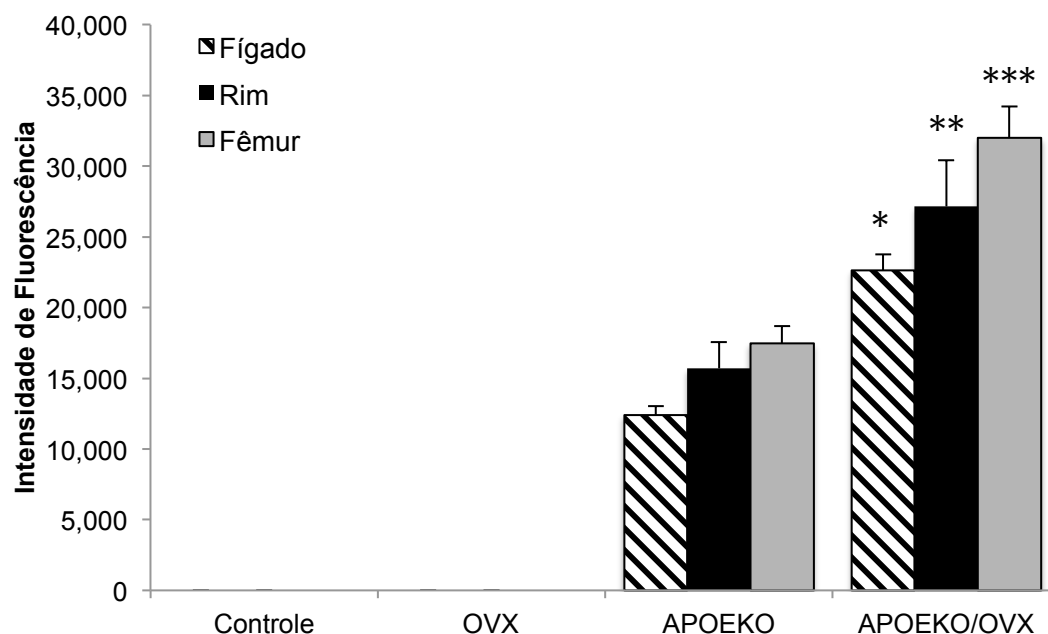


Gráfico 4 : Intensidade de fluorescência captada no fígado, rim e fêmur indicando a presença de placas amiloides através de Tioflavina-S. Controle – animais SHAM, não houve captação; OVX – animais ovariectomizados, não houve captação; APOEKO – intensidade de fluorescência captada em animais APOEKO; APOEKO/OVX – intensidade de fluorescência captada em animais sem apolipoproteína-E e ovariectomizados. * $p < 0,005$, comparados ao fígado do grupo OVX; * $p < 0,011$, comparados ao rim do grupo OVX; * $p < 0,001$, comparados ao fêmur do grupo OVX. Os valores foram analisados estatisticamente por ANOVA® seguida do teste de Tukey.

4.1.7 Análise da presença de lipídios no fígado

A Apolipoproteína E é uma importante proteína envolvida no transporte de lipídios como colesterol e triglicerídeos no sangue.

Para avaliarmos o papel do estrogênio e da apoE no fígado, utilizamos o método de Oil red em animais submetidos à ovariectomia (OVX), animais APOEKO, APOEKO/OVX e animais controle (SHAM). Nossos resultados demonstraram que a deficiência de estrogênio promoveu um aumento de lipídios no fígado dos animais OVX que se distribuíram de maneira relativamente uniforme (FIGURA 13F). Ao analisar o fígado de animais APOEKO, verificou-se a presença de lipídios acumulados (FIGURA 13G – I),

já em animais APOEKO/OVX foi possível observar a presença de grande quantidade de lipídios no fígado desses animais (FIGURA 13K e L).

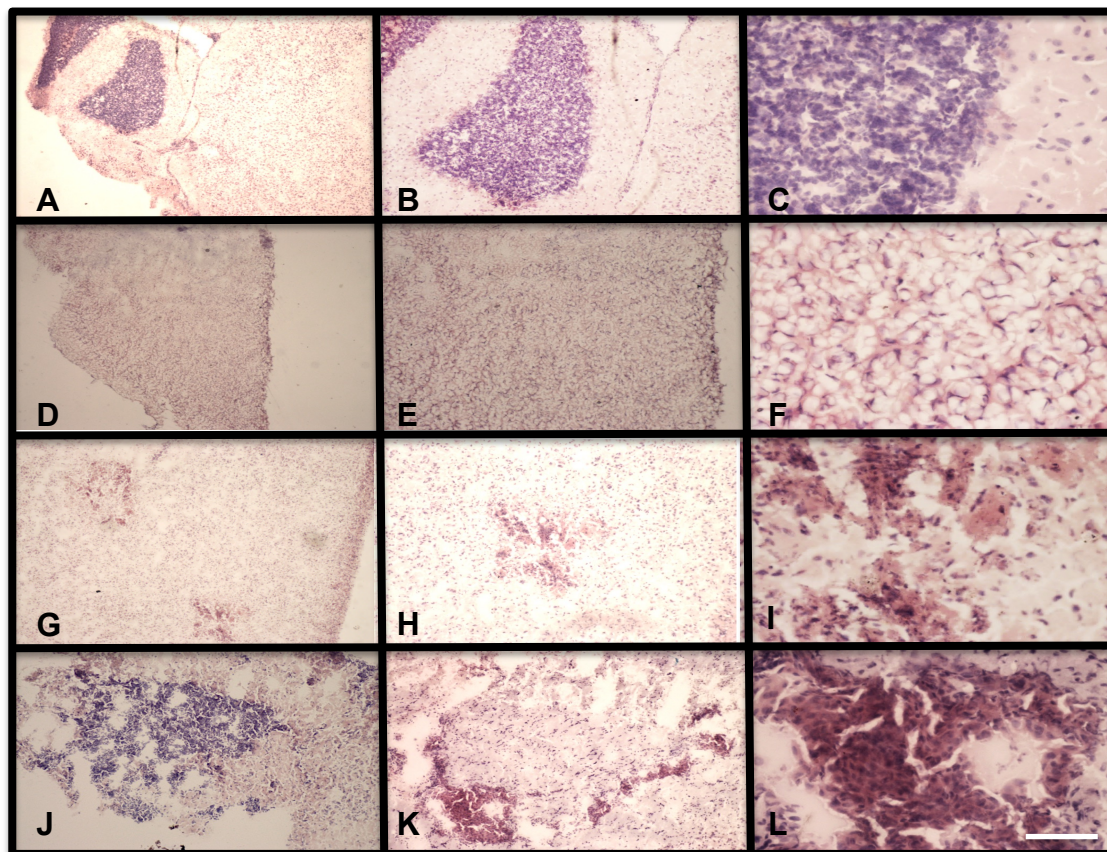


Figura 13: Microscopia Óptica do fígado de camundongos, identificação de lipídios utilizando o método Oil red. A, B e C – controle C57 (WT); D, E e F - C57 ovariectomizados (OVX); G, H e I - APOE-KO (ApoE/SHAM); J, K e L – APOEKO ovariectomizados (ApoE/OVX). Setas simples – sinais de acúmulo de lipídios. A, D, G, J – barra 300 μm ; B, E, H, K – barra 100 μm ; C, F, I, L – 30 μm .

4.2. SEÇÃO II: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE ESTRESSE POR TBT

Em pesquisas desenvolvidas previamente pelo nosso laboratório, demonstramos que o tratamento com TBT promove profundas modificações no sistema endócrino dos animais tratados (DELGADO FILHO *et al.*, 2010; DELGADO FILHO *et al.*, 2011; PODRATZ *et al.*, 2015; SANTOR-SILVA *et al.*, 2016; SENNA *et al.*, 2017) e que o TBT exibiu muitos efeitos deletérios de ordem cardiovascular, reprodutiva e glândulas hipotalâmicas-hipófise dependentes (MERLO *et al.*, 2016; COUTINHO *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2017; BERTULOSO *et al.*, 2015; RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2012; SENA *et al.*, 2017). Observamos que nas fêmeas, os efeitos tóxicos do TBT podem estar associados à expressão do receptor de estrogênio alfa (ER α) (COUTINHO *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2017; BERTULOSO *et al.*, 2015), sendo este receptor a principal isoforma expressa em células ósseas, especialmente osteoblastos (PAVONE *et al.*, 2017; ROONEY & VAN DER MEULEN, 2017). O estrogênio inibe a ativação do remodelamento ósseo, mais provavelmente através dos osteoclastos. Os efeitos diretos do estrogênio no osso incluem a indução da apoptose e a inibição da formação de osteoclastos. Além desses efeitos diretos sobre os osteoclastos, o estrogênio também parece regular a inibição da apoptose de osteoblastos e aumentar a expectativa de vida dessas células (KOUSTENI *et al.*, 2001). Assim, a deficiência de estrogênio induzida pelo TBT parece afetar diretamente a manutenção da integridade óssea.

A partir de tais resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa objetivamos identificar as possíveis alterações na integridade da matriz mineral óssea promovidos pelo tratamento com o organoestanho.

4.2.1 Determinação da densidade mineral óssea (DMO)

A quantificação da densidade mineral óssea de animais tratados com TBT foi realizada por meio de medidas de Absorciometria por Raios X de dupla emissão (DXA), (FAXITRON 6000c, Suíça). Verificamos que mesmo doses baixas de TBT (100 ng / kg / dia) por 15 dias levaram a drásticas alterações no metabolismo mineral ósseo. As medições por DXA mostraram que as ratas adultas tratadas com TBT exibiram uma DMO aumentada em aproximadamente 30% (180 mg / cm²) quando comparados aos animais controle (142 mg / cm²), (p = 0,047, FIGURA 14).

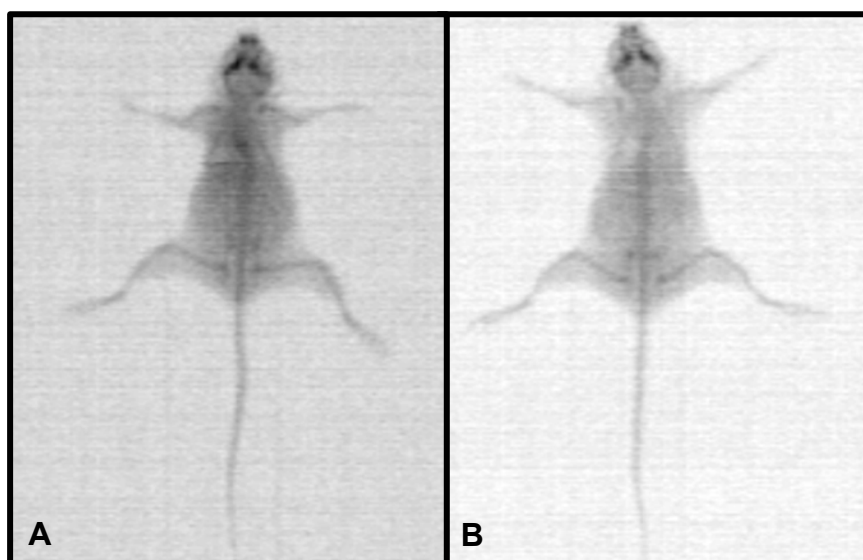


Figura 14: Determinação da densidade mineral óssea (DMO) de animais controle e tratados com TBT, por DXA; A – imagem representativa de animais controle; B – imagem representativa do grupo tratado com TBT;

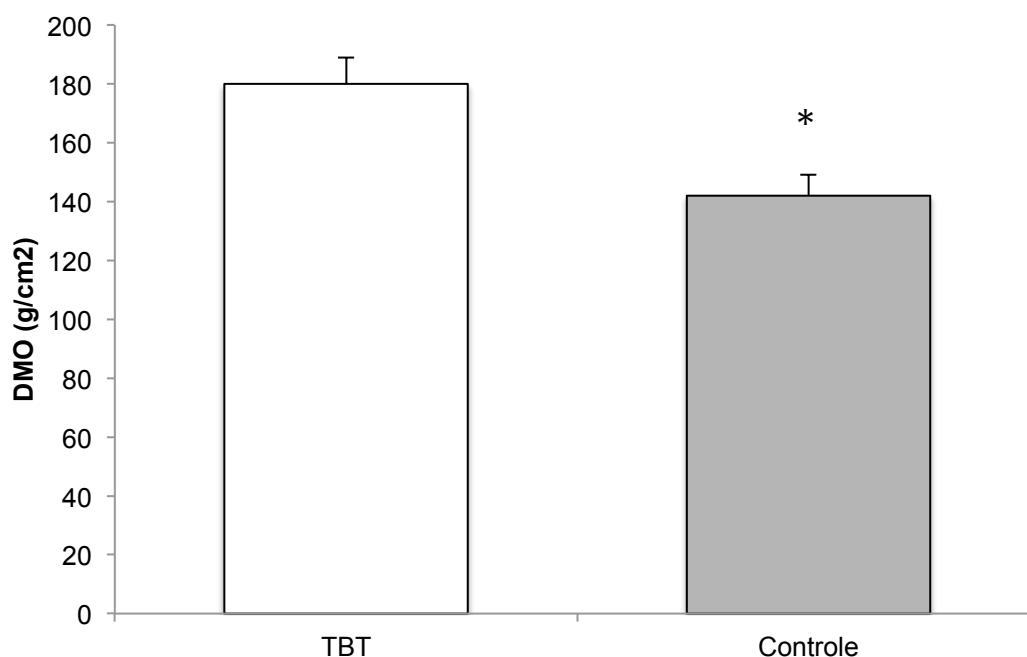


Gráfico 5: Determinação da densidade mineral óssea (DMO) de animais controle e tratados com TBT, por DXA; A – densidade mineral óssea de animais controle em g/cm²; B – densidade mineral óssea de animais tratados com TBT g/cm²; * p<0,0047, comparados ao grupo tratado com TBT. Os valores foram analisados estatisticamente por ANOVA® seguida do teste de Tukey.

4.2.2 Análise da morfologia da coluna vertebral

Diversos estudos envolvendo o efeito do Tributilestanho (TBT) no sistema endócrino (CHEN *et al.*, 2018; MITRA *et al.*, 2017), demonstraram que esse organometal afeta diretamente os hormônios esteroides como testosterona e estrogênio. Enquanto agente desregulador dos hormônios sexuais femininos, o TBT parece estar envolvido, entre outros mecanismos, no desenvolvimento precoce da puberdade e na diminuição do tempo da puberdade (SENA *et al.*, 2017; PODRATZ *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2014).

Sendo a deficiência estrogênica um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose, parece-nos ser de extrema relevância a necessidade de se avaliar os efeitos do estresse por TBT na morfologia óssea.

Para tanto, utilizamos como ferramenta a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na avaliação da ultraestrutura da coluna vertebral das ratas submetidas ao estresse por TBT e das ratas controle. Nossos resultados indicaram que o estresse por TBT causa profundas e graves alterações na morfologia óssea, quando comparada ao controle. O TBT causa danos na borda do corpo vertebral, diminuindo a espessura e causando danos ultraestruturais (FIGURA 15D e E). A osteoporose observada, além de afetar a superfície óssea e as bordas do corpo das vértebras, também afeta os canais de Volkmann que apresentam uma grave deformidade (FIGURA 15F) quando comparados aos sistemas de canais de Volkmann presentes nas vértebras das ratas controle (FIGURA 15C).

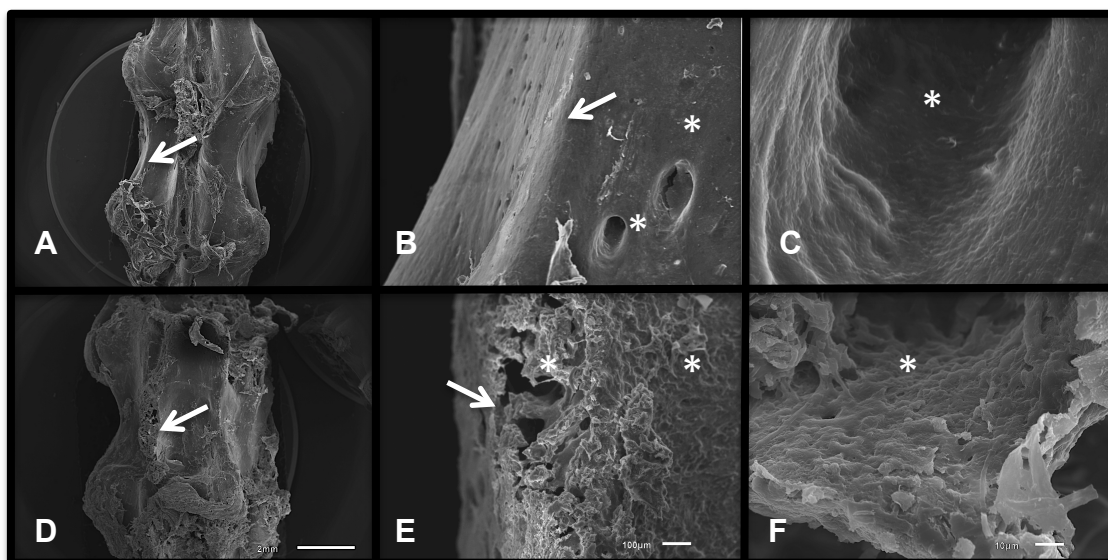


Figura 15: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da coluna vertebral de ratas. A, B e C – controle; D, E e F – animais tratados com TBT; Setas – borda do corpo vertebral; Asterisco – superfície da estrutura óssea;

4.2.3 Tomografia computadorizada quantitativa (qCT)

Apesar dos danos morfoestruturais demonstrarem claramente os graves efeitos do TBT na estrutura óssea vertebral das ratas tratadas, realizamos outra técnica de imagem para avaliarmos os efeitos na Densidade Mineral Óssea (DMO) e, para isso, utilizamos a Tomografia Computadorizada Quantitativa (qCT). Os cortes de leitura foram de 2,5 mm de espessura em intervalos de 1,05 mm. Nossos resultados revelaram que os animais tratados com TBT (FIGURA 16D-G) apresentam mais partes moles e que há uma profunda perda de massa óssea, quando comparados aos animais controle (FIGURA 16A-C). Ao quantificarmos os dados obtidos através da qCT, verificamos que a intensidade de radiação captada da massa mineral nas vertebrae dos animais controle (105.337 ± 534) foi de quase 40% maior do que os animais tratados com TBT (65.485 ± 327), ($p < 0,001$, GRÁFICO 6). A quantificação foi realizada através do comparativo entre as emissões intensidades captadas entre as amostras controle e animais tratados com TBT.

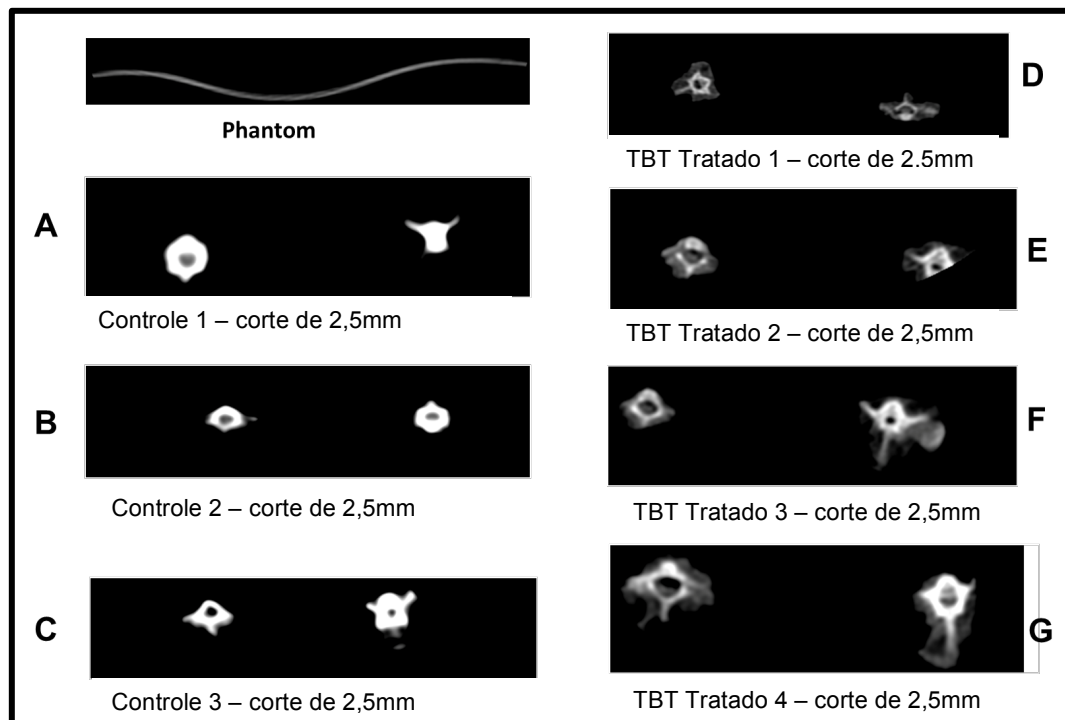


Figura 16: Tomografia Computadorizada Quantitativa (qCT) da coluna vertebral de ratas. Phantom (padrão de densidade); A – C – animais controle; D - G – animais tratados com TBT;

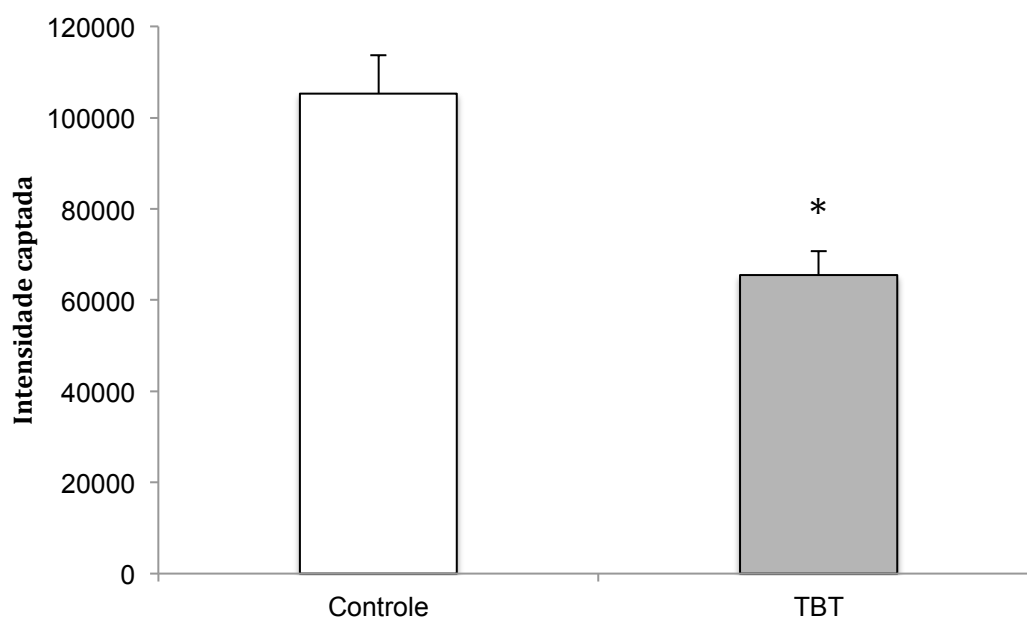


Gráfico 6: Quantidade de massa mineral óssea analisada em animais controle e animais tratados com TBT. Controle – animais sem tratamento; TBT – animais tratados com 100ng/ kg/dia deTBT; * $p < 0,001$, comparados ao controle. Os valores foram analisados estatisticamente por ANOVA© seguida do teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

5.1 SEÇÃO I: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE OSTEOPOROSE E DOENÇA DE ALZHEIMER

Uma das grandes questões da ciência é elucidar quais mecanismos são responsáveis pelo envelhecimento e como sua desregulação direciona a senescência e o declínio, induzindo as células à morte. Em muitas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, as etiologias proximais específicas da doença, como a agregação de proteínas, deterioração tissular, culminando em um mau funcionamento fisiológico, decorrem da desregulação dos processos responsáveis pela regulação do envelhecimento saudável, como a autofagia e as proteostases.

Investigar as alterações ultraestruturais para elucidar os processos celulares envolvidos no contexto de doenças classicamente relacionadas ao envelhecimento como a Osteoporose e a Doença de Alzheimer (DA) fornecerá informações valiosas sobre a biologia fundamental do envelhecimento, bem como ajudará no aumento da qualidade de vida da população idosa.

A osteoporose é uma doença metabólica do osso, que se caracteriza por baixa massa e deterioração do tecido ósseo, conduzindo à fragilidade do osso com conseqüente aumento do risco de fraturas. Essas mudanças ocorrem durante o processo de remodelação contínua do osso, como resultado do desequilíbrio entre o processo de reabsorção pelos osteoclastos e as células formadoras de matriz (osteoblastos).

O declínio da função ovariana na menopausa resulta em diminuição da produção de estrogênio e um aumento paralelo nos níveis de FSH. Os efeitos combinados da privação de estrogênio e aumento da produção de FSH causam uma acentuada estimulação da reabsorção óssea e uma baixa reposição da matriz óssea, resultando em um período de rápida perda de massa óssea que é o fator preponderante para o desencadeamento da osteoporose pós-menopausa (RIGGS *et al.*, 2002). Vários fatores de risco

estão implicados no favorecimento da perda óssea pós-menopausa. Preditores importantes não modificáveis da desmineralização óssea são idade, sexo, período de amenorreia (MOHAMED *et al.*, 2003; KANISAND *et al.*, 2005) e história parental de fratura (KANIS *et al.*, 2004).

No que diz respeito à DA, único gene atualmente associado à doença é o alelo 4 do gene da apolipoproteína E (APOE) (MAHLEY & RALL, 2000). Vários mecanismos pelos quais APOE-4 promove AD foram propostos; após a lesão cerebral, a apoE é produzida pelos astrócitos ou ainda também pela micróglia, para transportar o colesterol para as membranas sinápticas e neuronais danificadas. Em nossos resultados, avaliando a presença de lipídios no cérebro dos animais estudados, verificamos que sob à luz da MO, foi possível identificar um acúmulo de lipídios nos vasos sanguíneos dos animais OVX (FIGURA 6 D-F), quando comparado aos animais SHAM (FIGURA 6 A-C). Esses dados indicam que a depleção de estrogênio, resultado da ovariectomia, promove um acúmulo de lipídios nos vasos sanguíneos dos animais tratados. Segundo Munoz e colaboradores (2002) como consequência dos efeitos do declínio da produção de estrogênio endógeno pelos ovários na menopausa encontram-se os distúrbios funcionais, incluindo dislipidemia, que aumentam o risco de doenças vasculares em mulheres na pós-menopausa. Em animais APOEKO, foi possível identificar também um grande acúmulo de gordura nos vasos sanguíneos cerebrais, além da quebra da barreira hematoencefálica (BHE) (FIGURA 6 G-I). Nossos resultados vão de encontro com diversos estudos importantes que demonstram os efeitos da apoE no desenvolvimento de doenças vasculares e da DA (SAUNDERS *et al.*, 1993; STRITTMATTER *et al.*, 1993), que também parece regular o acúmulo de A β . De acordo com Tai e colaboradores (2016) a ApoE afeta a vascularização cerebral afetando o fluxo sanguíneo, o acoplamento neuronal-vascular e a integridade da BHE. Na periferia cerebral, a ApoE tem importantes implicações na desenvolvimento da aterosclerose (HUANG *et al.*, 2014; TAI *et al.*, 2016). Ao analisarmos a presença de lipídios no cérebro de animais APOE/OVX, foi possível observar claramente, que a deficiência da APOE, acoplada à deficiência do estrogênio, potencializa os efeitos de acúmulo de gordura no

cérebro desses animais (FIGURA 6 J-L), possivelmente favorecendo a formação de aterosclerose e a quebra da BHE nesses animais.

Um estudo epidemiológico demonstrou a relação direta entre altos níveis de colesterol sanguíneo e o aumento de risco de desenvolvimento da DA (KIVIPELTO *et al.*, 2001). Existem muitas evidências sugerindo uma forte relação entre a deterioração da homeostase lipídica cerebral, as alterações vasculares e a patogênica da DA. Essas associações incluem: reconhecimento de que a apoE4, atua como o principal fator de risco genético para o desenvolvimento da DA; estudos epidemiológicos ligando os fatores de risco, como a hipertensão e altos níveis plasmáticos de colesterol, à demência; e também ao efeito benéfico do uso de drogas redutoras do colesterol, como as estatinas, no combate à doença de Alzheimer idiopática (POIRIER *et al.*, 2001). Outros estudos indicaram que o colesterol foi capaz de regular o processo proteolítico da proteína precursora amiloide (APP), favorecendo a formação da substância β -amiloides ($A\beta$), ao passo que uma redução dos níveis plasmáticos do colesterol foi capaz de reduzir a formação amiloida (FASSBENDER *et al.*, 2001).

As características histopatológicas presentes no parênquima cerebral de pacientes portadores da doença de Alzheimer incluem placas $A\beta$, associadas a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau e consequente formação de novos/agregados neurofibrilares (NFT), perda neuronal e sináptica, ativação da micróglia e reação inflamatória.

Ao analisarmos tecido cerebral de animais submetidos à ovariectomia (OVX) e animais APOEKO, foi possível observar a presença da neuróglia ativada com diversas vesículas lisossômicas em seu interior, indicando a indução de apoptose no cérebro desses animais (FIGURA 7F e 7I), quando comparados aos animais SHAM (FIGURA A-C). Micróglia é conhecida por responder rapidamente a alterações na homeostase cerebral durante estresse, trauma, doença ou processo patológico (MATCOVITCH-NATAN *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2017). Elas são as células imunes pré-dominantes residentes no SNC,

que embora inicialmente consideradas responsáveis por orquestrar neuroinflamação (CARTIER *et al.*, 2014). Já os lisossomos são organelas encontradas em todos os tipos de células animais (exceto os eritrócitos) e representam as principais organelas catabólicas da célula. A variedade de substratos degradados nos lisossomos é ampla, variando desde macromoléculas e organelas intracelulares a receptores de superfície e patógenos, entre outros. Para exercer sua função catabólica, os lisossomos contêm um extenso conjunto de hidrolases, incluindo proteases, nucleases, lipases, sulfatases ou fosfatases, cujos pH ótimos são geralmente baixos (pH 4,5-5). No entanto, os lisossomos não são meros locais para descarte e processamento de resíduos celulares, mas também atuam como reguladores centrais da homeostase celular em diferentes níveis. Por exemplo, eles estão envolvidos na regulação das respostas celulares à disponibilidade e composição de nutrientes, resistência ao estresse, morte celular programada, reparo da membrana plasmática, desenvolvimento e diferenciação celular, entre muitos outros (BRAUN *et al.*, 2015a, 2015b; BOYA, 2012; SETTEMBRE *et al.*, 2013b). Assim, a presença da grande quantidade de vesículas lisossômicas encontradas em animais OVX e APOEKO (FIGURA 7F e 7I) indicam que no tecido cerebral desses animais, os lisossomos desempenham um papel determinante nos processos que controlam as funções cerebrais, relacionados a funcionalidade. Interessantemente, ao observarmos o tecido cerebral de animais APOE/OVX, não foi possível observarmos a presença de tais vesículas lisossômicas nos neurônios. Uma possível explicação para esse fato seria a ação combinada da desregulação do transporte de lipídios, promovida pela ausência da APOE, associada a baixos níveis de estrogênio, promovido pela ovariectomia, tenha resultado na apoptose dos neurônios e também no excesso de NFT (FIGURA 7J-L).

Investigar o envolvimento da micróglia no início e progressão da DA está se tornando cada vez mais importante, já que os vários estudos vêm demonstrando os papéis que essas células imunes podem desempenhar. Nesses trabalhos, a micróglia ativada parece estar diretamente ligada à neuroinflamação, acumulação de A β e proteína tau fosforilada, bem como

implicada na perda neuronal e sináptica (FUHRMANN *et al.*, 2010; MORRIS *et al.*, 2013).

Uma outra característica neuropatológica da DA, os NFTs, consistem em filamentos helicoidais procedentes da hiperfosforilação do citoesqueleto da proteína tau. A hipótese da tau e dos NFT sugere que na DA a função normal da proteína tau de estabilizar os microtúbulos neuronais é prejudicada e, mais ainda, os microtúbulos de neurônios doentes são gradualmente substituídos por NFT (ZHAO & ZHAO, 2013). Nossos dados indicam a homeostase lipídica prejudicada e conjugada à deficiência de estrogênio, promovem uma drástica formação de NFTs, favorecendo o desenvolvimento de um quadro histopatológico semelhante ao verificado na DA (FIGURA 7J-L).

O neurópilo é uma área do tecido cerebral formada por dendritos compactados, células da glia e ramificações dos axônios e é encontrada em núcleos do sistema nervoso central e entre os corpos celulares neuronais. Porém, ainda não está claro, a nível ultraestrutural, como a arquitetura do neurópilo do cérebro, em qualquer região isolada, pode ser alterada durante o envelhecimento ou causada por estresse, ou até que ponto mudanças na morfologia dos dendritos e axônios se manifestam como alterações na conectividade sináptica.

Neste trabalho, analisamos a ultraestrutura do cérebro de animais que tiveram a menopausa induzida (OVX) e verificamos que a deficiência de estrogênio não resultou em uma alteração significativa do neurópilo (FIGURA 8B), quando comparado aos animais controle (FIGURA 8A). Animais APOEKO apresentam uma perda de neurópilo, favorecendo a formação de áreas com ausência de estruturas no cérebro (FIGURA 8C), nesses animais também foi possível observar várias regiões eletrondensas ricas em lipídios. Já em animais APOE/OVX, foi possível observar claramente que a deficiência da apoE e do estrogênio prejudicou drasticamente a estrutura do neurópilo, indicando que, nesses animais, vastas áreas cerebrais são gravemente deletadas, do ponto de vista ultraestrutural (FIGURA 8D). Em um estudo envolvendo as alterações do neurópilo de camundongos C57,

promovidas pelo envelhecimento, foi verificado que animais jovens apresentam o neurópilo mais eletrondenso, apresentando mais áreas com dendritos e axônios, ao passo que, em animais senis, essas mesmas regiões apresentam escassez significativa de neurópilo (CALI *et al.*, 2017). Nossos dados estão de acordo com o observado por Cali e colaboradores (2017) uma vez que em animais com deficiência de APOE estão relacionados ao desenvolvimento da DA e, em animais OVX, a deficiência de estrogênio está relacionada a um período pós-menopausa sendo que ambas condições estão relacionadas ao envelhecimento.

A observação das ultraestruturas cerebrais, além de ser um excelente meio para a avaliação das condições do neurópilo, também se mostrou uma muito importante para avaliação das condições das células e estruturas neuronais, como a bainha de mielina, responsável direta pela qualidade das sinapses. A desmielinização é um processo frequentemente observado na DA e pode constituir um declínio cognitivo relacionado a essa neuropatologia (ROHER *et al.*, 2002; SVENNERHOLM & GOTTFRIES, 1994; VLKOLINSKY *et al.*, 2001). Em geral, os pacientes com DA apresentam um aumento na degradação da mielina (BARTZOKIS *et al.*, 2003). Essas observações são altamente relevantes, uma vez que as aberrações e perdas mielínicas podem levar a uma falha de condutância potencial de ação, com as consequências concomitantes para a progressão do comprometimento induzido pela DA. Nossos resultados revelaram que a deficiência de estrogênio observada em animais OVX resultou em uma menor visualização de axônios, porém os que foram identificados estavam mielinizados (FIGURA 9B). Essa aparente perda axonal em animais OVX também foi observada em outros estudos (ANDERSEN *et al.*, 1999; RUITENBERG *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2014), em que foi demonstrado que uma redução dos níveis de estrogênio cerebral em mulheres na pós-menopausa pode estar associada a um risco maior de desenvolver DA em comparação com homens pareados por idade. Utilizando murinos como modelo de estudo, Moore e colaboradores (2014) estudaram a atuação do receptores de estrogênio como um agente protetor contra o processo neurodegenerativo de doenças desmielinizantes. Neste trabalho, os autores demonstraram que o aumento nos receptores de estrogênio ER β

melhora a função motora e promove a remielinização. No entanto, os efeitos da terapia de reposição hormonal na função cognitiva e no risco de DA têm sido controversos.

Ao analisarmos o cérebro de animais APOEKO além de identificarmos uma menor área de neurópilo, também foi possível observar alguns axônios em processo de desmielinização (FIGURA 9C). Diversos trabalhos envolvendo a relação dos alelos da APOE com a DA foram realizados, inclusive demonstrando que diminuição nos níveis de colesterol também pode ser benéfica na prevenção do início clínico da DA, porque os processos patológicos da DA, como a formação de placas amiloides pelos oligômeros A β , resultam em disfunção cognitiva da DA (ESPARZA *et al.*, 2013), provavelmente dependente dos níveis de colesterol nas membranas (DI SCALA *et al.*, 2013; HICKS *et al.*, 2012; HAYASHI *et al.*, 2002). Sendo assim, fatores que comprometam a homeostase lipídica podem prejudicar a manutenção da integridade das membranas celulares de oligodendrócitos e neurônios, comprometendo em uma instância maior os processos sinápticos e favorecendo o desenvolvimento de patológicas reconhecidamente desmielinizantes, como a DA.

Indubitavelmente, o papel isolado da deficiência de estrogênio e da apoE na ultraestrutura do cérebro dos animais aqui estudados apontam para um processo desmielinizante e de perda do neurópilo, fatores fundamentais para a fisiologia normal do cérebro. Esses resultados nos levaram também a estudar a ultraestrutura cerebral em animais APOEKO que foram submetidos à ovariectomia (APOEKO/OVX). Nossos resultados revelaram que além da perda evidenciada de neurópilo, poucos axônios foram encontrados e estes apresentavam um drástico processo de desmielinização e fragmentos da bainha de mielina (FIGURA 9C), quando comparado ao controle (FIGURA 9A).

A perda de massa óssea observada entre as mulheres aumenta drasticamente após a menopausa, em um período marcado por insuficiência ovariana progressiva, resultando na diminuição da concentração plasmática de hormônios sexuais femininos, como o estrogênio (RECKER *et al.*, 1992;

PARHAMI *et al.*, 2000). O estrogênio tem um papel fundamental na fisiologia das mulheres. Apesar de seu papel fundamental na reprodução, há muitos relatos apontando a ação desse hormônio no metabolismo das lipoproteínas e na formação e manutenção da massa óssea (MARJORIBANKS *et al.*, 2017; ROZENBERG *et al.*, 2013).

Embora alguns trabalhos tenham mostrado uma correlação entre a baixa DMO e o genótipo da ApoE em pacientes com osteoporose, isso ainda está sujeito a grandes controvérsias (ZAJICKOVA *et al.*, 2003; KOHLMEIER *et al.*, 1996). Neste trabalho, além de avaliarmos os efeitos no cérebro de animais OVX e APOEKO, avaliamos também as alterações ultraestruturais no osso desses animais.

A análise qualitativa por MEV das vértebras de animais OVX revelou que a deficiência de estrogênio promovido pela ovariectomia resultou em uma perda de perióstio e da integridade das bordas dos canais de Volkmann, indicando danos à estrutura óssea (FIGURA 10E-F), quando comparado à ultraestrutura dos animais WT (FIGURA 10A-C). Outros trabalhos corroboram com nossos resultados acerca dos efeitos de perda óssea em ratas ovariectomizadas (REDDY & LAKSHMANA, 2003; NETTO *et al.*, 2006) em que foi demonstrado em outras estruturas ósseas como fêmur e tíbia, o dano estrutural promovido pela deficiência de estrogênio. Um estudo recente (SHARMA *et al.*, 2018) demonstrou alterações na superfície local dos poros vasculares devido à deficiência de estrogênio em ratas ovariectomizadas. Nesse trabalho, as propriedades biomecânicas do osso foram analisadas e a porosidade vascular cortical e o risco de fraturas foram relacionados.

A apolipoproteína E (ApoE) é um componente proteico das lipoproteínas e facilita a sua depuração da circulação. Isso é confirmado pelo fenótipo de camundongos deficientes em ApoE que apresentam altos níveis de colesterol plasmático e desenvolvem espontaneamente lesões ateroscleróticas e doenças neurodegenerativas, como a DA. Embora tenha sido relatada uma associação entre certos alelos da ApoE e a DMO (KOHLMEIER *et al.*, 1998; SHIRAKI *et al.*, 1997; DICK *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2018), o fenótipo ósseo de camundongos, relacionado à ausência de apoE, não foi relatado até

o momento. A influência da apoE na massa óssea em murinos parece ainda controversa (BACHNER *et al.*, 1999; NEWMAN *et al.*, 2002; SCHILLING *et al.*, 2005). O estudo detalhado dos efeitos na ultraestrutura óssea de animais APOEKO, revelou que a deficiência da apolipoproteína-E foi um fator preponderante para alterações ultraestruturais como a perda da integridade do perióstio, formação de fossas de reabsorção óssea, deixando a superfície óssea das vértebras com nítido aspecto de porosidade (FIGURA 10G-I). Esses dados indicam que o desequilíbrio na homeostase lipídica é capaz de aumentar o processo de reabsorção óssea, através da formação das fossas de reabsorção e, ao mesmo tempo, diminuir o processo de reposição e renovação da matriz óssea, através da deterioração do perióstio. Esse desbalanço no processo de remodelamento ósseo é justamente o que caracteriza o quadro osteoporótico. Interessantemente, os mesmos alelos da APOE relacionados ao desenvolvimento da DA em diversos trabalhos (ESPARZA *et al.*, 2013; DI SCALA *et al.*, 2013; HICKS *et al.*, 2012; HAYASHI *et al.*, 2002) foram também relacionados ao desenvolvimento da osteoporose e ao risco de fraturas em um grupo de mulheres na pós-menopausa (SOUZA *et al.*, 2018).

A análise ultraestrutural dos segmentos vertebrais de animais APOEKO/OVX nos revelou que a deficiência no transportador de lipídios, associada à depleção de estrogênio promoveu uma drástica alteração na ultraestrutura das vértebras dos animais estudados. Foi possível observarmos uma gravíssima perda do perióstio, além de profundas fossas de reabsorção óssea, promovendo a deterioração da microarquitetura do esqueleto (FIGURA 10J-L). Além da visível deterioração na estrutura, vale ressaltar que durante o preparo das amostras para que fosse possível expor as unidades vertebrais, toda retirada de tecido foi feita manualmente a fim de não comprometer a estrutura com agentes corrosivos. Todos os três grupos incluindo C57 SHAM, OVX e APOEKO, a retirada de tecido camada por camada foi feita com relativa dificuldade, porém na amostra APOEKO/OVX a retirada das camadas, além de ter sido feita com extrema facilidade, boa parte das vértebras quebraram, expondo a fragilidade da estrutura óssea desses animais, ainda durante a fase de preparação. A isoforma ApoE4 tem

demonstrado estar associada à aterosclerose, DA e osteoporose (LONG *et al.*, 2004; KOHLMEIER *et al.*, 1996; HEISS *et al.*, 2008; WILSON *et al.*, 2006; SCHOFS *et al.*, 2006). A hipótese é que a variação genética no *locus* da ApoE, conhecida como E2, E3 e E4, pode modular a DMO. Até o momento, o alelo E4 tem sido associado principalmente a menor DMO e risco de fratura, embora dados recentes tenham mostrado que o APOE2 também pode diminuir a DMO em algumas populações (PLUIJIM, 2002; SNNELS, 2003; SILVA *et al.*, 2010). Alguns trabalhos demonstraram uma correlação entre o baixo DMO e o genótipo da apolipoproteína E em pacientes com osteoporose (ZAJICKOVA *et al.*, 2003; KOHLMEIER *et al.*, 1996; LONG *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2018). Em um desses trabalhos, especificamente realizado em nosso laboratório, o genótipo de um grupo de 413 mulheres com osteoporose foi analisado e os resultados revelaram que o alelo E4 está associado à osteoporose, mas somente quando associado a E2 ou E4 como segundo alelo (SOUZA *et al.*, 2018). Neste trabalho, verificamos que a ausência do gene APOE também foi capaz de desencadear um processo osteoporótico, que foi potencializado pela depleção de estrogênio, em nosso modelo de estudo.

Esses resultados foram confirmados através da qCT, onde foi possível fazer uma análise qualiquantitativa da DMO vertebral dos animais estudados neste trabalho. A partir do uso da técnica de alta tecnologia e refinamento verificamos que a DMO óssea dos animais ovariectomizados (FIGURA 11B) foi menor que a DMO dos animais WT (FIGURA 11B). De acordo com a mesma técnica, a deficiência de APOE foi ainda mais grave para a manutenção da estrutura óssea, promovendo uma menor DMO (FIGURA 11C) quando comparado aos animais controle e OVX. Interessantemente, assim como nos resultados em que a ultraestrutura das vertebrae foi analisada, foi possível determinar entre os grupos analisados, uma DMO menor nos animais APOEKO/OVX (FIGURA 11D).

A amiloidose é uma doença heterogênea que resulta da deposição de agregados proteicos fibrilares insolúveis de folhas beta em diferentes tecidos e que pode ser adquirida ou hereditária. A doença pode ser localizada em

tecidos e órgãos específicos ou sistêmica. As placas amiloides podem se acumular em diferentes tecidos como fígado, baço, rim, coração, cérebro e vasos sanguíneos, causando diferentes síndromes clínicas, incluindo cardiomiopatia, hepatomegalia, proteinúria, macroglossia, equimoses, neuropatia, insuficiência renal, hipertensão e anormalidades corneanas e vítreas. Algumas doenças podem ser caracterizadas como amiloides, dentre as quais a DA se inclui.

O acúmulo de agregados amiloides dentro e fora das células é responsável por eventos patológicos, como sobrecarga de cálcio, ruptura da membrana celular, estresse de ER, disfunção mitocondrial, defeitos em autofagia, estresse oxidativo e ativação das vias de sinalização de morte celular (ABEDINI & SCHMIDT, 2013; CAO *et al.*, 2013; CORTES *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2011; KONARKOWSKA *et al.*, 2006; RIVERA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2003).

Analisamos o fígado, rim e o fêmur para identificar uma possível presença de placas amiloides nesses tecidos, utilizando como marcador específico e altamente sensível, a TS. Nossos resultados revelaram a presença de placas amiloides nos três tecidos analisados de animais APOEKO (FIGURA 12G-I) e APOEKO/OVX (FIGURA 12J-L), indicando que a falta da apolipoproteína-E foi crucial para o desenvolvimento de placas amiloides. Embora a quantidade de agregados amiloides tenha sido aumentada em animais que além de serem knockout também eram ovariectomizadas, nossos resultados indicam que a falta de estrogênio *per se* não seja capaz de promover a formação de placas amiloides nos diferentes tecidos estudados, mas sim de potencializar o efeito produzido pela falta da apoE.

As dislipidemias são caracterizadas por perfis anormais de lipoproteínas séricas e são um fator de risco para aterosclerose (ANSELL, 2008) e doenças a ela relacionadas, como a DA. A apolipoproteína-E medeia a depuração de lipídeos séricos, como colesterol e triglicérides (HARRIS *et al.*, 2002). Camundongos com deficiência de apolipoproteína E (apoE - / -) desenvolvem hipercolesterolemia como resultado do acúmulo de remanescentes de quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa

(VLDL) e lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (PLUMP *et al.*, 1992). Embora as pesquisas atuais tenham levado a avanços significativos a respeito do desequilíbrio na homeostase lipídica, existe um grande interesse em explorar o que continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo.

Nos nossos resultados demonstraram que os animais *knockout* para o gene apoE desenvolvem acúmulo de lipídios no fígado (FIGURA 13G-I), principal local de síntese de apo-E. Alguns trabalhos relatam que em murinos APOEKO desenvolvem espontaneamente hipercolesterolemia e acúmulo de lipídios aórticos (NAKASHIMA *et al.*, 1994; D'USCIO *et al.*, 2001; PLUMP *et al.*, 1992; TAMMINEN *et al.*, 1999; CYRUS *et al.*, 1999).

Os estrogênios têm efeitos em muitos sistemas orgânicos, incluindo a regulação do metabolismo lipídico do fígado e os níveis séricos de lipoproteínas. O fígado é um local importante onde o metabolismo dos ácidos graxos, triglicerídeos e colesterol são coordenados para atender às necessidades metabólicas na fisiologia normal. Nossos resultados da avaliação da presença de lipídios no fígado de animais OVX, demonstraram que a falta de estrogênio, promoveu um acúmulo de lipídio no órgão analisado (FIGURA 13F) quando comparado ao fígado de animais controle (FIGURA 13A-C). Outros estudos indicaram que o tratamento com estrogênio após a ovariectomia foi capaz de minimizar o impacto da dislipidemia nos murinos analisados (PALMISANO *et al.*, 2017).

Ao serem analisados os fígados de animais APOEKO/OVX verificamos a presença de grande quantidade de lipídios quando comparados aos outros grupos estudados (FIGURA 13J-L), indicando mais uma vez que a depleção de estrogênio foi capaz de potencializar os efeitos produzidos pela deficiência de apolipoproteína –E, dessa vez, associada a acúmulo de lipídios no fígado.

Nossos resultados reúnem um novo conjunto de dados em que animais APOEKO/OVX fornecem não apenas um modelo prático para o estudo da DA e osteoporose, mas um excelente modelo para os padrões de doenças metabólicas associadas ao envelhecimento.

5.2 SEÇÃO II: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM MODELOS DE ESTRESSE POR TBT

A denominação organometálico se dá pelo poder de associação covalente do metal com o átomo de carbono, o que lhe confere a propriedade de solubilidade em solventes apolares (NORMAN, 1978). Dentre os organometálicos mais comumente utilizados, pode-se destacar o tributilestano (TBT) devido sua ampla utilização industrial na composição de materiais plásticos, pesticidas, tintas, produtos químicos farmacêuticos, entre outros.

O estanho pode ser encontrado no ambiente aquático, na ordem de aproximadamente 3 toneladas por quilômetro cúbico de água, o que faz desse metal um importante contaminante dos sistemas aquáticos e de todos os níveis tróficos envolvidos.

Estudos envolvendo os efeitos do estanho no organismo se fazem de extrema relevância uma vez que sua ampla utilização e seus potenciais efeitos no organismo humano, são ainda incipientes. Uma vez inserido no sistema biótico, o TBT pode ser degradado, parcialmente excretado ou, ainda, incorporado no organismo, alterando sua fisiologia e conseqüentemente, o seu correto funcionamento. Componentes tóxicos são potencialmente capazes de se acumular em alguns órgãos e tecidos como hepático, renal, cerebral, adiposo e ósseo, tornando esses tecidos pontos estratégicos de bioacumulação.

A partir de nossos resultados, ao utilizarmos como ferramentas de análise tecnologias de ponta para avaliarmos os efeitos do TBT na ultraestrutura no osso em modelos animais, foi possível trazer luz aos efeitos desse organometal no metabolismo ósseo.

O metabolismo ósseo é um recurso importante para manter a homeostase extracelular de Ca^{2+} , Pi e Mg^{2+} em mamíferos. Diversos trabalhos têm mostrado que o chamado "metabolismo mineral" é regulado principalmente pelo hormônio paratireoídiano - PTH (SOUZA *et al.*, 2018; BARSTOW, 2017)

e os metabólitos ativos do calciferol, como a vitamina D₃ (ANDERSON, 2017; STURGEON *et al.*, 2017). No entanto, outros hormônios desempenham papéis importantes no metabolismo ósseo, bem como estrogênio (E2), hormônio da tireoide e glicocorticoides (PIKE *et al.*, 2017; ANDERSON, 2017; BARSTOW, 2017; PAVONE *et al.*, 2017). Recentemente, vários xenobióticos têm sido associados a disfunções da função endócrina; portanto, estes têm sido chamados de compostos disruptores endócrinos, dentre esses inclui-se o TBT.

Através de pesquisas recentes desenvolvidas em nosso laboratório, demonstrou-se que o TBT exibiu muitos efeitos deletérios nas glândulas cardiovasculares, reprodutivas e também nas hipófise-hipotálamo dependentes (MERLO *et al.*, 2016; COUTINHO *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2017; BERTULOSO *et al.*, 2015; RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2016; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2012; SENA *et al.*, 2017). Observamos que, pelo menos nas fêmeas, os efeitos tóxicos do TBT podem estar associados à expressão do receptor de estrogênio alfa (ER α) (COUTINHO *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2017; BERTULOSO *et al.*, 2015). ER α é a principal isoforma expressa em células ósseas, especialmente osteoblastos (PAVONE *et al.*, 2017; ROONEY *et al.*, 2017), o estrogênio inibe a ativação do remodelamento ósseo, mais provavelmente através dos osteoclastos. Os efeitos diretos do estrogênio no osso incluem a indução da apoptose de osteoclastos e a inibição da formação de osteoclastos. Além desses efeitos diretos sobre os osteoclastos, o estrogênio também parece regular a inibição da apoptose de osteoblastos e aumentar a expectativa de vida dos osteoblastos (KOUSTENI *et al.*, 2001).

Assim, nos parece claro que a deficiência de estrogênio induzida pelo TBT parece afetar a manutenção da integridade óssea. Uma vez que a falta de produção de estrogênio em mulheres após a menopausa é a principal causa de osteoporose neste grupo específico (ESHARGHIAN *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017). Apesar de um artigo publicado por Baker e colaboradores (2015) mostrar que o TBT prejudica a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (modelo *in vitro*): nada foi encontrado sobre os efeitos do TBT

no osso até o momento. Com o objetivo de lançar luz na falta de conhecimento neste campo relativamente novo da endocrinologia, usamos técnicas de estado da arte padrão-ouro, com tecnologia de ponta para investigar o papel do TBT no metabolismo mineral e ósseo em um modelo animal bem estabelecido pelo nosso grupo.

Neste trabalho, relatamos que mesmo doses baixas de TBT (100 ng/kg/dia) por 15 dias (MERLO *et al.*, 2016; COUTINHO *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2017; BERTULOSO *et al.*, 2015) levaram a alterações no metabolismo ósseo e mineral. As medições por DXA mostraram que as ratas adultas tratadas com TBT exibiram uma DMO 30% maior (180 mg/cm²) do que os seus controles (142 mg/cm², FIGURA 14).

Por outro lado, uma vez que o estanho se acumula em muitos órgãos, seguimos a hipótese de que este metal pode estar deslocando cátions bivalentes dos ossos. De fato, em resultados obtidos em nosso laboratório foi verificado um aumento significativo de Sn no soro de animais tratados com TBT - como esperado (TABELA 1) - que levou a um aumento de 2 vezes desse metal pesado nos ossos deste grupo quando comparado aos controles (dados não mostrados). Embora os níveis de Sn encontrados nos ossos de animais tratados com TBT fossem muito menores do que os utilizados por Baker e colaboradores (2015), o efeito pode ser plausível, pois a quantidade de tecido ósseo (1 vértebra, mais ou menos 1 mg) deve ser multiplicado pelo peso total do esqueleto para estimar o total de estanho retido no osso de animais tratados com TBT.

Testes de uranálise e soro foram realizados em nosso laboratório (RESGALA *et al.*, 2019), em busca dos principais biomarcadores do metabolismo mineral e ósseo. A atividade da Fosfatase Alcalina (AP) sérica foi determinada em todas as amostras através de análise espectrofotométrica da reação do ponto final, um método padrão usado em laboratórios clínicos (Bioclin, Vitória, Brasil). As concentrações de cálcio plasmático e urinário (total e ionizado), fósforo e creatinina foram determinadas colorimetricamente também pelos kits fornecidos pela Bioclin, seguindo o protocolo do fabricante. A análise da osteocalcina sérica (OC), Fosfatase Alcalina (AP) e Deoxipiridinolinas (DPD)

urinárias foi determinada pelo teste de ELISA fornecido pela Metra Bioscience (Metra Bioscience, EUA - 16), seguindo o protocolo do fabricante. Tanto o plasma quanto o cálcio urinário (Ca^{2+}), fósforo (Pi), magnésio e creatinina foram determinados no Laboratório de Química Clínica do Hospital Universitário Antônio Cassiano de Moraes (HUCAM) através de métodos padronizados (Bioclin, Vitoria, Brasil).

No entanto, quando medimos Ca^{2+} , Mg^{2+} e Pi no soro e urina desses animais, os dados foram conflitantes. Observamos que os ratos tratados com TBT apresentaram tanto aumento do débito urinário de Ca^{2+} quanto aumento na relação Ca^{2+} /creatinina (TABELA 1), o que indicaria o contrário. Mesmos efeitos foram observados nas mesmas medidas de Mg^{2+} e Pi. Esses dados controversos foram ainda mais estranhos, uma vez que o único parâmetro iônico mineral sérico significativamente alterado no soro foi o Pi ($11,8 \pm 0,8$ para o tratamento com TBT vs. $7,7 \pm 0,5$ para o controle, $p = 0,038$). Enquanto o Ca^{2+} ionizado não foi alterado. Contudo, sabemos que o TBT nestas condições danifica severamente tanto o fígado como os rins (COUTINHO *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2017; BERTULOSO *et al.*, 2015), locais de síntese do metabólito ativo da vitamina D, 1α , (OH_2) vitamina D3 (PIKE *et al.*, 2017; ANDERSON, 2017). Assim, nossos resultados indicam que o estresse organoestânico altera severamente o metabolismo funcional.

Estes últimos dados sugerem duas coisas, de acordo com o artigo anterior publicado pelo nosso grupo: 1) Primeiro, a hiperfosfatemia deve ser devido à maior taxa de filtração de Pi, uma vez que houve uma diminuição simultânea no Pi plasmático e aumentou na massa urinária de Pi; 2) O efeito do PTH deve ser minimizado, uma vez que é o principal hormônio responsável pela secreção de Pi no túbulo proximal, e podemos ver se a razão Pi/creatinina foi diferente entre os grupos tratados com TBT e controle. Em conjunto, essas hipóteses favorecem o papel do efeito deletério do TBT na DMO, podendo estar associado ao eixo PTH - Vitamina D. Nosso grupo mostrou que não apenas o teor mineralizado da matriz óssea poderia ser alterado nas fêmeas pela ação do estrogênio (E2); portanto, os disruptores dos efeitos do E2 devem ter ações profundas no tecido ósseo (PODRATZ *et al.*, 2015; MERLO

et al., 2016; COUTINHO *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2017; BERTULOSO *et al.*, 2015; RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2016; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2012; SENA *et al.*, 2017). Para tentar conciliar os dados bioquímico com os de DXA, determinamos o tecido ósseo mineralizado e macio usando microCTScan. A FIGURA 16 revelou que os animais tratados com TBT (FIGURA 16 D-G) exibiram mais tecidos moles (matriz orgânica imagens cinza claro nas suas vértebras) do que os controles (FIGURA 16A-C). Estas imagens, portanto, indicaram que há muito menos osso mineralizado em ratos tratados com TBT, embora o osso remanescente seja mais denso do que aqueles encontrados em animais controle.

Os resultados obtidos com qCT (FIGURA 16) foram claramente antagônicos quando comparados aos resultados obtidos através da técnica de DXA (FIGURA 14). Nosso grupo de pesquisa analisou a dosagem de Sn em vértebras ósseas de ossos secos de ambos os grupos. Vértebras descalcificadas e não desmineralizadas de ratos tratados com TBT exibiram um teor de Sn 10 vezes maior quando comparadas aos controles (34 ± 5 ppm/g de tecido/g de animal para TBT Animais tratados versus $2,3 \pm 5$ ppm/g de tecido/g de animal para animais controle).

Tomando todos esses resultados em conjunto, é plausível que, pelo menos Sn^{2+} possa estar competindo em algum nível com Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} na mineralização ou na formação da microarquitetura da matriz óssea. Se isso for verdade, esse fato poderia explicar por que a atividade osteoblástica permanece normal, enquanto que a excreção urinária de DPD/creatinina é elevada em animais com TBT, parecendo haver nesses animais uma maior reabsorção óssea.

Para verificar as condições ultraestruturais da matriz, usamos Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para examinar a morfoestrutura óssea. Recentemente, temos estudado o papel de hormônios e outras moléculas na ultraestrutura óssea em modelos murinos usando tanto o microCTScanning quanto o DXA, juntamente a métodos histoquímicos, moleculares e bioquímicos clássicos (SOUZA *et al.*, 2017; DE SIQUEIRA *et al.*, 2012; SOILVA *et al.*, 2000).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) vem consolidando a compreensão da matriz óssea durante os estágios osteopênicos/osteopóricos que não podem ser vistos *in vivo* com a mesma nitidez através de qCT, densitometria e situações de alterações genéticas específicas. Neste trabalho, observamos que a anatomia macroscópica através de MEV (escala de 2 mm) nos animais tratados com TBT já apresentam uma deterioração do tecido cartilaginoso fora das vértebras ósseas (n=3, FIGURA 15D-F) quando comparados ao grupo controle (FIGURA 15A-C). A análise em microescala de osso compacto externo de ratos tratados com TBT (FIGURA 15D) revelou que a espessura da matriz óssea de ratos tratados com TBT exibiram diminuição quando comparadas aos controles (respectivamente, FIGURAS 15D e 15A). Além disso, os canais de Volkmann dentro de ossos compactos pareciam ser mais frágeis e desestruturados também. Análises em maiores aumentos da matriz óssea mostraram um drástico defeito na ultraestrutura da matriz óssea que corroborou os achados de alta atividade osteoclástica evidenciada por maior excreção urinária de DPD/creatinina.

Portanto, nossos dados sugerem três possíveis explicações para os danos ultraestruturais do TBT no tecido ósseo. Primeiro, porque as disfunções do fígado e rins já relatadas pelo nosso grupo (COUTINHO *et al.*, 2016; BERTULOSO *et al.*, 2015), o eixo PTH - vitamina D pode ser interrompido em algum momento. Outra hipótese plausível é que o Sn está sendo trocado por Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} na própria matriz óssea de alguma forma levando ao comprometimento da estrutura e formação óssea ou, como Baker e colaboradores (2015) demonstraram, desregular a diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos levando a um balanço de tendências reabsorção óssea, em vez de formação. Outra hipótese é a de que o 27-hidroxicolesterol, um metabólito do colecalciferol, proposto por He & Nelson (2017), pode atuar de forma adjuvante com o TBT no E2 protetor no osso levando à inativação e apoptose de osteoblastos, portanto, menor formação óssea.

No entanto, todas as três possibilidades estão sendo exploradas neste momento pelo nosso grupo. Independentemente da hipótese a ser

confirmada, parece-nos claro que o estresse induzido pelo TBT altera, de forma severa, a manutenção da massa mineral óssea, induzindo a osteoporose precoce, sendo, portanto, um importante fator ambiental relacionado a essa doença.

6. CONCLUSÃO

As doenças de ordem metabólica podem ter origem a partir do processo natural de envelhecimento celular ou serem desencadeadas a partir de agentes promotores de estresse. Dentre as principais doenças relacionadas ao envelhecimento, foram destaque, neste trabalho, a DA e a osteoporose. A partir de estudos ultraestruturais, revelamos que, *a priori*, os danos provocados pela falta da apolipoproteína-E no cérebro, tais como a formação de emaranhados neurofibrilares (NTF's), placas amiloides, ativação da neurógliã, arterosclerose, quebra da barreira hematoencefálica e perda de neurópilo, foram potencializados quando a ausência da apo-E estava associada a falta de estrogênio, nos animais estudados. Nossos resultados demonstraram que os danos ultraestruturais no cérebro de modelos da DA, foram potencializados pela depleção de estrogênio. Além disso, foram identificados danos mais graves na microarquitetura óssea, resultado de um grave processo osteoporótico, quando a deficiência da apoE fora combinada à deficiência de estrogênio (OVX), quando comparado aos demais grupos. Verificamos que em animais modelos de DA (APOEKO) houve um acúmulo de lipídios no fígado e que esse acúmulo foi potencializado pela deficiência estrogênica. Sendo assim, concluímos que em modelos da DA, os danos ultraestruturais promovidos pela deficiência da apoE, foram potencializados pela depleção de estrogênio. Além disso, nosso trabalho reúne um novo conjunto de dados, demonstrando que os danos promovidos pela deficiência da apoE, combinados aos danos promovidos pela deficiência de estrogênio, resultaram no desenvolvimento de uma importante doença metabólica, a amiloidose.

Nossos resultados acerca do estudo de doenças metabólicas geradas por estresse por TBT, revelaram que este organometal promove drásticos danos na microarquitetura óssea, semelhantes à osteoporose, comprovando os efeitos negativos no metabolismo ósseo promovidos pelo organoestanho.

Nossos dados sugerem três possíveis hipóteses para os efeitos deletérios do TBT no tecido ósseo. Primeiro, as disfunções do fígado e dos rins já relatadas pelo nosso grupo, em que o eixo PTH - vitamina D pode ser

interrompido em algum momento. Outra hipótese plausível é que o Sn está sendo trocado por Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} nos ossos e isso de alguma forma leva ao comprometimento da formação óssea ou, ainda, como Baker e colaboradores (2015) demonstraram, parece desregular a diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos, levando a um balanço de tendências para reabsorção óssea, em vez de formação. Outra hipótese é a de que o 27-hidroxicolesterol, um metabólito do colecalciferol, como proposto por He e Nelson (2017), pode atuar em efeito adjuvante com TBT no E2 protetor em ossos levando à inativação dos osteoblastos e apoptose, portanto, menor formação óssea. Não obstante, todas as três possibilidades estão sendo exploradas neste momento pelo nosso grupo.

O estudo ultraestrutural de doenças metabólicas relacionadas ao envelhecimento, como osteoporose e doença de Alzheimer, além de doenças metabólicas relacionadas ao estresse, como intoxicação por TBT, parece-nos ser mais uma área promissora para contribuição científica, no sentido de auxiliar na prevenção e diagnóstico dessas e de outras doenças de ordem metabólica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, PD (2009) Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. **Mol. Cell.**; 36:2–14.

ALIMANOVIC-ALAGIC, R. (2010) Evaluation of Risk Factors for Osteoporosis in Postmenopausal Women. **Mater Sociomed.** 22(3): 157-61.

AMMANN, P; RIZZOLI, R; BONJOUR, JP (1997) Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 99, no. 7, pp. 1699–1703.

ANDERSEN, K; LAUNER, LJ; DEWEY, ME; LETENNEUR, L; OTT, A; COPELAND, JR; DARTIGUES, JF; KRAGH-SORENSEN, P; BALDERESCHI, M; BRAYNE, C; LOBO, A; MARTINEZ-LAGE, JM; STIJNEN, T; HOFMAN, A (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. **EURODEM Incidence Research Group. Neurology**; 53:1992–7.

ANSELL, BJ (2008) Hyperlipidaemia and cardiovascular disease. **Curr Opin Lipidol.**;19:433–434.

AUSTAD, S (2001) Concepts and theories of aging. In: Ma-soro E, Austad S., eds. *Handbook of the Biology of Aging*. 5th ed. San Diego, CA: **Academic Press**; p. 3-22.

BACHNER, D; SCHRODER, D; BETAT, N; AHRENS, M; GROSS, G (1999) Apolipoprotein E (ApoE), a Bmp-2 (bone morphogenetic protein) upregulated gene in mesenchymal progenitors (C3H10T1/2), is highly expressed in murine embryonic development. **Biofactors**; 9(1):11-7

BALABAN, R; NEMOTO, S; FINKEL, T (2005) Review mitochondria, oxidants, and aging. **Cell** ; 120:483-495.

BALCH, WE; MORIMOTO, RI; DILLIN, A; KELLY, JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. **Science** 319: 916–919.

BALCOMBE, N; SINCLAIR, A (2001) Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**; 15:835-849

BARTZOKIS, G; CUMMINGS, JL; SULTZER, D; HENDERSON, VW; NUECHTERLEIN, KH; MINTZ, J (2003) White matter structural integrity in healthy aging adults and patients with Alzheimer disease: A magnetic resonance imaging study. **Arch Neurol**; 60: 393–398.

BECKMAN, K; AMES, B (1998) The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**; 78:547-581.

BEN-ZVI, A; MILLER, EA; MORIMOTO, RI (2009) Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. **Proc Natl Acad Sci USA** 106: 14914–14919.

BLACKBURN, EH (1997) The telomere and telomerase: Nucleic acid – protein complexes acting in a telomere homeostasis system. A review. **Biochemistry**, 62 (11): 1196- 1202.

BOYLE, WJ; SIMONET, WS; LACEY, DL (2003) “Osteoclast differentiation and activation,” **Nature**, vol. 423, no. 6937, pp. 337–342.

BREUIL, V; TICCHIONI, M; TESTA, J (2010) Immune changes in post-menopausal osteoporosis: The Immunos Study. **Osteoporosis International**. vol. 21, no. 5, pp. 805–814, 2010.

BUKAU, B; WEISSMAN, J; HORWICH, A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. **Cell** 125: 443–451.

CAL`IC; WAWRZYNIAK, M; BECKER, C; MACO, B; CANTONI, M; JORSTAD, A (2018) The effects of aging on neuropil structure in mouse somatosensory cortex—A 3D electron microscopy analysis of layer 1. **PLoS ONE** 13(7): e0198131

CAMPISI, J (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. **Annu. Rev. Physiol.**; 75:685–705.

CASTELLANO, JM; KIM, J; STEWART, FR (2011) Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. **Sci Transl Med**; 3:89ra57.

CECH, TR (1994) Chromosome end games. **Science**. 266: 387-388.

CHAPMAN, PM; LEWIS, AG; CROWDER, AA; FLETCHER, WK; IMBER, B; LUOMA, SN; STOKES, PM; WINFREY, M (1988) Biologically available metal in sediments. **National Research Council Canada**, vol. 1, 52 - 56.

CHEN, Y; ZUO, Z; CHEN, S; YAN, F; CHEN, Y; YANG, Z (2008) Reduction of spermatogenesis in mice after tributyltin administration. **Toxicology**; 51:21–7.

CLARK, SL; TEH, SJ; HINTON, DE (2000) Tissue and cellular alterations in Asian clam (*Potamoecorbula amurensis*) from San Francisco Bay: Toxicological indicators of exposure and effect? **Mar Environ Res** 50:301–5.

COOPER, C; CAMPION, G; MELTON, LJ (1992) Hip fractures in the elderly: a world- wide projection. **Osteoporosis Int.**; 2(6):285–289

COSMAN, F; DE BEUR, SJ; LEBOFF, MS; (2014) Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.*; 25(10): 2359–2381.

COXON JP (2004). Advances in the use of bisphosphonates in the prostate cancer setting. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases** 7, 99–104.

CRISTOFALO, VJ; GERHARD, GS; PIGNOLO, RJ (1994) Molecular biology of aging. **Surg. Clin. North Am.**, 74: 1-21.

D'USCIO, LV; BAKER, TA; MANTILLA, CB; SMITH, L; WEILER, D; SIECK, GC; KATUSIC, ZS (2001) Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**;21:1017–1022.

DAVID, DC; OLLIKAINEN, N; TRINIDAD, JC; CARY, MP; BURLINGAME, AL; KENYON, C (2010). Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. **PLoS Biol** 8, 23.

DELGADO FILHO, VC; MANCINI, CN; SILVA IV; PEDROSA, DF; DESTEFANI, AC; SAMOTO, YM; TAKYA CM; GRACELI, JB (2010) Endocrine Disruption Induced by Triorganotin (iv) Compounds: Impacts in the Reproductive and Genetic Function. **Journal of Medical Genetics and Genomics**, v.2, p. 29-37.

DELGADO FILHO, VS; LOPES, PFI; PODRATZ, PL; GRACELI, JB. (2011) Triorganotin as a Compound with Potential Reproductive Toxicity in Mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 44, p. 958-965.

DICK, IM; DEVINE, A; MARANGOU, A; DHALIWAL, SS; LAWS, S; MARTINS, RN; PRINCE, RL (2002) Apolipoprotein E4 is associated with reduced calcaneal quantitative ultrasound measurements and bone mineral density in elderly women. **Bone**; 31(4):497-502

DOBSON, CM (2003) Protein folding and misfolding. **Nature** 426: 884–890.

EGHBALI-FATOURECHI, G; KHOSLA, S; SANYAL, A; BOYLE, WJ; LACEY, DL; RIGGS, BL (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women, **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 111, no. 8, pp. 1221–1230.

ERNST, DN; HOBBS, MV; TORBETT, BE; GLASEBROOK, AL; REHSE, MA; BOTTOMLY, K; HAYAKAWA, K; HARDY, RR; WEIGLE, W (1990) Differences in the expression profiles of CD45RB, Pgp-1, and 3G11 membrane antigens and in the patterns of lymphokine secretion by splenic CD4⁺ T cells from young and aged mice. **J. Immunology**, 145 (5): 1295-1302.

FARRER, LA; CUPPLES, LA; HAINES, JL (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. **JAMA**; 278(16):1349Y1356.

FASSBENDER, K; SIMONS, M; BERGMANN, C; STROICK, M; LUTJOHANN, D; KELLER, P (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides abeta 42 and abeta 40 in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA.**; 98(10):5856-61

FELIZZOLA, JF (2005) Especificação de compostos butílicos de estanho em sedimentos superficiais da Baía de Todos os Santos. **Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.**

FENT, K (1996) Ecotoxicology of Organotin Compounds. **Critical Reviews in Toxicology**; 26(1): 1-117

FINCH, CE (1994) Longevity, Senescence, and the Genome. **Chicago: University of Chicago Press.**

FONG, TC; MAKINODAN, T (1989) In situ hybridization analysis of the age-associated decline in IL-2 mRNA expressing murine T cells. **Cellular Immunology**, 118: 199- 207

GODOI A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M (2003) Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 708-716.

GOUKASSIAN, D; GAD, F; YAAR, M; ELLER, MS; NEHAL, US; GILCHREST, BA (2000) Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. **FASEB J.**, 14: 1325-1334.

GUARENTE, L (1999) Mutant mice live longer. **Nature**. 402: 243-245.

GUARENTE, L; KENYON, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. **Nature**, 408: 255-262.

GUTHRIE, JR; EBELING, PR; DENNERSTEIN, L (2000) Risk factors for osteoporosis: prevalence, change, and association with bone density. **Medscape Womens Health** 5: E2.

HAROLD D, ABRAHAM R, HOLLINGWORTH P, SIMS R, GERRISH A, HAMSHERE ML, PAHWA JS, MOSKVINA V, DOWZELL K, WILLIAMS A, et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet.**; 41:1088–1093.

HARRIS, JD; SCHEPELMANN, S; ATHANASOPOULOS, T; GRAHAM, IR; STANNARD, AK; MOHRI, Z; HILL, V; HASSALL, DG; OWEN, JS; DICKSON, G (2002) Inhibition of atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice

following muscle transduction with adeno-associated virus vectors encoding human apolipoprotein-E. **Gene Ther.**; 9:21–29.

HART, RW; SETLOW, RB (1974) Correlation between deoxyribonucleic acid excision repair and lifespan in a number of mammalian species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 71 (6): 2169-2173

HARTL, FU; BRACHER, A; HAYER-HARTL, M (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature** 475: 324–332.

HARTL, FU; HAYER-HARTL, M (2002) Protein folding—molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science** 295, 1852–1858.

HAYFLICK, L (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. **Biochemistry**, 62 (11): 1180- 1190.

HAYFLICK, L; MOORHEAD, PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.**; 25:585–621.

HEISS, C; HOESEL, LM; WEHR, U (2008) Diagnosis of osteoporosis with vitamin K as a new biochemical marker. **Vitam Horm** 78:417–433.

HOCH, M (2001) Organotin compounds in the environment—an overview. **Appl Geochem**; 16:719–43.

HOLLOSZY, JO, SCHECHTMAN, KB (1991) Interactions between exercise and food restriction: effects on longevity of male rats. **J. Appl. Physiol.** 70: 1529-1535.

HUGGETT, RJ; KIMERLE, RA; MEHRLE JR, PM; BERGMAN, HL (1992) Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. **Boca Raton, Fla.:** Lewis. 346 p.

ISHIKAWA, T; SAKURAI, J (1986) In vivo studies on age dependency of DNA repair with age in mouse skin. **Cancer Research**, 46 (3): 1344-1348.

ITAHANA, K; DIMRI, G; CAMPISI, J (2001) Regulation of cellular senescence by p53. **Eur. J. Biochem.** 268: 2784-2791.

JARRETT, JT; BERGER, EP; LANSBURY, PT (1993) The carboxy terminus of the beta-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation—implications for the pathogenesis of alzheimer's-disease. **Biochemistry**; 32: 4693–4697.

JOHNSON, F; SINCLAIR, D; GUARENTE, L (1999) Molecular biology of aging review. **Cell**; 96:291-302.

JOHNSON, SA; FINCH, CE (1996) Changes in gene expression during brain aging: A survey. In E.L. Schneider e J.W. Rowe (Eds.) **Handbook of the Biology of Aging.** San Diego: Academic Press, Inc., 300-327.

- JOHNSTON JR, CC; SLEMENDA, CW (1995) Pathogenesis of osteoporosis. **Bone**, V.17, p.19-22.
- JUNQUEIRA, LCCJ. (2008) Tecido ósseo. In: Koogan G, editor **Histologia Básica**. 11a edição ed; p. 108-26.
- KANIS, JA; JOHANSSON, H; ODEN, A (2004) A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. **Bone**, vol. 35 (5), pp. 1029–1037.
- KANISAND, JA; JOHNNELL, O (2005) Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. **Osteoporosis International**, vol. 16 (3), pp. 229–238.
- KIM, J; BASAK, JM; HOLTZMAN, DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **Neuron** 63:287–303.
- KIM, J; YOON, H; HORIE, T (2015) microRNA-33 regulates ApoE lipidation and amyloid-beta metabolism in the brain. *J Neurosci*; 35:14717–14726.
- KIM, YE; HIPPEL, MS; BRACHER, A; HAYER-HARTL, M; HARTL, FU (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. **Annu Rev Biochem** 82, 323–355.
- KIMBLE, RB; SRIVASTAVA, S; ROSS, FP; MATAYOSHI, A; PACIFICI, R (1996) Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1- and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 271, no. 46, pp. 28890–28897.
- KIMBLE, RB; VANNICE, JL; BLOEDOW, DC (1994) Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats, **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 93, no. 5, pp. 1959–1967.
- KIVIPELTO, M; HELKALA, EL; HANNINEN, T; LAAKSO, MP; HALLIKAINEN, M; ALHAINEN, K (2001) Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: a population-based study. **Neurology**.; 56(12):1683-9.
- KOHLMEIER, M; SALOMON, A; SAUPE, J; SHEARER, MJ (1996) Transport of vitamin K to bone in humans. **J Nutr**.; 126:1192S– 1196S.
- KOHLMEIER, M; SAUPE, J; SCHAEFER, K; ASMUS, G (1998) Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. **Calcif Tissue Int**; 62 (3), 278-281
- KOLDAMOVA, R; FITZ, NF; LEFTEROV, I (2014) ATP-binding cassette transporter A1: from metabolism to neurodegeneration. **Neurobiol Dis**; 72:13–21.
- KUILMAN, T; MICHALOGLOU, C; MOOI, WJ; PEEPER, DS (2010) The essence of senescence. **Genes Dev**.; 24:2463–2479.

- KUIPERS, F; LIN, Y; HAVINGA, R; BLOKS, V; VERKADE, HJ; JONG, MC; HOFKER, MH; MOSHAGE, H; VAN VLIJMEN, BJM; VONK, RJ; HAVEKES, LM (1997) **J. Clin. Invest.** 100, 2915–2922.
- KURENOVA, EV; MASON, JM (1997) Telomere functions. A review. **Biochemistry**, 62 (11): 1242-1253.
- LAMBERT JC, HEATH S, EVEN G, CAMPION D, SLEEGERS K, HILTUNEN M, COMBARROS O, ZELENKA D, BULLIDO MJ, TAVERNIER B, et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet.**; 41:1094–1099.
- LAMBERT, B; RINGBORG, U; SKOOG, L (1979) Age-related decrease of ultraviolet light-induced DNA repair synthesis in human peripheral leucocytes. **Cancer Research**, 39 (7): 2792-2795.
- LAMBETH, J. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Imm**; 4:181-189.
- LEVIN, ER (2001) Invited review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. **J. Appl. Physiol.** 91: 1860-1867.
- LI, R; CUI, J; SHEN, Y (2014) Brain Sex Matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease. **Mol Cell Endocrinol.** 389(0): 13–21.
- LITHGOW, GJ (1996) Molecular genetics of *Caenorhabditis elegans* aging. In E.L. Schneider e J.W. Rowe (Eds.) **Handbook of the Biology of Aging**. San Diego: Academic Press, Inc., 55-73.
- LITHGOW, GJ; KIRKWOOD, TB (1996) Mechanisms and evolution of aging. **Science**, 273: 83.
- LIU, X; KOHYAMA, T; KOBAYASHI, T (2003) Cigarette smoke extract inhibits chemotaxis and collagen gel contraction mediated by human bone marrow osteoprogenitor cells and osteoblast-like cells. **Osteoporosis International**, vol. 14, no. 3, pp. 235–242.
- LONG, J; LIU, P; LIU, Y (2004) APOE haplotypes influence bone mineral density in Caucasian males but not females. **Calcif Tissue Int** v.75:299–304.
- LÓPEZ-OTIN, C; BLASCO, MA; PARTRIDGE, L; SERRANO, M; KROEMER, G (2013) The hallmarks of aging. **Cell.** 153:1194–1217.
- LUDGATE, JW (1987) Economic and technological impact of TBT legislation on the USA marine industry. **Proc Ocean Int Work Conf**; 4:1309–13.
- MACKAY, WJ; ORR, WC; BEWLEY, GC (1990) Genetic and molecular analysis of antioxidant enzymes in *Drosophila melanogaster*: A correlation between catalase activity levels, life span, and spontaneous mutation rate. In C.E. Finch, T.E. Johnson (Eds.) **Molecular Biology of Aging**. New-York:

Wiley-Liss, 157-170.

MAHLEY, RW; RALL, SCJr (2000) Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 1:507–537

MAHLEY, RW; WEISGRABER, KH; HUANG, Y (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103:5644 –5651.

MALINS, DC; OSTRANDER, GK (1994) Aquatic toxicology molecular biochemical and cellular perspectives. **Lewis publishers**, 1-2.

MANAHAM, SE (1991) Water Pollution Environmental Chemistry, **Lewis Publishers, First Edition**, 155.

MANAHAM, SE (1991) Water Pollution Environmental **Chemistry, Lewis Publishers, First Edition**, 155.

MANOLAGAS, C; JILKA, RL (1995) Mechanisms of disease: bone marrow, cytokines, and bone remodeling—emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis,” **The New England Journal of Medicine**, vol. 332, no. 5, pp. 305–311, 1995.

MARJORIBANKS, J; FARQUHAR, C; ROBERTS, H (2017) Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev** (1):CD004143.

MARTIN, GM; HOEHN, H; NORWOOD, TH (1980) Genetic, development and gerontological aspects of disease. In R.B. Hil & M.F. LaVia (Eds.) **Principles of Pathobiology**. New York: Oxford University Press, 287-347.

MARX, J (1994) Chromosome ends catch fire. **Science**. 265: 1656-1658.

MASSEY, HM; FLANAGAN, AM (1999) “Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes,” **British Journal of Haematology**, vol. 106, no. 1, pp. 167–170.

MAYEUX, R; SAUNDERS, AM; SHEA, S (1998) Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. **N Engl J Med**; 338(8):506Y511.

MCALLISTER, BG; KIME, DE (2003) Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat Toxicol**; 5:309–16.

MELLO, MSC; DELGADO, IF; FAVARETO, APA; LOPES, CMT; BATISTA, MM; KEMPINAS, WDG (2014) Sexual maturation and fertility of mice exposed

to triphenyltin during prepubertal and pubertal periods. **Toxicol Rep**; 2:405–14.

MILLER, RA (1994) The Biology of Aging and Longevity. In W.R. Hazzard, E.L. Bierman, J.P. Blass, W. Ettinger Jr, J.B.Halter (Eds.) **Principles of Geriatric Medicine and Gerontology**. Londres: McGraw-Hill, Inc., 3-18.

MITRA, S; SRIVASTAVA, A; KHANDELWAL, S (2017) Long term impact of the endocrine disruptor tributyltin on male fertility following a single acute exposure. **Environ Toxicol**. 32(10):2295–304.

MOHAMED, EI; TARANTINO, U; PROMENZIO, L; DELORENZO, A (2003) Predicting bone mineral density of postmenopausal healthy and cirrhotic Italian women using age and body mass index. **Acta Diabetologica**, vol. 40, supplement 1, pp. S23–S28.

MOTA, MP (2003) Influência genética e estocástica no fenômeno de envelhecimento: Repercussões do nível de actividade física no estresse oxidativo e na longevidade em *Drosophila melanogaster*. **Dissertação de Doutorado**. UTAD, Vila Real.

MU, J; WEI, LX (2002) Telomere and telomerase in oncology. **Cell Research**, 12 (1): 1-7.

MUNOZ, J; DERSTINE, A; GOWER, BA (2002) Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement. **Obes Res** 10, 424–431.

MYERS, MS; MOORE, MJ (1994) Pathobiology of Chemical-Associated Neoplasia in Fish, **Aquatic Toxicology**, 329 - 330.

NAKASHIMA, Y; PLUMP, AS; RAINES, EW; BRESLOW, JL; ROSS, R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arterioscler Thromb**;14:133–140.

NEWGARD, CB; SHARPLESS, NE. (2013) Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. **J. Clin. Invest.**; 123:946–950.

NEWMAN, P; BONELLO, F; WIERZBICKI, AS; LUMB, P; SAVIDGE, GF; SHEARER, MJ (2002) The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: Role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. **J Bone Miner Res.**; 7(3):426-33.

ONAL, M; XIONG, J; CHEN, X (2012) Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss, **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 287, pp. 29851–29860.

ORR, WC; SOHAL, RS (1994) Extension of life-span by overexpression of

superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. **Science**. 263: 1128-1130

PARHAMI, F; GARFINKEL, A; DEMER, LL (2000) Role of lipids in osteoporosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; 20:2346–2348.

PETER, I; CROSIER, MD; YOSHIDA, M, et al. (2011) Associations of APOE gene polymorphisms with bone mineral density and fracture risk: a meta-analysis. **Osteoporos Int** 22(4):1199– 1209.

PLUIJIM, SMF (2002) Effects of gender and age on the association of apolipoprotein E4 with bone mineral density, bone turnover and the risk of fractures in older people. **Osteoporos Int** 13:701–709.

PLUMP, AS; SMITH, JD; HAYEK, T; ALTO-SETALA, K; WALSH, A; VERSTUYFT, JG; RUBIN, EM; BRESLOW, JL (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**;71:343–353

PODRATZ, PL; MERLO, E; SENA, GC; MOROZESK, M; BONOMO, MM; MATSUMOTO, ST (2015) Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reprod Toxicol**; 57:29–42.

PODRATZ, PL; MERLO, E; SENA, GS; MORZESK, M; BONOMO, MM; *ET AL.* (2015) Accumulation of Organotins in Seafood Leads to Reproductive Tract Abnormalities in Female Rats. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)** v. 6(1), p. 71-79.

POIRIER, J (2003) Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. **Trends Mol Med.**; 9(3):94-101.

POLYMEROPOULOS, MH; LAVEDAN, C; LEROY, E; IDE, SE; DEHEJIA, A; DUTRA, A; PIKE, B; ROOT, H; RUBENSTEIN, J; BOYER, R; (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science** 276, 2045–2047.

POWERS, ET; MORIMOTO, RI; DILLIN, A; KELLY, JW; BALCH, WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **Annu Rev Biochem** 78: 959–991.

QUARFORDT, SH; OSWALD, B; LANDIS, B; XU, HS; ZHANG, SH; MAEDA, N (1995) **J. Lipid Res.** 36, 1227–1235.

RECKER, R; DAVIES, KM; HINDERS, SM (1992) Bone gain in young adult women. **JAMA** 268(17):2403.

RIGGS, BL; KHOSLA, S; MELTON III, LJ (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine Reviews**, vol. 23, no. 3, pp. 279–302.

ROBINSON, LJ; YAROSLAVSKIY, BB; GRISWOLD, RD (2009) "Estrogen inhibits RANKL-stimulated osteoclastic differentiation of human monocytes through estrogen and RANKL-regulated interaction of estrogen receptor- α with BCAR1 and Traf6," **Experimental Cell Research**, vol. 315, no. 7, pp. 1287–1301.

ROBLING, AG; CASTILLO, AB; TURNER (2006) CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. **Annu Rev Biomed Eng**; 8:455-498.

ROHER, AE; WEISS, N; KOKJOHN, TA; KUO, YM; KALBACK, W; ANTHONY, J; WATSON, D; LUEHRS, DC; SUE, L; WALKER, D; EMMERLING, M; GOUX, W; BEACH, T (2002) Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. **Biochemistry**; 41: 11080–11090.

ROZENBERG, S; VANDROMME, J; ANTOINE, C (2013) Postmeno- pausal hormone therapy: risks and benefits. **Nat Rev Endocrinol** 9:216–227.

RUITENBERG, A; OTT, A; VAN SWIETEN, JC; HOFMAN, A; BRETELER, MM (2001) Incidence of dementia: does gender make a difference? **Neurobiol Aging**; 22:575–80.

SAMBROOK, P; COOPER, C (2006) Osteoporosis. **Lancet**. 367(9527): 2010–2018.

SANTOS-SILVA, AP; ANDRADE, MN; PEREREIRA-RODRIGUES, P; PAIVAMELO, FD; SOARES, P; GRACELI, JB; MIRANDA ALVES, L. (2016) Frontiers in Endocrine Disruption: Impacts of Organotin on the Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 31, p. 1.

SARKAR, DK; HENTGES, S; DE, A; REDDY, R (1998) Hormonal control of pituitary prolactin-secreting tumors. **Frontiers in Bioscience**, 3: d934-d943.

SCHOFS, MWCJ; KLIFT, M; HOFMAN, A (2004) ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam Study. **J Bone Miner Res.**; 19(9):1490– 1499.

SENA, GC; FREITAS-LIMA, LC; MERLO, E; PODRATZ, PL; DE ARAÚJO, JFP; BRANDÃO, PAA (2017) Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic–pituitary–gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. **Toxicol Appl Pharmacol**; 319:22–38.

SENA, GC; FREITAS-LIMA, LC; MERLO E; PODRATZ, PL; DE ARAÚJO, JFP; BRANDÃO, PAA; *ET AL.* (2017) 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. 2, p. 1.

SHAWKY, S; EMONS, H (1998) Distribution Pattern of Organotin Compounds at Different Trophic Levels of Aquatic Ecosystems. **Chemosphere**; vol. 36, 523-535.

SHEA, B; WELLS, G; CRANNEY, A (2007) WITHDRAWN: calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, no. 3.

SHINOHARA M, PETERSEN RC, DICKSON DW, BU G. (2013) Brain regional correlation of amyloid-beta with synapses and apolipoprotein E in non-demented individuals: potential mechanisms underlying regional vulnerability to amyloid-beta accumulation. **Acta Neuropathol.**; 125:535–547.

SHIRAKI, M; SHIRAKI, Y; AOKI, C; HOSOI, T; INOUE, S; KANEKI, M; OUCHI, Y (1997) Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. **J Bone Miner Res.**; 12(9):1438-45.

SILVA, IV; REZENDE, LC; LANES, SP (2010) Evaluation of PvuII and XbaI polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (ESR1) in relation to menstrual cycle timing and re-productive parameters in postmenopausal women. **Maturitas** 67(4):363–367.

SNNELS, HP (2003) Association between polymorphisms of apolipoprotein E, bone mineral density of the lower forearm, quantitative ultrasound of the calcaneus and osteoporotic fractures in postmenopausal women with hip or lower forearm fracture. **Scand J Clin Lab Invest** 63(4):247–258.

SNNELS, HP (2003) Association between polymorphisms of apolipoprotein E, bone mineral density of the lower forearm, quantitative ultrasound of the calcaneus and osteoporotic fractures in postmenopausal women with hip or lower forearm fracture. **Scand J Clin Lab Invest** 63(4):247–258.

SOHAI, RS; SOHAL, BH; ORR, WC (1995) Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. **Free Rad. Biol. Med.** 19: 499-504.

SOLERTE, S; CRAVELLO, L; FERRARI, E; FIORAVANTI, M (2009) Overproduction of IFN- γ and TNF- α from natural killer (NK) cells is associated with abnormal NK reactivity and cognitive derangement in Alzheimer's disease. **Ann NY Acad Sci.**;917:331-40.

SONNTAG, WE; LYNCH, CD; CEFALU, WT; INGRAM, RL; BENNETT, SA; THORNTON, PL; KHAN, AS (1999) Pleiotropic effects of Growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: Inferences from moderate caloric-restricted animals. **J. Gerontology (Biol. Sci.)**. 54A. 12: B521-B538.

SOUZA, LS; ROCHETTE, NF; PEDROSA, DF; MAGNAGO, RPL; FILHO, TBF; VIEIRA, FLH; FIN, ICF; EIS, SR; GRACELI, JB; RANGEL, LBA; SILVA,

IV (2018) Role of APOE Gene in Bone Mineral Density and Incidence of Bone Fractures in Brazilian Postmenopausal Women. **Journal of Clinical Densitometry: Assessment & Management of Musculoskeletal Health**, 21: 227-235.

SPENCER, M; MOORE, SM; KHALAJ, AJ; KUMAR, S; WINCHESTER, Z; YOON, J; YOO, T; MARTINEZ-TORRES, L; YASUI, N; KATZENELLENBOGEN, JA; TIWARI-WOODRUFF, SK (2014) Multiple functional therapeutic effects of the estrogen receptor β agonist indazole-Cl in a mouse model of multiple sclerosis. **PNAS**. 111: 8061–18066.

STANLEY JR., TR; SMITH., GJ; HOFFMAN, DDJ; HEINZ, GH; ROSSCOE, R (1996) Effects of boron and selenium on mallard reproduction and duckling growth and survival. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1124 –1132.

SVENNERHOLM, L; GOTTFRIES, CG (1994) Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). **J Neurochem**; 62: 1039–1047.

TANAKA, S; TAKAHASHI, N; UDAGAWA, N (1993) Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors, **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 91, no. 1, pp. 257–263.

TCHKONIA, T; ZHU, Y; VAN DEURSEN, J; CAMPISI, J; KIRKLAND, JL (2013) Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. **J. Clin. Invest.**; 123:966–972.

TERRY, LC, HALTER, JB (1994) Aging of the endocrine system. In W.R. Hazzard, E.L. Bierman, J.P. Blass, W. Ettinger Jr, J.B.Halter (Eds.) **Principles of Geriatric Medicine and Gerontology**. New York: McGraw-Hill, Inc., 791-805.

VERGHESE, PB; CASTELLANO, JM; HOLTZMAN, DM (2011) Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. **Lancet Neurol** 10: 241–252.

VILLEMAGNE, VL; BURNHAM, S; BOURGEAT, P; (2013) Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. **Lancet Neurol**;12(4):357Y367.

VLKOLINSKY, R; CAIRNS, N; FOUNTOULAKIS, M; LUBEC G (2001) Decreased brain levels of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase in Down syndrome and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**; 22: 547–553.

VON BALLMOOS, C; BRUNNER, J; DIMROTH, P (2004) The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. **PNAS**, vol. 101 (31): 11239–11244

WALFORD, RL (1969) The immunological theory of aging. **Stanford: Williams & Wilkins.**

WALTHER, DM; KASTURI, P; ZHENG, M; PINKERT, S; VECCHI, G; CIRYAM, P; MORIMOTO, RI; DOBSON, CM; VENDRUSCOLO, M; MANN, M; HARTL, FU (2015) Widespread proteome remodeling and aggregation in aging *C-elegans*. **Cell** 161, 919–932.

WELLS, CL (1991) Women, Sport & Performance: A physiological perspective. **Champaign, IL: Human Kinetics.**

WICKNER, S; MAURIZI, MR; GOTTESMAN, S (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. **Science** 286: 1888–1893.

WILSON, PW; SCHAEFER, EJ; LARSON, MG; ORDOVAS, JM (1996) Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta analysis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 16:1250–1255.

WISE, PM; KRAJNAK, KM; KASHON, ML (1996) Menopause: the aging of multiple pacemakers. **Science**. 273: 67-70.

WONG, SYS; LAU, EMC; LI, M; et al. (2005) The prevalence of ApoE4 genotype and its relationship to bone mineral density in Hong Kong Chinese. **J Bone Miner Metab** 23:261– 265.

YARIBEYGI, Y; PANAHI, Y; SAHRAEI, H; JOHNSTON, TP; SAHEBKAR, A (2017) He impact of stress on body function: a review **EXCLI Journal**;16:1057-1072.



ZAJICKOVA, K; ZOFKOVÁ, I; HILL, M (2003) Apolipoprotein E4 allele is associated with low bone density in postmenopausal women. **J Endocrinol Invest** 26(4):312–315.

ZERBI, V; WIESMANN, M; Emmerzaal, TL; JANSEN, D; VAN BEEK, M; MUTSAERS, MPC; BECKMANN, CF; HEERSCHAP, A; KILIAAN, AJ (2014) **The Journal of Neuroscience**, 34(42):13963–13975.

ZHANG, SH; REDDICK, RL; PIEDRAHITA, JA; MAEDA, N (1992) **Science** 258, 468–471.

8. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO CEUA

O uso de todos modelos animais nesta pesquisa, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais (CEUA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 047/2010, relativo ao projeto de pesquisa intitulado “Papel do tributilestano na função reprodutiva: estudos ecofisiológicos e pré-clínicos usando modelos animais”, que tem como responsável o (a) docente **Jones Bernardes Graceli**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 17/12/2010. Este certificado expira-se em 30/12/2015.

Prof. Dr. Margarida Ribeiro Molyssés
Presidente do CEUA/UFES

Vitória (ES), 22 de dezembro de 2010.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CELUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Múltiplas disfunções teciduais em camundongos ApoEKO +APP /PEN1+Klotho submetidos a insuficiência ovariana", Protocolo nº.02/2016, sob a responsabilidade de Neuza Félix Gomes Rochette 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" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES "ad referendum"em 21-03-2016.

Vigência do Projeto	Início: Abril/2016 Término:dezembro/2018
Espécie/Linhagem	Camundongos C57Black 6(Mus musculus)
Nº de Animais	Experimento Piloto:30 Protocolo Experimental:112 Total:142
Peso/Idade	Peso: 15g Idade:4 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 21 de março de 2016.

ANEXO I

**EFFECTS OF TRIBUTYLTIN (TBT) ON RAT BONE AND MINERAL
METABOLISM**

Effects of Tributyltin (TBT) on rat bone and mineral metabolism

Ludmilla C. Resgala¹, Higor S. Santana¹, Bruna S. de Mendonça¹, Maria Victoria S. Zanovello¹, Yara M. Santos¹, Charles S. da Costa¹, Nicolle E. Bicudo¹, Priscila L. Podratz¹, Raphael R. Calixto¹, Honerio C. de Jesus², Maura da Cunha³, Andre L. Oliveira⁴, Leandro C. Freitas Lima¹, Neuza F. Gomes-Rochette¹, Leticia B. Rangel⁵, Jones B. Graceli⁶, Ian V. Silva¹

¹Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo, Brazil, ²Department of Chemistry, Federal University of Espírito Santo, Brazil, ³Bioscience and Biotechnology Center, State University of Norte Fluminense, Brazil, ⁴State University of Norte Fluminense, Brazil, ⁵Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Espírito Santo, Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Endocrinology

Specialty Section:
Experimental Endocrinology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
343079

Received on:
26 Feb 2018

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

ANEXO II

**VITAMIN K SUPPLEMENTATION MODULATES BONE
METABOLISM AND ULTRA-STRUCTURE OF
OVARIECTOMIZED MICE**

Original Paper

Vitamin K Supplementation Modulates Bone Metabolism and Ultra-Structure of Ovariectomized Mice

Leticia Batista Azevedo Rangel^{1,2,3,4} Daniel de Siqueira^{5,6}
 Olivia do Rosário Soares^{7,8} Higor Scardini Santana⁹ Emilio de Castro Miguel⁹
 Maura da Cunha⁹ Andre Lacerda de Abreu Oliveira⁹ Diego França Pedrosa¹⁰
 Ludmilla Carvalho Rangel Resgala^{11,12} Helder Azevedo Rangel Neto⁹
 Neuza Felix Gomes-Rochette⁹ Sérgio Ragi Eis⁹ Jones Bernardes Graceli^{13,14}
 Ian Victor Silva^{15,16}

¹Aging Cell Biology Laboratory, Department of Morphology, UFES, Vitória, ²Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (UFES/RENORBIO), Health Sciences Center, UFES, Vitória, ³Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Department of Physiological Sciences, Health Sciences Center, UFES, Vitória, ⁴Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Human Cancer, Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, UFES, Vitória, ⁵Laboratory of Cell Biology, Biotechnology Center, UENF, Campos dos Goytacazes, ⁶Centro Universitário Redentor (UNIRENATOR), Itaperuna, ⁷Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES), Vitória, ⁸Laboratory of Endocrinology and Cellular Toxicology, Department of Morphology, Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Department of Physiological Sciences, Health Sciences Center, UFES, Vitória, Brazil

Key Words

Ovariectomized • Vitamin K • Bone Mineral Density • Bone Microarchitecture • Mineral Metabolism