

**EXPOSIÇÃO DO TRIBUTILESTANHO E UMA DIETA COM ALTO
TEOR DE CARBOIDRATOS REFINADOS LEVA A ANORMALIDADES
METABÓLICAS E REPRODUTIVAS, PIORANDO
CARACTERÍSTICAS DA FALÊNCIA OVARIANA EM RATAS**

Jordana Fernandes Zanol de Oliveira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória ES, janeiro de 2022

Jordana Fernandes Zanol de Oliveira

**EXPOSIÇÃO DO TRIBUTILESTANHO E UMA DIETA COM ALTO
TEOR DE CARBOIDRATOS REFINADOS LEVA A ANORMALIDADES
METABÓLICAS E REPRODUTIVAS, PIORANDO
CARACTERÍSTICAS DA FALÊNCIA OVARIANA EM RATAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli.

Programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória ES, janeiro de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado da candidata JORDANA FERNANDES ZANOL DE OLIVEIRA, intitulada "EXPOSIÇÃO DO TRIBUTILESTANHO E UMA DIETA COM ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS REFINADOS LEVA A ANORMALIDADES METABÓLICAS E REPRODUTIVAS, PIORANDO CARACTERÍSTICAS DA FALÊNCIA OVARIANA EM RATAS", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, a candidata cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 19 de janeiro de 2022.

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Orientador

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Titular interno

Prof. Dr. Leandro Ceotto Freitas Lima

(Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Science)
Titular externo

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

O48e Oliveira, Jordana Fernandes Zanol de, 1987-
Exposição do tributilestanho e uma dieta com alto teor de carboidratos refinados leva a anormalidades metabólicas e reprodutivas, piorando características da falência ovariana em ratas / Jordana Fernandes Zanol de Oliveira. - 2022.
84 f. : il.

Orientador: Jones Bernardes Graceli.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Dieta rica em carboidratos (HCD). 2. Hipertrofia de adipócitos. 3. Hormônio anti-mülleriano (AMH). 4. Hormônio folículo estimulante (FSH). 5. Insuficiência ovariana prematura (IOP). 6. Tributilestanho (TBT). I. Graceli, Jones Bernardes. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

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

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

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada aos meus pais, Rosimar e Emanuel.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **Deus**, pois eu não seria capaz de atingir nenhum objetivo em minha vida se não fosse da sua vontade, por renovar a fé e a minha perseverança mesmo diante dos obstáculos encontrados na minha caminhada.

A minha família, em especial, aos meus pais **Rosimar e Emanuel**, que com muita dificuldade sempre investiram muito nos meus estudos e me possibilitaram a mudança de rumo da minha carreira profissional, quando decidi reduzir o meu ritmo de trabalho para retornar a vida acadêmica. Agradeço por todo o amor, carinho e valores passados, tudo contribuiu para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. **Mãe**, você é a minha melhor pessoa!!! Gostaria de agradecer aos demais familiares por compreenderem a minha ausência em muitas das reuniões familiares, principalmente durante os períodos de tratamentos dos animais e durante as épocas de provas, qualificação e agora na entrega da dissertação. Em especial, gostaria de agradecer a minha prima-irmã **Fernanda**, que além de ser uma pessoa em quem eu me inspiro, sempre esteve presente e disposta a me ajudar nos momentos de necessidades.

Ao meu namorado **Matheus**, primeiramente pela amizade e companheirismo durante todo o decorrer do mestrado, sofremos muito juntos, mas também nos divertimos e estudamos muito. E de forma mais especial, gostaria de agradecer por todo amor, carinho, cuidado e compreensão nesses 2 anos de namoro. Obrigada pelo seu abraço, por suas piadinhas e por se fazer tão presente na minha vida!

Aos poucos amigos que me restaram depois de uma vida dedicada a plantões e ao mestrado. Meu agradecimento especial a **Juliana** e ao **Kelinson**, que mesmo com a distância sempre se fizeram tão presentes e me incentivaram a não desistir dos meus sonhos. Aos meus amigos do mestrado, gostaria de deixar meu agradecimento a todos os colegas que iniciaram no mestrado comigo em 2019/1, a nossa troca sempre foi muito verdadeira. Em especial, gostaria de agradecer a minha amiga **Thais**, a pessoa que se tornou mais próxima de mim, um ser humano sem igual, de uma bondade infinita, sempre ao meu lado com uma palavra de carinho e incentivo.

Aos amigos do **Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular (LETC)** por me acolherem e me ensinarem tudo sobre a rotina do laboratório, experimentos e disciplinas, mas principalmente por dividirem um pouco do seu dia a dia comigo. Aos IC's, **Flávia, Gabriela, Karine, Natália, Thalita, Jeanine, Tiago e Kayke**, obrigada pelo apoio, pela ajuda nos experimentos e pela nossa boa convivência. Aos doutorandos **Eduardo, Charles e Oscar** por terem sido toda a minha base e referência no laboratório, nada seria possível sem a ajuda e o companheirismo de vocês, o ombro amigo, os direcionamentos e os ensinamentos. Obrigada também pelos bons momentos de descontração e pela amizade.

A **todos os professores** do programa de Ciências Fisiológicas, obrigada por dividirem um pouco do seu conhecimento e experiência de vida. Todos contribuíram muito para minha formação.

A **Raquel**, por ser tão atenciosa e cuidadosa com os alunos do laboratório, por sempre estar disposta a nos ajudar e auxiliar na elaboração dos projetos, na escrita e na revisão dos trabalhos. Obrigada também pelas palavras de conforto e incentivo.

Ao professor **Jones**, pela oportunidade de ser sua aluna de mestrado, pela confiança, pelos seus ensinamentos e por sua disponibilidade. Obrigada pela ajuda na escrita dos artigos e por sua amizade e compreensão.

Aos **Laboratórios Multiusuários de Histologia Molecular e Imuno-histoquímica, e ao Laboratório Multiusuário de Histotécnicas** os técnicos envolvidos, em especial, a **Viviane**.

Ao **Biotério Central da UFES**, a todos os seus funcionários, em especial ao **Rodolpho**.

As **Ratas** que deram suas vidas para que esse trabalho fosse executado.

A **UFES, CAPES, FAPES e CNPQ** pelo apoio financeiro.

"Se você não gosta do seu destino, não aceite. Em vez disso, tenha a coragem de mudá-lo do jeito que você quer que seja."

Naruto Uzumaki

RESUMO

A exposição a somente um destes obesogênicos, o tributilestanho (TBT) ou a dieta rica em carboidratos (HCD) por si só, podem causar obesidade e complicações reprodutivas, como as características de insuficiência ovariana prematura (IOP). No entanto, pouco se sabe sobre as interações entre o TBT e a HCD, e os efeitos da exposição combinada na reprodução. Neste estudo, avaliamos se a exposição aguda ao TBT combinado a HCD resulta em irregularidades reprodutivas e metabólicas. Ratas *Wistar* foram tratadas com TBT (100 ng / kg / dia) e alimentadas com HCD por 15 dias e os resultados metabólicos e reprodutivos foram avaliados. Os grupos experimentais TBT e HCD exibiram comprometimentos metabólicos, como aumento da adiposidade, perfil lipídico anormal, alteração no índice de triglicérides e glicose (TYG), e hipertrofia de adipócitos em ratas HCD-TBT. Essas consequências metabólicas foram associadas a distúrbios reprodutivos. Especificamente, o grupo HCD-TBT exibiu irregularidades no ciclo estral, aumento nos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH), redução nos níveis de hormônio anti-mülleriano (AMH), redução na reserva ovariana e no número de corpos lúteos (CL), com aumento no número de folículos atrésicos, sugerindo que a exposição combinada de HCD-TBT exacerbou as características da IOP. Além disso, fortes correlações negativas foram observadas entre a hipertrofia dos adipócitos e a reserva ovariana, o número de CL e os níveis de AMH. A exposição combinada ao HCD-TBT ainda resultou em inflamação do trato reprodutivo e fibrose. Coletivamente, esses dados sugerem que a exposição do TBT combinado a HCD leva a anormalidades metabólicas e reprodutivas, exacerbando as características da IOP em ratas *Wistar*.

Palavras-chave: Dieta rica em carboidratos (HCD); Hipertrofia de adipócitos; Hormônio anti-mülleriano (AMH); Hormônio folículo estimulante (FSH); Insuficiência ovariana prematura (IOP) e Tributilestanho (TBT).

ABSTRACT

Exposure to only one of these obesogenics, tributyltin (TBT) or the high carbohydrate diet (HCD) alone, can cause obesity and reproductive complications such as the features of premature ovarian failure (IOP). However, little is known about the interactions between TBT and HCD, and the effects of combined exposure on reproduction. In this study, we evaluated whether acute exposure to TBT combined with HCD results in reproductive and metabolic irregularities. Wistar female rats were treated with TBT (100 ng/kg/day) and HCD for 15 days, metabolic and reproductive outcomes were evaluated. The TBT and HCD experimental groups exhibited metabolic impairments, such as increased adiposity, abnormal lipid profile, alteration in the triglyceride and glucose (TYG) index, and adipocyte hypertrophy in HCD-TBT rats. These metabolic consequences have been associated with reproductive disorders. Specifically, the HCD-TBT group exhibited irregularities in the estrous cycle, increased levels of follicle-stimulating hormone (FSH), reduced levels of anti-mullerian hormone (AMH), reduced ovarian reserve and the number of corpora lutea (CL), with an increase in the number of atresic follicles, suggesting that the combined exposure to HCD-TBT exacerbated the characteristics of IOP. Furthermore, strong negative correlations were observed between adipocyte hypertrophy and ovarian reserve, CL number and AMH levels. Combined exposure to HCD-TBT further resulted in reproductive tract inflammation and fibrosis. Collectively, these data suggest that combined TBT exposure to HCD leads to metabolic and reproductive abnormalities, exacerbating the features of IOP in Wistar female rats.

Keywords: Adipocyte hypertrophy; Anti-Mullerian Hormone (AMH); Follicle Stimulating Hormone (FSH); High Carbohydrate Diet (HCD); Premature Ovarian Failure (IOP) and Tributyltin (TBT).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eixo Hipotálamo-hipófise-ovário.....	20
Figura 2: Representação esquemática da foliculogênese e dos estádios foliculares.....	21
Figura 3: Esteroidogênese no folículo ovariano.....	25
Figura 4: Variações hormonais e esfregaço vaginal das quatro fases do ciclo estral.....	27
Figura 5: Estrutura química do cloreto de TBT.....	31
Figura 6: Parâmetros metabólicos	44
Figura 7: Morfologia dos adipócitos do TAB.....	47
Figura 8: Avaliação do ciclo Estral.....	48
Figura 9: Morfologia dos ovários e desenvolvimento folicular	51
Figura 10: Análise morfométrica do útero.....	53
Figura 11: Inflamação no trato reprodutivo.....	56
Figura 12: Densidade de matriz extracelular no trato reprodutivo.....	57
Figura 13: Correlações 1.....	58
Figura 14: Correlações 2.....	59
Figura 15: Correlações 3.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação do peso dos órgãos.....	45
Tabela 2: Perfil lipídico.....	45
Tabela 3: Níveis dos hormônios sexuais.....	49
Tabela 4: Morfometria dos folículos ovarianos.....	52
Tabela 5: Correlação entre marcadores metabólicos e características semelhantes a IOP.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AMH	Hormônio anti-mülleriano
An	Folículo antral
At	Folículo atrésico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cis	Folículo Cístico
CL	Corpo lúteo
CON	CON
CYP11A1	Membro 1 da subfamília A da família 19 do citocromo P450
CYP19A1	Membro 1 da subfamília A da família 19 do citocromo P450
D	Diestro
DIO	Dieta indutora de obesidade
E	Estro
E2	Estradiol
EDCs	Desreguladores endócrinos
EL	Epitélio Lumial
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
End	Endométrio
EPM	Erro padrão da média
EPA-EUA	Agência de proteção ambiental- Estados Unidos da América
ER-α	Receptor de estrogênio alfa
ER-β	Receptor de estrogênio beta
FSH	Hormônio folículo-estimulante

GE	Glândulas endometriais
GPGR	Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCD	Dieta de alto carboidrato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H&E	Hematoxilina e eosina
HPO	Hipotálamo-pituitária-ovário
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IOP	Insuficiência ovariana prematura
L	Lúmen
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LOAEL	Nível do Menor Efeito Observado
M	Metaestro
M-D	Metaestro-Diestro
Myo	Miométrio
NOAEL	Nível de Efeito Adverso Não Observado
Oo	Oócito
OMS	Organização mundial de saúde
OTs	Organoestânicos
P4	Progesterona
P450	Citocromo P450
P	Proestro
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ
PVC	Cloreto de polivinila

RI	Resistencia Insulínica
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RP	Receptor de progesterona
Sn	Estanho
StaR	Proteína reguladora aguda esteroideogênica
T	Testosterona
TAB	Tecido adiposo branco
TAP	Tecido adiposo parametrial
TAPV	Tecido adiposo perivesical
TARP	Tecido adiposo retroperitoneal
TBT	Tributilestanho
TSI	Teste de sensibilidade a insulina
TTG	Teste de tolerância a glicose
TYG	Produto dos níveis de triglicerídeos e glicose em jejum
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 OBESIDADE: ETIOLOGIA E COMORBIDADES	18
1.2 A OBESIDADE E O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO	19
1.3 A FOLICULOGÊNESE OVARIANA	20
1.4 ESTEROIDOGÊNESE OVARIANA	23
1.5 CICLO ESTRAL	26
1.6 PREJUÍZOS NA FUNÇÃO OVARIANA CAUSADOS PELA OBESIDADE.....	27
1.7 MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR UMA DIETA (DIO).....	28
1.8 O DESREGULADOR ENDÓCRINO TBT	29
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAS E MÉTODOS	36
4.1 DIETA COM ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS (HCD)	36
4.2 TRATAMENTO COM TRIBUTILESTANHO (TBT)	36
4.3 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	36
4.4 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL	37
4.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG) E TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA (TSI).....	37
4.6 PESO DOS ÓRGÃOS	38
4.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS HORMONAIS E PERFIL LIPÍDICO.....	38
4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	39
4.8.1 HISTOMORFOMETRIA DO TAP, OVÁRIOS E ÚTERO.....	39
4.8.2 AVALIAÇÃO DE MASTÓCITOS	40
4.8.3 AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	40
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1 AVALIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS, DE GORDURA E ADIPOSIDADE	42
5.2 METABOLISMO DE GLICOSE ANORMAL NO GRUPO HCD-TBT.....	43
5.3 PERFIL LIPÍDICO ANORMAL NOS ANIMAIS DO GRUPO HCD-TBT.....	43
5.4 ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA NOS ADIPÓCITOS DO GRUPO HCD-TBT	45

5.5 AUMENTO DO NÚMERO DE MASTÓCITOS DO TAP NO GRUPO HCD-TBT	46
5.6 AUMENTO DA DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTACELULAR DO TAP NO GRUPO HCD-TBT.....	46
5.7 O GRUPO HCD-TBT APRESENTOU ANORMALIDADES NO CICLO ESTRAL.....	46
5.8 AUMENTO DOS NÍVEIS DE FSH E DIMINUIÇÃO DA TESTOSTERONA E AMH NO GRUPO HCD-TBT	49
5.9 AVALIAÇÃO DA RESERVA FOLICULAR OVARIANA.....	50
5.10 EXPOSIÇÃO COMBINADA DE HCD-TBT PIOROU A RESERVA FOLICULAR OVARIANA E O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR	50
5.11 EXPOSIÇÃO COMBINADA DE HCD-TBT PREJUDICA MORFOLOGIA UTERINA	52
5.12 GRUPO HCD-TBT APRESENTOU INFLAMAÇÃO DO TRATO REPRODUTIVO..	54
5.13 EXPOSIÇÃO COMBINADA DE HCD-TBT CONTRIBUI PARA O AUMENTO NA DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR NO TRATO REPRODUTIVO	54
5.14 CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES METABÓLICOS, CARACTERÍSTICAS SEMELHANTES A IOP E OUTRAS ANORMALIDADES REPRODUTIVAS	54
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS	68
9 ANEXOS	82
9.1 CERTIFICADO CEUA.....	82
9.2 ARTIGO VINCULADO A DISSERTAÇÃO.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE: ETIOLOGIA E COMORBIDADES

A obesidade é uma doença classificada como uma inflamação crônica de baixo grau e se encontra no grupo das doenças crônicas não transmissíveis, sendo crescente a sua prevalência global. Ao redor do mundo, 1,9 bilhão de adultos estão acima do peso e 650 milhões estão obesos (OMS, 2016). Neste panorama, a obesidade tornou-se um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (FRIEDMAN, 2009; SADOWSKA; GĘBCZYŃSKI; KONARZEWSKI, 2017).

A obesidade é uma doença de etiologia multifatorial, pois se desenvolve a partir de uma combinação de diferentes e complexos fatores, por meio da interação entre os fatores genéticos e os hábitos comportamentais alterados. (GROSS et al., 2004; MATARESE; LA CAVA, 2005; SADOWSKA; GĘBCZYŃSKI; KONARZEWSKI, 2017).

Nos últimos 20 anos, o número de obesos triplicou, fato que pode estar relacionado às mudanças nos hábitos de vida, adquiridas durante esse período. Dentre os fatores que podem levar a obesidade, podemos citar o aumento do consumo de alimentos de maior aporte energético, como carboidratos (HOSSAIN; KAWAR; EL NAHAS, 2007) e a exposição a poluentes ambientais, em especial, aos desreguladores endócrinos de efeito obesogênico, como o tributilestano (TBT) (JANESICK; BLUMBERG, 2011). A projeção para 2025, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é de que teremos no mundo 2,3 bilhões de pessoas com excesso de peso e 700 milhões com obesidade (OMS, 2016).

A obesidade pode ser observada a partir de uma adiposidade excessiva que pode ser prejudicial à saúde do indivíduo (FRIEDMAN, 2004). Tal doença pode ser definida como uma inflamação crônica de baixo grau, na qual identificamos alterações metabólicas desencadeadas e residentes no tecido adiposo branco (TAB) (BOURLIER; BOULOUmie, 2009).

Todavia, a obesidade pode ser apontada como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas (FRIEDMAN, 2004; HASLAM; JAMES, 2005; MATARESE; LA CAVA, 2005) e reprodutivas (AYE et al., 2014; SALIHU, 2011). A obesidade pode afetar quase todos os sistemas orgânicos, desde o sistema cardiovascular ao sistema endócrino, o sistema nervoso central e o sistema gastrointestinal (BISCHOFF et al., 2017).

1.2 A OBESIDADE E O SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

Em situações fisiológicas, o eixo hipotálamo-pituitária-ovário (HPO) controla diretamente o mecanismo de reprodução e fertilidade em mamíferos do gênero feminino. A sua regulação se dá, a partir da produção e liberação em pulsos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo núcleo arqueado do hipotálamo, que por meio do sistema porta hipotalâmico-hipofisário, ao atingir a hipófise anterior, regula a síntese e liberação das gonadotrofinas: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Estes hormônios, por sua vez, atuam nos ovários, ajustando o processo de maturação dos gametas (oogênese) e a produção dos hormônios sexuais (andrógenos, estrógenos e progesterona). Eles também são responsáveis pela manutenção da estrutura glandular. O controle do eixo através do feedback negativo possibilita a modulação das etapas de síntese e liberação destes hormônios e, conseqüentemente, suas ações locais e sistêmicas (BULUN; ADASHI, 2010). Além dos ovários, o sistema reprodutor feminino é composto anatomicamente pela vagina, cérvix, útero, tubas uterinas, que são classificados como órgãos internos, enquanto a vulva é considerada a genitália externa feminina (DANGELO; FATTINI, 2007). Todo este aparato anatômico é capaz de prover um ambiente favorável e essencial para o processo reprodutivo, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário (KOBAYASHI; BEHRINGER, 2003).

A obesidade tem um efeito negativo no potencial reprodutivo, principalmente devido à alteração funcional do eixo HPO. A obesidade normalmente provoca um aumento nos níveis de insulina em fêmeas, a alta concentração de insulina é um estímulo conhecido para o aumento na produção de androgênio ovariano (RACHÓN; TEEDE, 2010).

Podemos observar que a obesidade está diretamente relacionada a prejuízos na função reprodutiva, por causar alterações no desenvolvimento folicular ovariano, na esteroidogênese ovariana e no ciclo estral (BAZZANO et al., 2015; DE ARAÚJO et al., 2018; NTEEBBA; GANESAN; KEATING, 2014). Para um melhor entendimento dessas alterações é necessária uma compressão mais aprofundada de como esses processos ocorrem em sua maneira fisiológica no organismo, sendo assim nos próximos tópicos serão abordadas a foliculogênese e esteroidogênese ovariana, e o ciclo estral.

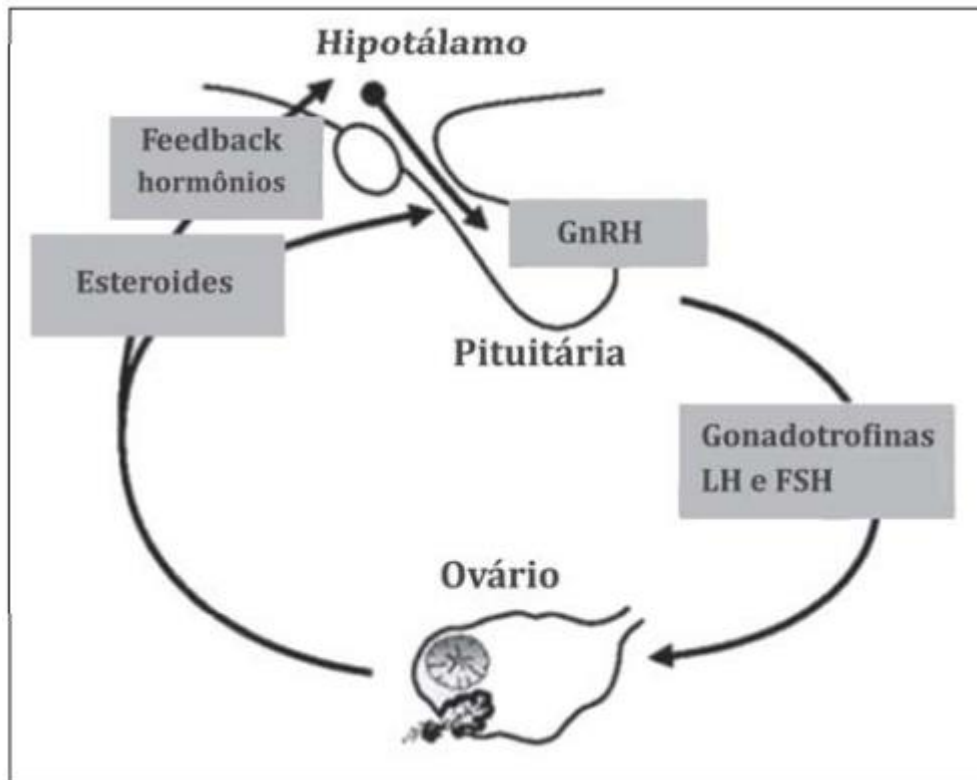


Figura 1: Eixo hipotálamo-hipófise-ovário (OLIVEIRA et al., 2016).

1.3 A FOLICULOGÊNESE OVARIANA

É chamado de foliculogênese o processo de formação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos, que ocorre desde a formação do folículo primordial, ainda na vida pré-natal, e termina com o estágio de folículo pré-ovulatório. Desta forma, todo esse processo se divide em duas fases: pré-antral e antral. No decorrer da fase pré-antral, ocorre a ativação dos folículos primordiais e em seguida, a passagem para os estágios de folículos primários e folículos secundários. O aparecimento do antro, área preenchida por fluido folicular, nos folículos terciários determina o início da fase antral, que termina com a formação dos folículos pré-ovulatórios ou de De Graaf (IRELAND, 1987; FIGUEIREDO et al., 2008).

Os folículos ovarianos são classificados de acordo com o grau de evolução. O folículo primordial é constituído por um oócito imaturo, recoberto por uma camada simples de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (HUTT; MCLAUGHLIN; HOLLAND, 2006). Oócitos recobertos por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico, são classificados como folículos primários. Quando as células da granulosa que recobrem os

folículos primários, se multiplicam, levando ao acúmulo de várias camadas de células ao redor do oócito, surgem os folículos secundários ou pré-antrais. O grande potencial do processo de multiplicação celular das células da granulosa, contribui para o desenvolvimento de um espaço preenchido por fluido folicular, classificado como antro. A partir deste momento, esses folículos passam a ser classificados como folículos antrais. De maneira subsequente, o diâmetro do folículo aumenta, devido ao crescimento do oócito, provocando pela multiplicação das células da granulosa, da teca e pelo aumento da cavidade antral, dando origem ao folículo pré-ovulatório. No momento do seu rompimento, o óvulo é liberado, momento que caracteriza a ovulação, e o remanescente deste folículo se transforma em uma glândula endócrina, o corpo lúteo, que passa a secretar progesterona e estradiol (PARROTT; SKINNER, 2000).

Os folículos ovarianos que chegam ao estágio ovulatório são muito poucos, isso ocorre em consequência ao processo de atresia. Estima-se que aproximadamente 99,9 % dos folículos ovarianos sofrem um processo de degeneração ou apoptose denominado atresia folicular, fazendo com que o ovário seja considerado um órgão de baixa produtividade (HIRSHFIELD, 1991).

A atresia folicular pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como, a idade, o ciclo reprodutivo, a lactação, a gestação, os hormônios, a nutrição e a isquemia (ZUCKERMAN, 1964).

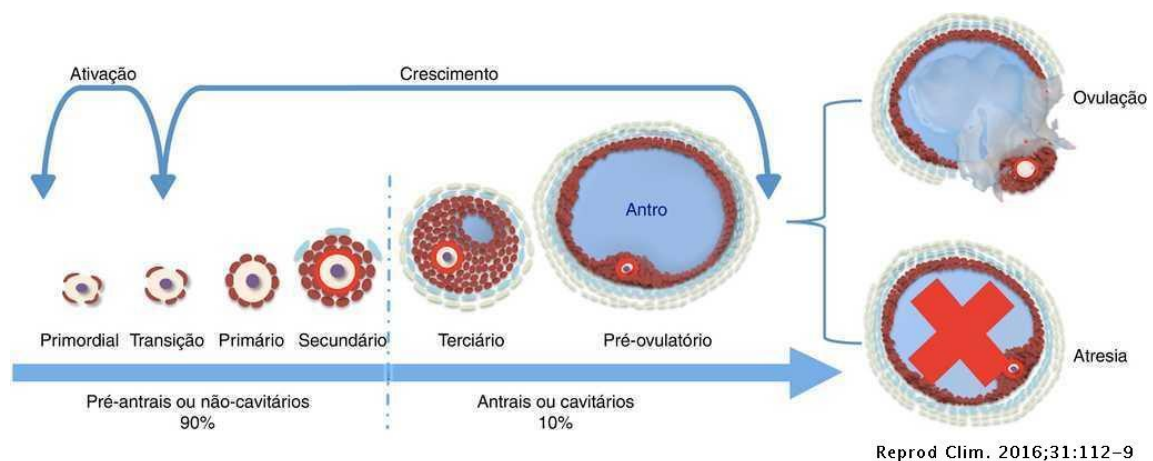


Figura 2: Representação esquemática da foliculogênese e dos estádios foliculares (DE LIMA et al., 2016).

O ciclo menstrual ovariano é dividido nas fases folicular, ovulatória e lútea. O principal evento na fase folicular é o crescimento e desenvolvimento dos folículos nos ovários recrutados. Nessa fase, a hipófise aumenta levemente sua produção de FSH, que estimulará as células da granulosa promovendo o seu crescimento, os níveis de LH passam a subir lentamente. Os folículos ovarianos recrutados logo aumentam a produção de estradiol (E2), o E2 estimula a síntese de LH e FSH, mas inibem sua secreção. Os folículos em desenvolvimento também produzem o hormônio inibina, capaz de inibir a secreção de FSH, mas não de LH. Sendo assim, conforme a concentração de FSH diminui, a concentração de LH continua aumentando e somente um desses folículos, o folículo dominante, continua a crescer, começa a produzir E2 e se rompe (MAGIAKOU et al., 1997).

Com o rompimento do folículo, temos como consequência a liberação do óvulo, fenômeno que caracteriza a fase ovulatória. Na fase lútea, após o rompimento do folículo, as células foliculares se transformam em um corpo lúteo. Essas células que formam o corpo lúteo, sofrem hipertrofia e têm a sua capacidade de síntese hormonal aumentada, apresentam aumento no número de grânulos lipídicos e da sua rede vascular. O LH é o hormônio responsável pela manutenção das funções normais do corpo lúteo durante o ciclo reprodutivo. O corpo lúteo, por sua vez, é responsável por secretar progesterona (P4) em quantidades aumentadas e devido ao aumento dos níveis circulantes de P4, E2, e inibina na maior parte da fase lútea, os níveis de LH e FSH diminuem. Numa situação na qual o óvulo não é fecundado e não ocorre uma gestação, os níveis de E2 e P4 diminuem e o corpo lúteo se degenera, permitindo que o FSH volte a aumentar no final da fase lútea para iniciar o crescimento folicular do ciclo seguinte. Enquanto, na ocorrência da fecundação e implantação, o corpo lúteo permanece funcional e se mantém sustentado pela gonadotropina coriônica produzida pelo embrião em desenvolvimento (YEN, 1978; FILICORI et al., 1986).

O útero também será influenciado pelas alterações hormonais, provocadas pelo processo de foliculogênese ovariana, levando assim, a ocorrência de um ciclo menstrual uterino, dividido nas fases, menstrual, proliferativa e secretora. Com a degeneração do corpo lúteo e a consequente queda nos níveis de E2 e P4, ocorre uma descamação das células endometriais, caracterizando a menstruação. De maneira sequencial e paralela a fase folicular no ciclo ovariano, ocorre a fase proliferativa do ciclo uterino, na qual, em resposta ao aumento dos níveis de E2, ocorre a regeneração do endométrio a partir da camada basal uterina, marcado pelo crescimento rápido das suas glândulas e vasos sanguíneos. As glândulas passam a secretar um muco fino e pegajoso que se alinha no canal cervical, que tem por função guiar os

espermatozoides até ao útero. A partir da ovulação e em paralelo a fase lútea no ciclo ovariano, ocorre a fase secretora no ciclo uterino, na qual, o E2 promove o crescimento adicional do endométrio, enquanto a P4 promove o desenvolvimento das glândulas secretoras e do tecido conjuntivo, tornando o endométrio em uma estrutura rica em nutrientes, capaz de nutrir precocemente o embrião e de permitir a sua fixação (BRENNER; WEST, 1975; CURRY; OSTEEEN, 2003; GARCIA et al., 1988).

1.4 ESTEROIDOGÊNESE OVARIANA

Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol, que pode ser obtido por meio das fontes alimentares e/ou formado no fígado. O hormônio LH liberado pela hipófise anterior, irá atuar nas células da teca, estimulando a atividade de enzimas para realizar a conversão de pregnenolona a androstenediona. Esse processo tem início com a captação do colesterol circulante e o seu transporte para o interior das mitocôndrias das células da teca, realizado pela proteína StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese), desta forma, o colesterol pode ser convertido em pregnenolona pela enzima colesterol-desmolase, pertencente ao complexo enzimático P450 e sequencialmente em progesterona, por meio da enzima 3 β -hidroxidesidrogenase. A progesterona poderá exercer suas funções biológicas no organismo ou ser convertida em androstenediona, por ação da enzima 17,20-liase. A androstenediona sintetizada também poderá atuar nas suas funções orgânicas ou ser convertida em outro andrógeno, a testosterona, sob a ação da 17 β -redutase. Já a testosterona, poderá atuar no organismo, ser convertida em dihidrotestosterona pela enzima 5 α -redutase ou atravessar a membrana celular das células da camada granulosa para ser transformada em estradiol pela ação da enzima aromatase, que tem sua atividade estimulada pelo FSH. O estradiol também pode ser produzido por uma segunda via, na qual a androstenediona sofre aromatização nas células da granulosa e é convertida em estrona, e está em estradiol, pela enzima 17 β -redutase. As altas concentrações de estradiol nos momentos próximos à ovulação inibem a ação do FSH nas células da granulosa e promovem o estímulo para a produção de mais progesterona, provavelmente devido ao início do processo de luteinização, no qual este hormônio é produzido em grandes quantidades (FRANCI; ANSELMO-FRANCI, 2008; BULUN; ADASHI, 2010; LIMAVERDE et al., 2007; LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011).

As células da granulosa também sintetizam e liberam grandes quantidades do hormônio inibina, cuja ação se dá por meio do bloqueio da síntese e liberação de FHS pela hipófise anterior. A inibina é secretada de maneira equivalente ao estradiol e juntas reduzem os níveis circulantes de FSH, levando muitos dos folículos a sofrerem atresia. Somente o folículo dominante continua com o processo de crescimento e desenvolvimento, pois este não é sensível a ação do FSH (SANTOS et al., 2009). Os estrogênios também exercem uma função de “*feedback*” positivo sobre a liberação hipofisária de LH, as altas concentrações plasmáticas de estradiol provocadas pelo folículo pré-ovulatório determinam a ocorrência do pico de LH e a consequente ovulação (BERTAN et al., 2006).

A regulação do estrogênio é feita via genômica por meio de receptores de estrogênio α (ER- α) e β (ER- β), e não-genômica, por meio da ligação ao receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) (GUSTAFSSON, 2003; KUIPER et al., 1996; REVANKAR et al., 2005). Já a progesterona além interagir de maneira mais fraca com o GPER, tem a sua ação modulada principalmente pelo receptor de progesterona (LEMALE et al., 2008). GPER é uma proteína expressa na superfície celular, que por meio da sua ligação com agonistas, promove a ativação da proteína G, seguida de uma cascata de reações de proteínas reguladoras e efetoras (FILARDO et al., 2002; PROSSNITZ, 2004; REVANKAR et al., 2005). Já os receptores nucleares, quando se ligam a hormônios específicos, sofrem rearranjos conformacionais que levam à formação de homo ou heterodímeros. Quando em atividade, interagem diretamente com regiões específicas do material genético (elementos responsivos do estrogênio ou da progesterona), levando a um estímulo positivo e/ou negativo na expressão gênica de sua célula-alvo (LEMALE et al., 2008).

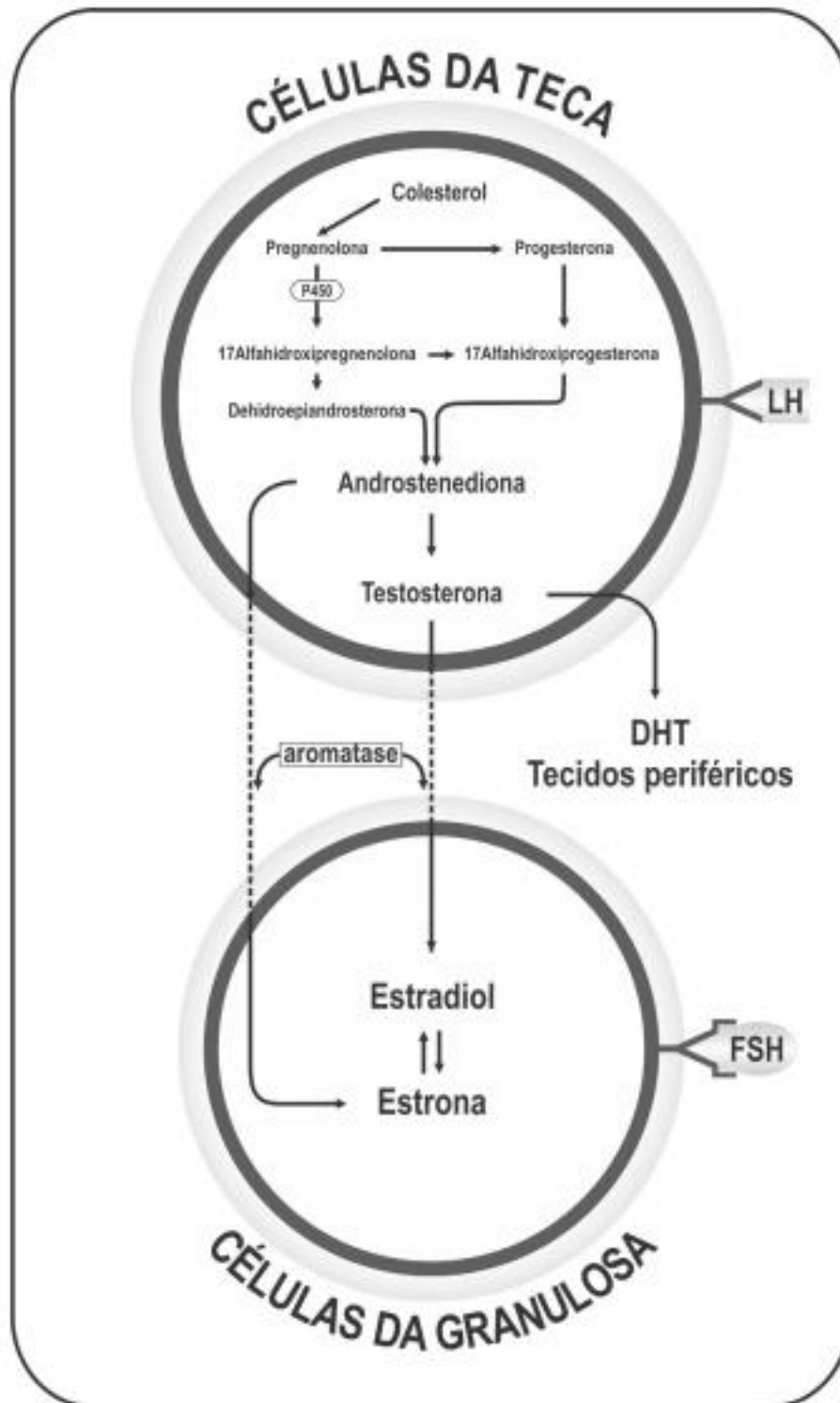


Figura 3: Esteroidogênese no folículo ovariano. LH: Hormônio Luteinizante, DHT: Diidrotestosterona, FSH: Hormônio Folículo Estimulante (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011).

1.5 CICLO ESTRAL

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

O ciclo reprodutivo das ratas é denominado ciclo estral, sendo caracterizado pelas modificações morfológicas que ocorrem no trato reprodutivo das fêmeas, com um tempo de duração bem inferior aos 28 dias observados em humanos saudáveis, a duração do ciclo estral nestes animais normalmente se dá entre 4 e 5 dias (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2009).

O ciclo estral é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, classificadas de acordo com os tipos celulares observados no esfregaço vaginal. O proestro caracteriza-se pela predominância de células epiteliais nucleadas; o estro é indicado pela presença de células epiteliais queratinizadas abundantes; o metaestro apresenta proporções equivalentes de leucócitos, células epiteliais nucleadas e queratinizadas, enquanto o diestro é caracterizado pela predominância de leucócitos (MANDL; MANDL, 1951; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; WESTWOOD, 2008).

A fase de proestro tem duração de 12 a 14 horas, está associada à maturação dos folículos e precede a fase de estro (25 a 27 horas), é identificado com o único período em que a fêmea se encontra receptiva ao macho. Não ocorrendo concepção, a rata atinge a fase de metaestro, cuja duração é de 24 a 48 horas, seguida pela fase de diestro, que dura cerca de 24 horas, quando a secreção de hormônios ovarianos é reiniciada para o próximo ciclo (FRANCI; ANSELMO-FRANCI, 2008).

O controle deste ciclo reprodutivo se dá por regulação hormonal. LH e FSH permanecem baixos ao longo das fases e aumentam na tarde do proestro. Sendo o pico plasmático de LH, fundamental para o processo ovulatório, e a concentração de FSH na fase de estro, está relacionada ao recrutamento de folículos para o próximo ciclo (SZAWKA; ANSELMO-FRANCI, 2004). As concentrações de E2 começam a aumentar no metaestro, alcançando o pico de concentração durante o proestro e em seguida retorna para a linha de base na fase estro. A secreção de P4 também aumenta durante o metaestro e diestro, diminuindo logo após para depois alcançar seu maior pico no fim do proestro (MILLER; TAKAHASHI, 2014).

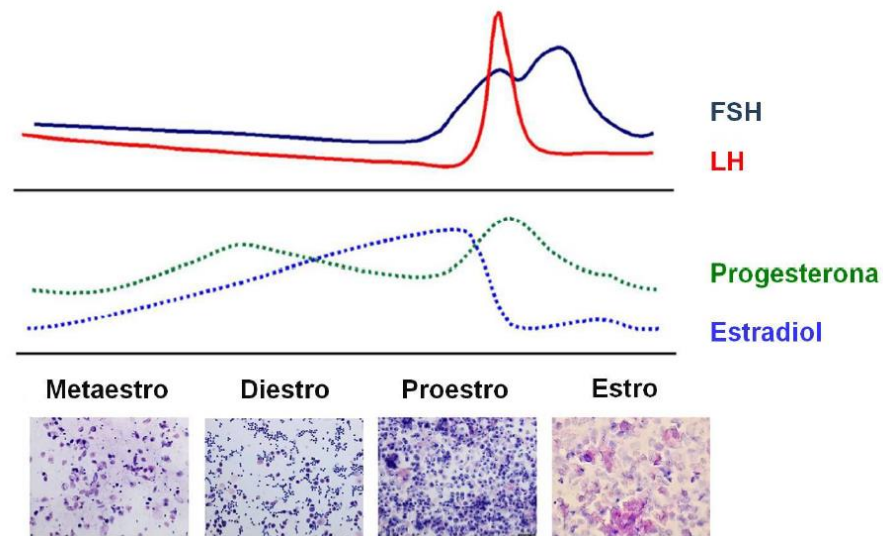


Figura 4: Variações hormonais e esfregaço vaginal das quatro fases do ciclo estral. Representação das flutuações séricas de FSH, LH, progesterona e estradiol ao longo do ciclo reprodutivo de ratas; e imagens representativas do esfregaço vaginal nas fases de proestro, estro, metaestro e diestro (Coloração Hematoxilina e Eosina - H&E). Adaptado de (LING et al., 2017; MILLER; TAKAHASHI, 2014).

1.6 PREJUÍZOS NA FUNÇÃO OVARIANA CAUSADOS PELA OBESIDADE

Estudos anteriores em modelos de roedores e em amostras humanas demonstraram que a obesidade impacta negativamente a função ovariana. Os prejuízos encontrados foram anormalidades do ciclo estral, identificadas por longos períodos de diestro e períodos de estro mais curtos (BAZZANO et al., 2015; DE ARAÚJO et al., 2018; NTEEBA; GANESAN; KEATING, 2014), alterações no crescimento e no desenvolvimento dos folículos ovarianos, como a diminuição dos folículos primordiais e aumento no número de folículos antrais e atrésicos (DE ARAÚJO et al., 2018; NTEEBA; GANESAN; KEATING, 2014; SKAZNIK-WIKIEL et al., 2016; WANG et al., 2014; WU et al., 2014). Juntos, esses dados sugerem que os efeitos da obesidade sobre os ovários podem contribuir para o esgotamento da reserva ovariana, dando espaço para o desenvolvimento de uma subfertilidade (WANG et al., 2014).

A apoptose das células da granulosa, responsável por iniciar a atresia folicular, está aumentada nos ovários de camundongos e ratos obesos (WU et al., 2014). Em folículos que não se tornam atrésicos, é razoável esperar que este menor número de células da granulosa por folículo também diminua a síntese e a secreção de estradiol, o que impactaria diretamente tanto no ciclo estral, quanto no crescimento folicular. A quantidade de mRNA de CYP19A1, que

codifica a proteína aromatase, também está diminuída em ovários de camundongos fêmeas obesas (DE ARAÚJO et al., 2018; NTEEBBA; GANESAN; KEATING, 2014). Da mesma forma, a razão de E2 para P4, a quantidade de mRNA das proteínas StAR e aromatase, estão diminuídas em camundongos obesos durante o estro (NTEEBBA; GANESAN; KEATING, 2014; POHLMEIER et al., 2014).

Deste modo, as complicações da obesidade levam a disfunções reprodutivas importantes, como alterações do ciclo estral, perfil hormonal sexual anormal, anovulação, infertilidade e características de insuficiência ovariana prematura (IOP) (KJAERGAARD et al., 2018; SZEGDA et al., 2017). A IOP é caracterizada como um distúrbio feminino associado a disfunção dos folículos ovarianos e ao seu esgotamento (DA COSTA et al., 2021; NELSON et al., 1982), além dos níveis aumentados de gonadotrofina e redução nos níveis de hormônios sexuais e hormônio anti-mülleriano (AMH) (PAL; TORREALDAY; KODAMAN, 2017; SHARIF et al., 2019).

1.7 MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR UMA DIETA (DIO)

Muitos dos estudos vêm sendo desenvolvidos em modelos de obesidade induzida por dieta (DIO), como a dieta rica em gordura (HFD) e a dieta rica em carboidratos (HCD) (ANTUNES et al., 2020; PAWLAK; KUSHNER; LUDWIG, 2004; SADOWSKA; GĘBCZYŃSKI; KONARZEWSKI, 2017). O modelo HCD vem sendo aplicado em pesquisas com animais, mostrando efeitos metabólicos semelhantes ao da administração periférica de insulina. A ocorrência de hiperinsulinemia é seguida pelo aumento no diâmetro dos adipócitos, o que contribui para o aumento da adiposidade, ficando ainda evidenciado o aumento na ingestão alimentar e diminuição do gasto energético (KABIR et al., 1998; LUDWIG; DAVID; EBBELING, 2018; PAWLAK; KUSHNER; LUDWIG, 2004). A eficácia do método pode ser observada também em modelos de animais modificados geneticamente (BLÜHER; KAHN; KAHN, 2003; LE STUNFF et al., 2000) e estudos observacionais (MANSOOR et al., 2016; MEHRAN et al., 2012; TOBIAS et al., 2015).

Segundo Oliveira et al (2013), camundongos machos BALB/c que foram alimentados com HCD por 12 semanas, apresentaram aumento da adiposidade visceral, intolerância à glicose, resistência à insulina (RI), hiperlipemia, e níveis circulantes alterados de adiponectina, resistina e leptina.

Encontramos poucos estudos anteriores investigando os efeitos da HCD nas disfunções reprodutivas. Um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, Niño et al. (2020) identificou alterações metabólicas, como aumento no peso corporal, adiposidade, hipertrofia de adipócitos, perfil lipídico anormal, tolerância aumentada à glicose, resistência insulínica (RI) e hiperleptinemia. Relacionado ao trato reprodutivo, foi observado, irregularidades no ciclo estral, níveis elevados de LH e morfologia ovariana anormal, juntamente com redução no número de folículos primordiais e primários, sugerindo esgotamento das reservas ovarianas. O desenvolvimento folicular inadequado, uma redução na área dos folículos antrais, dos corpos lúteos e da área da camada granulosa, juntamente com um aumento no número de folículos císticos foi identificado, além de uma atrofia uterina, redução no número das glândulas endometriais (GE), inflamação e fibrose no trato reprodutivo. Além disso, fortes correlações positivas foram observadas entre peso corporal, adiposidade e RI com a duração do ciclo estral, folículos císticos, reserva ovariana, GE e outras anormalidades, em ratas *Wistar* tratadas com HCD por 15 dias.

Poucas são as informações científicas existentes sobre os efeitos da HCD no sistema reprodutor feminino, muitos dos trabalhos existentes tendem a analisar os efeitos deletérios do HCD em outros sistemas ou órgãos que não os do sistema reprodutor, como por exemplo, os órgãos do metabolismo. Mas de acordo com o estudo anterior do nosso grupo, podemos comprovar que existem efeitos deletérios ao sistema reprodutor feminino a partir da exposição a HCD (NIÑO et al., 2020), sendo necessárias mais pesquisas sobre o tema.

Em paralelo a estes achados, como já citado anteriormente no texto, a obesidade, doença de origem multifatorial que pode ser associada as disfunções reprodutivas, na qual o seu desenvolvimento pode ocorrer por influência alimentar, como é o caso da exposição a dieta HCD, e também devido a exposição aos desreguladores endócrinos do tipo obesogênicos, como é o caso do TBT (PODRATZ et al., 2012; SENA et al., 2017).

1.80 DESREGULADOR ENDÓCRINO TBT

Compostos desreguladores endócrinos da sigla em inglês (EDC- "*Endocrine disruptors compounds*") são classificados como um grupo emergente de xenobióticos definidos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA-USA) como: "agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ação de ligação ou eliminação de hormônios transmitidos pelo sangue que estão presentes no corpo e são responsáveis pela

homeostase, reprodução e processo de desenvolvimento” (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; EPA, 1997). Podem atuar diretamente sobre uma glândula endócrina, alterando sua função, ou agir diretamente sobre a expressão de um receptor hormonal e alterar a função de determinado hormônio em seu órgão-alvo (BROWN et al., 2001).

O receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico produzido no organismo. Por isso, concentrações extremamente baixas de um determinado hormônio geram efeitos, produzindo uma resposta natural. Quando estes receptores hormonais se ligam a outros compostos químicos podem gerar falsos “*feedbacks*”. Por isso, os desreguladores endócrinos, mesmo em concentrações muito baixas no organismo, são capazes de gerar uma perturbação, provocando, conseqüentemente, uma resposta inadequada (GHISELLI, 2006).

Dentre os EDC's, podemos destacar a classe dos organoestânicos (OT's), compostos químicos caracterizados pela presença de uma ou mais ligações entre o átomo de estanho e átomos de carbono (Sn-C) (HOCH, 2001). São organometálicos com grande uso na indústria, na produção plásticos, pesticidas, estabilizadores e tintas, conhecidos por terem a capacidade de desregular eixos endócrinos, inclusive o eixo reprodutivo em vertebrados (DE ARAÚJO et al., 2018) e invertebrados (COSTA, et al., 2008).

O grupo dos OTs, chegou a ser considerado como o terceiro grupo de poluentes ambientais mais importante, devido à preocupação com a sua bioacumulação no ecossistema e conseqüentemente o seu papel de contaminante na cadeia trófica, podendo atingir a espécie humana (NATH, 2008).

Esses compostos, devido ao desenvolvimento humano, estão cada vez em maiores quantidades e variedades no meio ambiente, sendo eles uma fonte de contaminação aos seres vivos e motivo de desenvolvimento de doenças e/ou disfunções emergentes (BOYER, 1989; JENKINS et al., 2009; LATINI, 2005).

Dentre os OT's, encontramos um composto de efeito obesogênico, o TBT, que já foi considerado um componente anti-incrustante ideal para embarcações, devido a sua efetividade e longa duração, prevenindo desta forma o alto custo com manutenção e tempo de docagem, fazendo com que a indústria de anti-incrustantes faturasse cerca de 3 bilhões de euros anualmente (SOUSA et al., 2014).

Devido ao seu poder biocumulativo, o TBT e os produtos da sua degradação acabam contaminando peixes, lulas, moluscos, e até os predadores de topo de cadeia, como golfinhos, focas, baleias, pássaros que se alimentam de peixes (SONAK et al., 2009), espécies de plantas e espécies marinhas que fazem parte da dieta humana, como ostras, salmão de viveiro, mexilhões e algas marinhas (DE CARVALHO OLIVEIRA; SANTELLI, 2010).

Na década de 1970, os primeiros efeitos tóxicos em organismos não alvos foram descobertos (ALZIEU, 1998). Na Inglaterra, foram notados os primeiros sinais de alterações anatômicas de um gastrópode *Nucella lapillus*, que apresentou a masculinização dos órgãos sexuais em indivíduos fêmeas, este fenômeno foi denominado como imposex, e posteriormente comprovado que a causa era a exposição ao TBT (MATTHIESSEN, 2013).

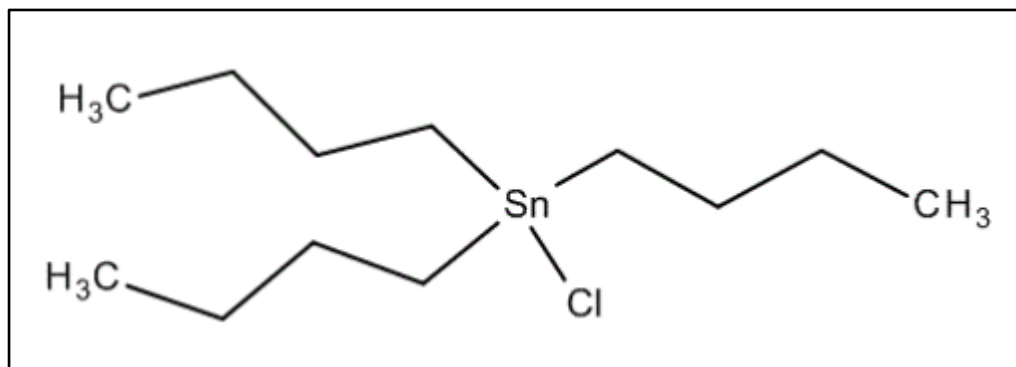


Figura 5: Estrutura química do cloreto de tributilestanho (SENA et al., 2017).

Em 1982, o Ministério Francês do Ambiente, criou as primeiras restrições sobre o uso do TBT como biocida nas tintas anti-incrustantes com a finalidade de reduzir a sua utilização (ALZIEU, 1998). Com o tempo, a bioacumulação do TBT no meio ambiente e sua elevada toxicidade sobre várias espécies, gerou a criação de uma regulamentação, que determinava uma série de restrições sobre o seu uso em vários países (DORNELES et al., 2008; MATTHIESSEN; GIBBS, 1998; WHALEN; LOGANATHAN; KANNAN, 1999). Em 2001, a IMO (Organização Marítima Internacional) decretou o prazo máximo de janeiro de 2008, para que as tintas que continham o TBT em sua composição, fossem removidas ou seladas dos cascos das embarcações (IMO, 2001). Porém, mesmo com todas as restrições atuais relacionadas a fabricação, uso e comercialização das tintas anti-incrustantes compostas por TBT, ainda é possível encontrá-las de maneira fácil no mercado (SONAK et al., 2009).

O TBT é considerado um xenobiótico obesogênico, pois tem atuação sobre o receptor nuclear ativado por proliferador de peroxissomo- γ (PPAR γ), que é um dos principais responsáveis pela diferenciação celular dos adipócitos. Desse modo, como consequência, modulam as vias responsáveis pela adipogênese/lipogênese (GRÜN et al., 2006). A autoridade europeia para a segurança dos alimentos em conjunto com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos definiu os níveis de ingestão diária tolerável para humanos de 300 ng/kg/dia de TBT, sendo alcançado por meio da aplicação de 100 vezes fator de segurança para o camundongo em doses NOAEL (do inglês “*No Observed Adverse Effect Level*”) que é de 25 μ g/kg/dia (VOS et al., 1990; EPA, 1997).

Trabalhos científicos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstram que concentrações menores do que esse valor, podem causar danos em diversos órgãos, bem como ao metabolismo e a reprodução. Coutinho et al. (2016) identificaram inflamação, estresse oxidativo e consequente disfunção renal em ratas *Wistar* (100 ng/Kg/15 dias), o estudo de Merlo et al. (2016) apresentou desregulações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, envolvendo aumento da enzima óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) hipotalâmica, estresse oxidativo, inflamação, deposição lipídica e de colágeno aumentada (100 ng/Kg/15 e 30 dias). Da Costa et al. (2019) identificaram inflamação, estresse oxidativo e fibrose na glândula mamária de ratas *Wistar* (100 ng/Kg/15 dias). Bertuloso et al. (2015) demonstraram maior ganho de peso, adiposidade aumentada, inflamação do tecido adiposo, perturbação do controle metabólico envolvendo a interligação entre fígado, pâncreas e tecido adiposo (100 ng/Kg/15 dias).

Os danos relacionados ao sistema reprodutor foram mostrados no trabalho de Podratz et al. (2012), no qual observou-se alterações no ciclo estral de ratas *Wistar* tratadas com 100 ng/Kg/ por 15 dias, além de alterações dos níveis hormonais de estrogênio e progesterona, peso ovariano, alteração no número de corpos lúteos e de folículos atresícos. O estudo de Sena et al. (2017), identificou anormalidades no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, por meio da desregulação da sinalização de kisspeptina, redução na expressão de GnRH, alteração nos níveis de LH, e da fertilidade (100 ng/Kg/15 dias). E por fim, o trabalho De Araújo et al. (2018) reportou prejuízo na função ovariana, via desregulação de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR), C/EBP e Lipina-1 e deposição lipídica neste órgão.

No mundo moderno estamos expostos de forma concomitante aos poluentes ambientais, como o TBT, e a uma alimentação desequilibrada, como é o caso da HCD. Pouca informação é conhecida sobre as interações entre a exposição ao TBT e o estado nutricional,

apesar da relevância potencial de tais interações para a pandemia da obesidade. Apenas um estudo avaliou os efeitos de TBT e HFD em função metabólica, levando a efeitos transgeracionais em ambos os sexos de camundongos (CHAMORRO-GARCIA et al., 2017). Na busca por estudos anteriores, foi possível encontrar somente trabalhos que avaliaram os efeitos isolados da exposição ao TBT ou a HCD na função reprodutiva. Partindo dessa premissa, houve o interesse em estudar os efeitos provocados ao sistema reprodutor feminino de ratas *Wistar*, quando associamos a exposição dessas duas substâncias, o TBT e a HCD, com a finalidade de se investigar se sob essas circunstâncias os efeitos deletérios da exposição combinada seriam maiores do que os efeitos em decorrência de suas exposições isoladas.

2. JUSTIFICATIVA

Embora existam estudos que demonstrem o efeito isolado da exposição ao TBT ou HCD na função reprodutiva, ainda carecem de uma descrição fisiológica que conecte seus efeitos metabólicos associados com características de IOP e outras disfunções. Sabemos que na vida normal, é difícil dissociar a exposição ao EDC e a ingestão de alimentos. Pouca informação é conhecida sobre as interações entre a exposição ao TBT e o estado nutricional, apesar da relevância potencial de tais interações para a pandemia de obesidade. Sendo assim, estudos mais esclarecedores sobre os efeitos gerados na função reprodutora em decorrência da exposição combinada de HCD- TBT se tornam necessários.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar os possíveis efeitos metabólicos e reprodutivos causados pela exposição ao organoestânico tributilestanho (TBT) associado ao consumo de uma dieta de alto teor de carboidratos refinados (HDC) em ratas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos causados pela exposição ao organoestânico tributilestanho (TBT) associado ao consumo de uma dieta de alto teor de carboidratos refinados (HDC) sobre os parâmetros biométricos;
 - Examinar os efeitos da exposição ao organoestânico tributilestanho (TBT) associado ao consumo de uma dieta de alto teor de carboidratos refinados (HDC) sobre a morfofuncionalidade do tecido adiposo branco, ovário e útero;
 - Determinar os efeitos da exposição ao organoestânico tributilestanho (TBT) associado ao consumo de uma dieta de alto teor de carboidratos refinados (HDC) sobre os perfis lipídicos e glicêmicos;
 - Analisar as concentrações séricas basais dos hormônios folículo-estimulante (FSH), estradiol (E2), progesterona (P4), testosterona e hormônio anti-mülleriano (AMH);
 - Identificar os efeitos da exposição ao organoestânico tributilestanho (TBT) associado ao consumo de uma dieta de alto teor de carboidratos refinados (HDC) no desenvolvimento de processo inflamatório no tecido adiposo branco, ovário e útero.
 - Identificar os efeitos da exposição ao organoestânico tributilestanho (TBT) associado ao consumo de uma dieta de alto teor de carboidratos refinados (HDC) sobre a função reprodutiva e correlacionar aos marcadores metabólicos e características semelhantes a IOP.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 DIETA COM ALTO TEOR DE CARBOIDRATOS (HCD)

A HCD foi composta por 45% de leite condensado, 10% de açúcar refinado e 45% de dieta padrão. A composição macronutriente da dieta padrão (4,0 kcal/g) foi de 65,8% de carboidratos, 3,1% de gordura e 31,1% de proteína. Já a da HCD (4,4 kcal/g) foi de 74,2% de carboidratos, 5,8% de gordura e 20% de proteína. É importante ressaltar que a HCD contém pelo menos 30% de açúcares refinados, principalmente sacarose (OLIVEIRA et al., 2013).

4.2 TRATAMENTO COM TRIBUTILESTANHO (TBT)

A dose de 100 ng/kg/dia, em um volume 0,1 ml por via orogástrica (gavagem), foi oferecida aos animais por um período de 15 dias. O cloreto de tributilestanho (TBT, 96%, Sigma, St. Louis, Mo., EUA) foi dissolvido em etanol a 0,4% tendo como base nosso estudo anterior (MERLO et al., 2016).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-USA, 1997) e a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1990), a dose considerada segura ou aceitável para humanos em exposição ao TBT é de 300 ng/Kg por dia. Para se chegar a essa dose é feita a caracterização do risco, avaliando a toxicidade do composto em relação à exposição à qual o indivíduo está submetido. A dose selecionada para o tratamento dos animais nesse estudo, foi de 100 ng/Kg/dia, 3x menor do que a considerada segura para a ingestão diária. Essa seleção permite avaliar os possíveis efeitos tóxicos do TBT, mesmo sob exposição aparentemente segura.

4.3 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando aproximadamente 200 g, com 8 semanas de idade, fornecidas pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (43×30×17,8cm), não ultrapassando o número de 4 animais por gaiola, em ambiente com temperatura (23-25 °C) e umidade controladas (40-60%), iluminação artificial de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisas (FINEP, 2018) e 12 horas de claro/escuro, conforme as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA MCT, 2016). As ratas tiveram livre acesso à água e comida durante todo o

experimento. Os protocolos experimentais desenvolvidos durante esse projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA), com o registro 03-2016.

Quarenta e oito ratas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos: 1) grupo controle CON (n= 12), que recebeu dieta padrão para ração (Nuvitral CR Quimtia- Paraná, BR) e foram tratados diariamente com um veículo (0,4% de etanol, via gavagem), 2) grupo TBT (n=12) que recebeu dieta padrão para ração (Nuvitral CR Quimtia- Paraná, BR) e foram tratados diariamente com TBT (100 ng / kg / dia, TBT (96%), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, via gavagem), 3) grupo HCD (n= 12), que recebeu dieta com alto teor de carboidratos (74.2% de carboidratos) e foram tratados diariamente com um veículo (0,4% de etanol, via gavagem) e 4) grupo TBT-HCD (n=12) que recebeu dieta com alto teor de carboidratos (74.2% de carboidratos) e foram tratados diariamente com TBT (100 ng / kg / dia, TBT (96%), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, via gavagem). O tratamento foi realizado por um período de 15 dias, sendo que no decorrer deste período, os animais foram pesados a cada 3 dias e a ingestão de alimentos foi calculada como a diferença entre os alimentos oferecidos e as sobras restantes após 72 horas (em gramas).

4.4 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Durante os 15 dias de tratamento, diariamente, às 10 horas da manhã, foi realizada a coleta do lavado vaginal das ratas, por meio da injeção intravaginal de 10 microlitro (μ l) de cloreto de sódio (NaCl 0,9%). O material foi depositado sobre lâminas previamente limpas e secas e, posteriormente, essas lâminas foram fixadas em metanol e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Quando secas, foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) para avaliação de cada fase do ciclo. Os estágios do ciclo estral foram classificados como proestro (P), estro (E) ou metaestro-diestro (M-D) com base nas proporções observadas de leucócitos epiteliais cornificados, epiteliais nucleados e polimorfonucleares. As frequências dos ciclos estrais e dos dias passados nas diferentes fases foram comparadas entre as ratas CON, TBT, HCD e TBT-HCD (n = 12 por grupo) (NELSON et al., 1982).

4.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG) E TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA (TSI)

Para a realização do TTG, as ratas receberam a aplicação intraperitoneal (*ip*) de 2g de glicose/kg de peso corporal, no 14º dia de tratamento, após jejum de 7 horas. Foi realizado um

pequeno corte na ponta da cauda para coleta de uma gota de sangue e verificou-se a glicemia nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (NIÑO et al., 2020).

No 15º dia de tratamento o TSI foi realizado pela manhã. As fêmeas, em estado alimentado, receberam a aplicação ip de 0,75U de insulina/kg de peso corporal e foi realizado um pequeno corte na ponta da cauda, para coleta de uma gota de sangue. A verificação da glicemia ocorreu nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 90 minutos (NIÑO et al., 2020).

O aparelho utilizado para leitura glicêmica dos testes foi o Accu-Chek® Advantage (Roche) (FREITAS-LIMA et al., 2018).

4.6 PESO DOS ÓRGÃOS

Após os 15 dias de tratamento com TBT combinado com a HCD, as ratas foram anestesiadas com cetamina (90 mg/kg/ip) e xilazina (4,5 mg/kg/ip) e, na sequência, foram eutanasiadas, quando na fase de metaestro-diestro. A padronização da eutanásia na mesma fase do ciclo estral para todas as ratas evita o viés da diferença de níveis hormonais entre os animais, o que poderia implicar diretamente na morfologia e em outros parâmetros analisados neste estudo.

Foram retirados e pesados os seguintes órgãos ou tecidos: tireoide, coração, pulmão, baço, timo, pâncreas, rins, adrenais, fígado, ovários, útero, gordura parametrial, gordura perirrenal, gordura retro abdominal e gordura retroperitoneal.

Todos os valores dos pesos das gorduras e do peso dos órgãos foram normalizados pelo comprimento da tibia.

4.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS HORMONAIS E PERFIL LIPÍDICO

Amostras de sangue foram coletadas na manhã da fase de M-D e imediatamente centrifugadas a 3800 rotações por minuto (2324 g), a 4 °C durante 15 minutos, para se obter o soro, que foi acondicionado a -20°C para análise posterior. Foi utilizada a técnica de ensaio de imun absorção enzimática (ELISA - do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*) para dosar os níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH), esteroides sexuais ovarianos e hormônio anti-mülleriano (AMH) (MOYSÉS; BARKER; CABRAL, 2001; PODRATZ et al., 2012). FSH (#ENZ-KIT 108-0001-FSH, *Enzo life Sciences In. Farmingdale, NY, EUA*),

Estradiol (E2) (#EIA-2693, DRG *Instruments GmbH*, Alemanha), Progesterona (P4) (#EIA-2693, DRG *Instruments GmbH*, Alemanha) e Testosterona (#EIA-1559, DRG *International, Inc.*, EUA). O limite de detecção do ensaio para testosterona foi 1,76 ng / ml. O CV intra-ensaio para cada ensaio foi entre 1,8% e 2,6%. O CV inter-ensaio para cada ensaio foi entre 2,9% e 6,0%. Também foram avaliados os níveis do hormônio anti-mulleriano (AMH) (#CEA228Ra).

Os níveis séricos de TGs (#K117, Bioclin- MG, Brasil), colesterol total (#K083, Bioclin- MG, Brasil) e das frações de colesterol, HDL (#K071, Bioclin- MG, Brasil) e LDL (#K088, Bioclin- MG, Brasil), foram mensurados de acordo com as instruções do fabricante de kits colorimétricos (LIU et al., 2014).

4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após a eutanásia e remoção do tecido adiposo parametrial (TAP), o depósito de tecido adiposo branco escolhido para análise, ovários e útero, foi feita a fixação dos tecidos em paraformaldeído 4% tamponado com pH 7,4, durante 48 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina a 60 °C. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo RM 2125 RTS (Leica Microsystems- Wetzlar, Germany), obtendo-se 4 secções (5µm) /animal, com 50µm de distância entre elas. Primeiramente, os cortes foram corados com H&E e fotografados com o uso da câmera Leica acoplada a microscópio ICC50 HD (Leica Microsystems- Wetzlar, Germany) (BERTULOSO et al., 2015; DA COSTA, et al., 2021)

4.8.1 Histomorfometria do TAP, ovários e útero

Após a coloração do TAP com H&E, foram fotografados 20 campos por corte, sendo 4 cortes por lâmina, utilizando a objetiva de 40X e posteriormente a análise foi realizada por meio do software FIJI (ImageJ, versão 3.7.3). O maior e o menor adipócito por campo foram mensurados para determinar a média do diâmetro dos adipócitos (LUDGERO-CORREIA et al., 2012). Os adipócitos ainda foram quantificados e expressos por unidade de área (mm²) (YU et al., 2013).

Para a morfometria dos ovários corados com H&E, utilizou-se a objetiva de 40X para fotografar e quantificar os folículos por toda a extensão dos 4 cortes, em cada uma das 4 lâminas. Os folículos ovarianos e os corpos lúteos (CL) foram contados e expressos por unidades de área (mm²). Os folículos foram classificados como primordiais caso apresentassem

em seu interior, um oócito (Oo) rodeado por uma camada parcial ou completa de células da granulosa escamosas (CGs). Foram classificados como folículos primários quando apresentavam uma única camada de CGs cuboidais. Como pré-antrais quando continham 2–4 camadas de CGs sem espaço antral. Foram classificados como folículos antrais (An) quando continham três ou mais camadas de CGs e um espaço antral claramente definido (MYERS et al., 2004). Os folículos ovarianos atresícos (At) e císticos (Cis) também foram avaliados (SHI et al., 2009). Para o número total de folículos ovarianos saudáveis foi considerada a soma dos folículos primordiais, primários, pré-antrais e antrais, já para os folículos não saudáveis, foi considerada a soma dos folículos atresícos e císticos. Também foram avaliadas as espessuras da granulosa ovariana e a área da teca dos folículos antrais (CALDWELL et al., 2014). As avaliações foram realizadas com microscópio Olympus (AX70; Center Valley, PA) e fotografadas com câmera AxioCamICc1. A análise foi realizada por meio do software FIJI (ImageJ, versão 3.7.3).

Para a morfometria do útero corado com H&E, utilizou-se a objetiva de 40X para se fotografar e quantificar os folículos por toda a extensão dos 4 cortes, em cada uma das 4 lâminas. Em cada secção transversal uterina foram avaliadas a espessura do epitélio luminal (EL), endometrial uterino (End) e miometrial (Myo). Os números das glândulas uterinas endometriais (GE) também foram avaliados (RICHARDSON et al., 2018). Todas as avaliações foram realizadas com microscópio Olympus (AX70; Center Valley, PA) e fotografadas com câmera AxioCamICc1. A análise foi realizada por meio do software FIJI (ImageJ, versão 3.7.3).

4.8.2 Avaliação de mastócitos

As seções de TAP, ovários e útero foram coradas com *Alcian Blue* (Sigma-Aldrich Co, LLC). Cada um dos 4 cortes foi utilizado para obter 20 fotomicrografias com a objetiva de 40X, com o uso da câmera Leica acoplada a microscópio ICC50 HD (Leica Microsystems- Wetzlar, Germany). O número de células coradas positivamente (ou seja, células contendo grânulos citoplasmáticos roxos) dentro do TAP, ovários e útero foram avaliadas e expressas por unidade de área (mm²). As áreas analisadas foram selecionadas aleatoriamente. (BERTULOSO et al., 2015).

4.8.3 Avaliação da deposição de matriz extracelular

Cortes de TAP, ovário e útero foram corados com *Picrosirius Red* e, em seguida, foram obtidas 20 fotomicrografias com a objetiva 10X, de cada um dos 4 cortes presentes nas 4

lâminas, de forma a capturar todo o tecido com o uso da câmera Leica acoplada a microscópio ICC50 HD (Leica Microsystems- Wetzlar, Germany). Para identificação e morfometria dos componentes da matriz extracelular (área $\mu\text{m}^2/\text{campo}$) foi utilizado o software FIJI (ImageJ, versão 3.7.3). Os resultados foram expressos com porcentagem de área marcada com a coloração (MERLO et al., 2016).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). Para identificar possíveis *outliers* nos dados, foi utilizado o teste de *Grubbs* bilateral. Quando o teste de *Grubbs* identificou um *outlier*, usamos um método ROUT adaptado para detectar quaisquer *outliers* daquela coluna de dados e os removemos de acordo com a configuração Q em 1% (alfa = 0,01). Os testes *omnibus* de *D'Agostino e Pearson* foram usados para avaliar a normalidade dos dados. As comparações entre os grupos foram realizadas usando *ANOVA* de uma e duas vias para dados gaussianos (seguido pelo teste de comparação múltipla de *Tukey*). Além disso, para os dados não gaussianos, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* (seguido pelas comparações múltiplas de *Dunn*). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para avaliar a relação entre os parâmetros observados, foi utilizada a correlação de *Spearman* ou de *Pearson* se não gaussiana ou Distribuição gaussiana, respectivamente, foi detectada. Todas as correlações foram obtidas a partir de valores de animais pareados (Tabela 5). Finalmente, quando a significância estatística foi identificada, testamos se a regressão linear ou não linear foi mais bem ajustada. As análises estatísticas e a construção gráfica foram realizadas no GraphPad Prism versão 6.00 (La Jolla, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS, DE GORDURA E ADIPOSIDADE

Os grupos HCD e HCD-TBT apresentaram aumento no peso corporal, que foi identificado a partir do 6º dia de tratamento, e se manteve constante até o 15º dia de tratamento, quando comparado ao grupo CON (Fig. 6 E, $p < 0,05$, $n = 9-12$). Desta forma, o peso corporal final dos grupos HCD e HCD-TBT aumentou em relação ao grupo CON (Fig. 6 F, $p < 0,05$, $n = 9-12$). A dissecação abdominal representativa mostrou um aumento aparente da gordura visceral nos animais dos grupos TBT (Fig. 6 B), HCD (Fig. 6 C) e HCD-TBT (Fig. 6 D), em comparação ao grupo CON (Fig. 6 A). Quando comparada a adiposidade entre os grupos, observamos um aumento na adiposidade dos animais HCD e HCD-TBT em comparação aos CON (Fig. 6 G, $p < 0,05$, $n = 9-12$). Não foram observadas alterações significativas no peso corporal, peso corporal final, adiposidade entre os grupos CON e TBT, bem como entre os grupos HCD e HCD-TBT (Fig. 6 E, F e G $p < 0,05$, $n = 9-12$).

Foi observado um aumento no peso do tecido adiposo branco parametrial (TAP) dos grupos TBT (51 %), HCD (68 %) e HCD-TBT (75 %), em comparação ao grupo CON (Fig. 6 H, $p < 0,05$, $n = 9-12$). Também houve aumento no peso do tecido adiposo branco retroperitoneal (TARP) do grupo HCD quando comparado ao grupo CON (85 %, Fig. 6 I, $p < 0,05$, $n = 9-12$). Os grupos HCD e HCD-TBT apresentaram aumento no peso do tecido adiposo perivesical (TAPV) em comparação ao grupo CON, e também um aumento de TAPV no grupo HCD-TBT quando comparado ao grupo TBT (Fig. 6 J, $p < 0,05$, $n = 9-12$). Não houve diferença no TAP, TARP e TAPV entre os grupos CON e TBT, bem como entre os grupos HCD e HCD-TBT (Fig. 6 H, I e J, $p < 0,05$, $n = 9-12$). Em relação ao peso dos órgãos, não foram observadas alterações significativas nos pesos do coração, baço, pâncreas, fígado, rim, glândulas adrenais e útero entre as ratas CON, TBT, HCD e TBT-HCD (Tabela 1, $p < 0,05$, $n = 9-12$). Foi identificado aumento somente no peso do ovário do grupo HCD quando comparado os grupos CON e TBT (Tabela 1, $p < 0,05$, $n = 9-12$).

5.2 METABOLISMO DE GLICOSE ANORMAL NO GRUPO HCD-TBT

Foram observados aumentos nos níveis glicose durante o TSI no tempo de 90 min no grupo HCD em comparação ao grupo CON e no tempo de 120 min, também no grupo HCD quando em comparação com os grupos CON, TBT e HCD-TBT (Fig.6 K, $p < 0,05$, $n = 4-5$). A área sob a curva (AUC) no grupo HCD quando comparada os grupos CON e TBT também se mostrou aumentada (Fig. 6K, $p < 0,05$, $n = 4-5$). O grupo HCD-TBT também apresentou aumento nos níveis de glicose em TSI no tempo de 120 min quando comparado ao grupo CON (Fig.6 K, $p < 0,05$). Durante a realização do TTG, observamos um aumento nos níveis de glicose no tempo de 15 min nos grupos TBT, HCD e HCD-TBT em comparação ao grupo CON. A área sob a curva (AUC) se mostrou aumentada nos grupos TBT (26 %), HCD (27 %) e HCD-TBT (28,5 %) em relação ao grupo CON (Fig. 6 L, $p < 0,05$, $n = 4-5$).

5.3 PERFIL LIPÍDICO ANORMAL NOS ANIMAIS DO GRUPO HCD-TBT

Perfis lipídicos dislipidêmicos foram observados nos animais dos grupos HCD e HCD-TBT (Tabela 2, $p < 0,05$, $n = 9-10$). Houve um aumento dos níveis séricos de colesterol total nos grupos HCD e HCD-TBT quando comparados ao grupo CON, e um aumento semelhante foi observado quando comparados ao grupo TBT. Os níveis de LDL se mostraram aumentados no grupo HCD em relação aos grupos CON, TBT E HCD-TBT. Os níveis de VLDL no grupo HCD-TBT se mostraram aumentados em comparação com os grupos CON e TBT. Os triglicerídeos séricos aumentaram nos grupos CON, TBT e HCD-TBT em comparação ao grupo HCD, e de forma que o grupo HCD-TBT ainda se mostrou aumentado quando comparado aos grupos CON e TBT. Houve aumento nos níveis de HDL no grupo HCD-TBT quando comparado aos grupos TBT e HCD e o grupo HCD ainda mostrou HDL aumentado em comparação com o grupo TBT. Foi observado um aumento no índice TYG no grupo HCD-TBT em comparação aos grupos CON e TBT. (Tabela 2, $p < 0,05$, $n = 9-10$).

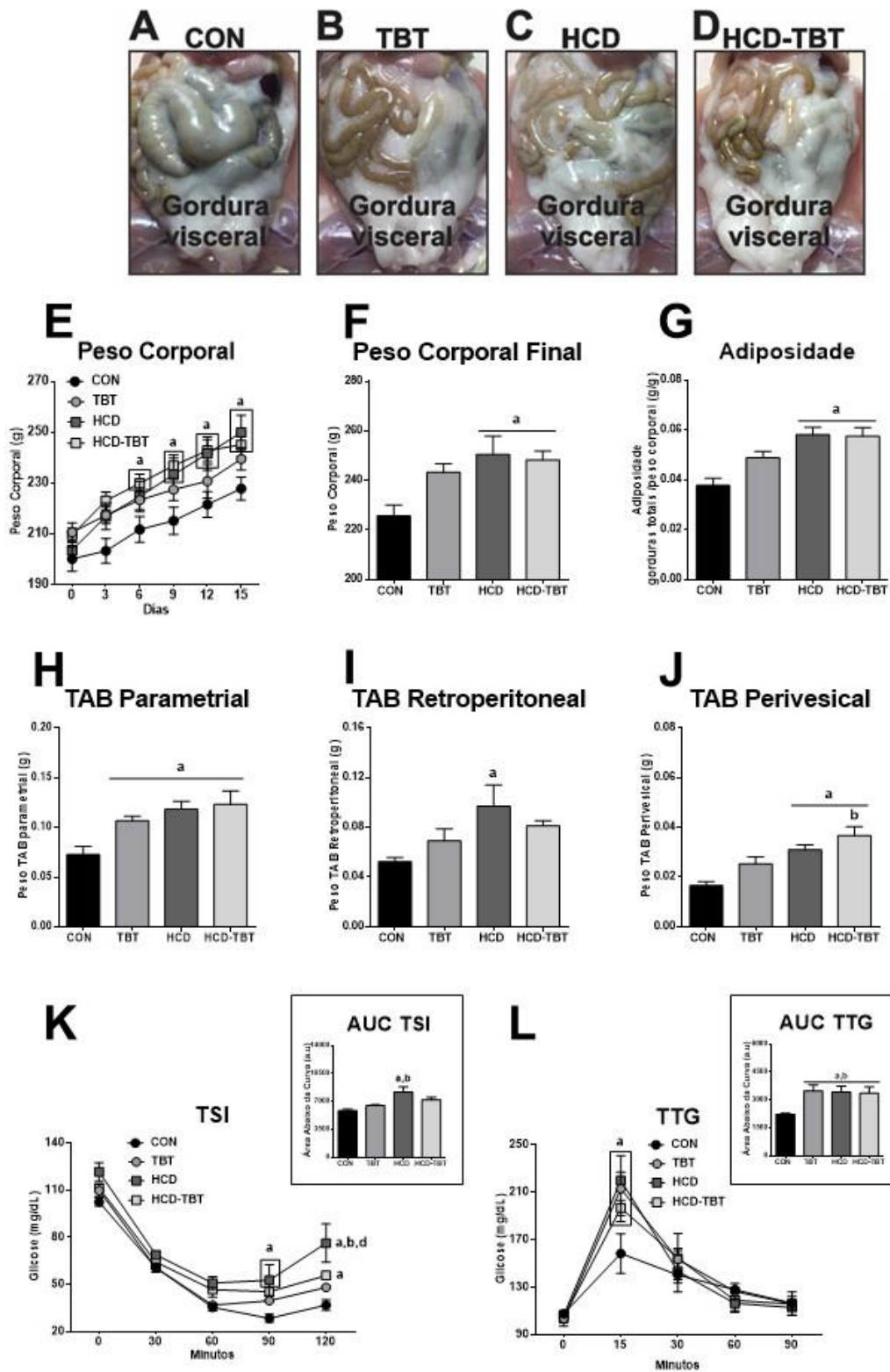


Figura 6: Parâmetros metabólicos. A dissecação abdominal representativa mostrou aumento aparente na gordura visceral em ratos (B) TBT, (C) HCD e (D) HCD-TBT em comparação com ratos (A) CON. O peso das gorduras foi normalizado pelo comprimento da tíbia dos animais. Peso corporal aumentado (E), peso corporal final (F) e adiposidade (G) em ratos HCD e HCD-TBT (n = 9-12). (H) Aumenta do peso da gordura parametrial em ratos TBT, HCD e HCD-TBT. (I) Aumento do peso da gordura retroperitoneal em ratos HCD. (J) Aumento do peso perivisceral em ratos HCD e HCD-TBT (n = 9-12). (K) Teste

de sensibilidade à insulina (TSI) anormal e área sob a curva (AUC, direita) em ratos HCD (n = 4-5). (L) Teste de tolerância à glicose (TTG) anormal e área sob a curva (AUC, direita) em ratos TBT, HCD e HCD-TBT (n = 4-5). a, p <0,05 vs CON; b, p <0,05 vs TBT; c, p <0,05 vs HCD; d, p <0,05 vs HCD-TBT (ANOVA de uma via, ANOVA de duas vias, teste de comparação múltipla de Tukey). (n = 4-12).

Tabela 1 – Avaliação do peso dos órgãos

Órgãos (mg/mm)	CON	TBT	HCD	HCD-TBT
Coração	26,43 ± 1,90	24,92 ± 1,30	23,67 ± 1,70	24,21 ± 1,19
Baço	14,87 ± 1,14	15,57 ± 3,67	16,86 ± 0,45	15,89 ± 0,34
Pâncreas	15,33 ± 1,87	14,79 ± 1,29	17,86 ± 2,52	14,70 ± 0,59
Fígado	249,8 ± 14,36	257,1 ± 7,74	263,6 ± 12,87	265,3 ± 6,17
Adrenal	1,99 ± 0,12	1,84 ± 0,11	1,57 ± 0,11	1,96 ± 0,17
Rins	44,61 ± 1,75	43,72 ± 0,67	41,42 ± 1,72	44,62 ± 2,43
Ovário	1,94 ± 0,17	2,29 ± 0,15	3,28 ± 0,48 a, b	2,51 ± 0,19
Útero	10,27 ± 2,17	9,30 ± 1,18	9,00 ± 0,98	12,59 ± 2,05

O peso dos órgãos foi normalizado pelo comprimento da tíbia dos animais, sendo expressos em mg/mm. CON: Controle; TBT: Tributilestanho; HCD: Dieta rica em carboidratos; HCD-TBT: Dieta rica em carboidratos + Tributilestanho; a: p <0,05 com CON; b: p <0,05 com TBT; c: p <0,05 com HCD; d: p <0,05 com HCD-TBT. Valores expressos como média ± EPM (n = 9-10).

Tabela 2 – Perfil lipídico

Lipídios	CON	TBT	HCD	HCD-TBT
Colesterol Total (mg/dL)	46,80 ± 3,36	44,06 ± 4,64	75,18 ± 6,93 a, b	74,10 ± 4,13 a, b
LDL (mg/dL)	9,15 ± 1,35	20,22 ± 4,98	43,08 ± 5,27 a, b, d	22,31 ± 2,68
VLDL (mg/dL)	23,42 ± 1,47	20,58 ± 2,43	25,79 ± 1,29	30,61 ± 1,34 a, b
HDL (mg/dL)	25,14 ± 2,25	17,89 ± 1,88	24,25 ± 1,74	32,95 ± 2,52 b, c
Triglicérides (mg/dL)	117,11 ± 7,35	102,91 ± 12,19	128,90 ± 6,47	153,10 ± 6,70 a, b
Índice TYG	4,68 ± 0,05	4,64 ± 0,07	4,81 ± 0,03	4,91 ± 0,02 a, b

CON: Controle; TBT: Tributilestanho; HCD: Dieta rica em carboidratos; HCD-TBT: Tributilestanho; LDL: Lipoproteínas de baixa densidade; HDL: Lipoproteínas de alta densidade; VLDL: Lipoproteínas de densidade muito baixa; Índice TYG: Índice de triglicerídeo-glicose; a: p <0,05 com CON; b: p <0,05 com TBT; c: p <0,05 com HCD; d: p <0,05 com HCD-TBT. Valores expressos como média ± EPM (n = 9-10).

5.4 ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA NOS ADIPÓCITOS DO GRUPO HCD-TBT

Observamos uma redução no número de adipócitos dos grupos TBT (51 %), HCD (42 %) e HCD-TBT (60 %) em comparação ao CON, sendo que o grupo HCD-TBT apresentou-se ainda mais reduzido, quando comparado aos grupos TBT e HCD, (Fig.7 M, p < 0,05, n = 5-6). Houve aumento no diâmetro dos adipócitos dos grupos TBT (280 %), HCD (30 %) e HCD-TBT (330 %) em comparação ao grupo CON, novamente, o grupo HCD-TBT se mostrou ainda

mais aumentado em comparação aos grupos TBT e HCD (Fig.7 N, $p < 0,05$, $n = 5-6$). O TAP corado com H&E sugeriu uma hipertrofia dos adipócitos dos animais dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT em comparação ao grupo CON (Fig.7 A, D, G e J, $p < 0,05$, $n = 5-6$).

5.5 AUMENTO DO NÚMERO DE MASTÓCITOS DO TAP NO GRUPO HCD-TBT

Observamos o aumento no número de mastócitos do TAP dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT em comparação ao grupo CON (Fig. 7 B, E, H, K e O, $p < 0,05$, $n = 5-6$).

5.6 AUMENTO DA DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR DO TAP NO GRUPO HCD-TBT

Foi observado um aumento na deposição de matriz extracelular no TAP dos grupos TBT (210%), HCD (178) e HCD-TBT (250%) em comparação ao grupo CON (Fig. 7 C, F, I, L e P, $p < 0,05$, $n = 5-6$). No grupo HCD-TBT um aumento ainda mais importante, quando comparado aos grupos TBT e HCD. Já o grupo HCD quando comparado ao TBT, mostrou uma redução na deposição de matriz celular no TAP (Fig.7 P, $p < 0,05$, $n = 5-6$).

5.7 O GRUPO HCD-TBT APRESENTOU ANORMALIDADES NO CICLO ESTRAL

Os animais dos grupos TBT e HCD-TBT exibiram ciclos estrais irregulares e com maior duração quando comparados ao grupo CON (Fig.8 A e B, $p < 0,05$, $n = 12$, CON: $4,84 \pm 0,11$; TBT: $6,56 \pm 0,53$; HCD: $5,70 \pm 0,13$; HCD-TBT: $6,11 \pm 0,19$ dias). Os animais dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT permaneceram por mais dias na fase de metaestro-diestro em comparação ao grupo CON (Fig.8 B, $p < 0,01$, $n = 12$, CON: $2,05 \pm 0,07$; TBT: $3,40 \pm 0,35$; HCD: $3,15 \pm 0,14$; HCD-TBT: $3,10 \pm 0,15$ dias). Houve um aumento na duração do ciclo estral dos animais dos grupos TBT e HCD-TBT em comparação ao grupo CON (Fig.8 B, $p < 0,05$, $n = 12$).

Análise Morfométrica e Histológica do Tecido Adiposo Branco

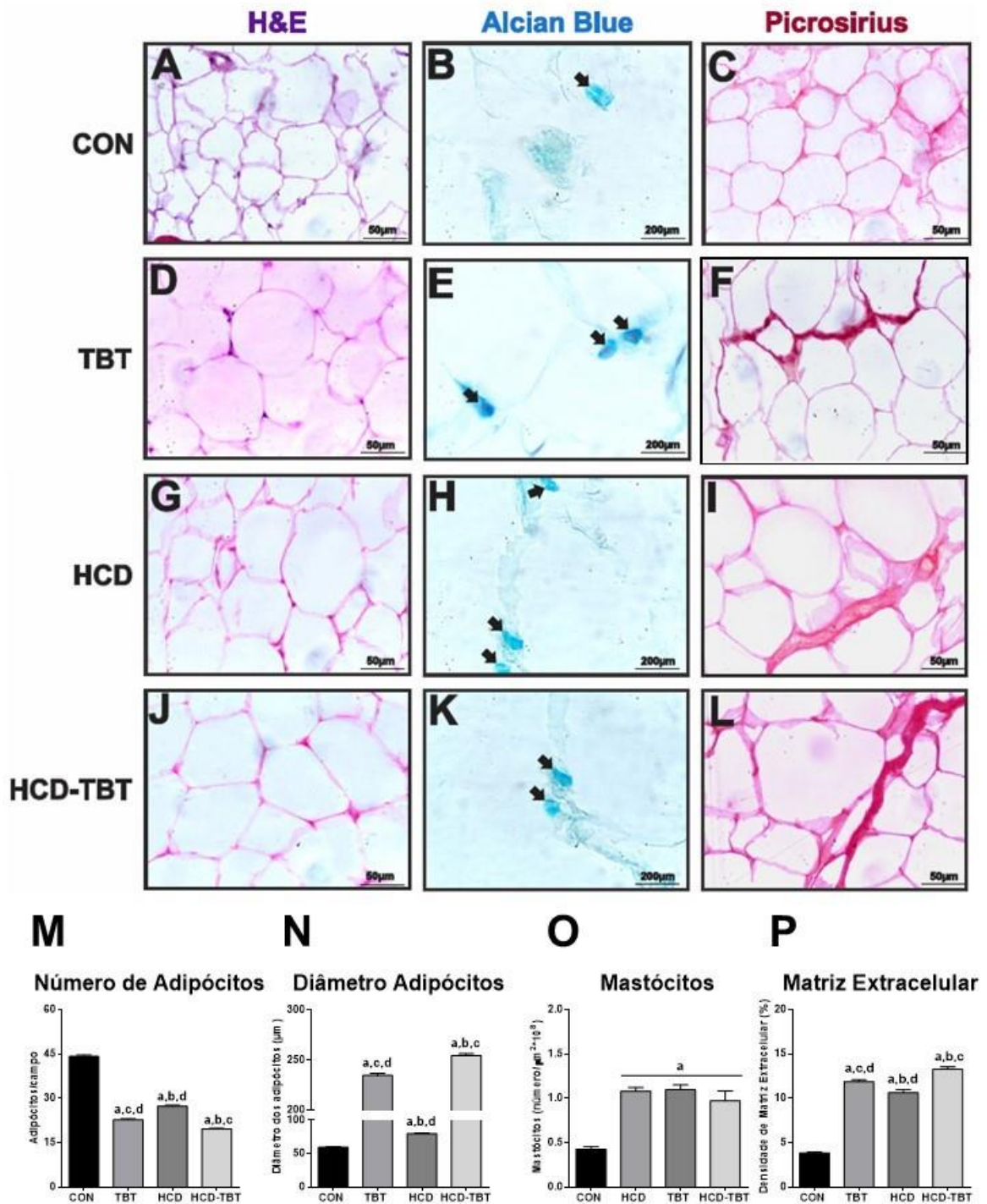


Figura 7: Morfologia dos adipócitos do TAB. Seções representativas de tecido adiposo branco parametrial (TAP) corados com hematoxilina e eosina (H&E), (A) CON, (D) TBT, (G) HCD e (J) HCD-TBT (n = 5-6). Seções representativas de mastócitos no TAP de ratos (B) CON, (E) TBT, (H) HCD e (K) HCD-TBT corados com *Alcian Blue* (seta) (n = 5-6). Representativo de deposição de matriz extracelular no TAP (C) CON, (F) TBT, (I) HCD e (L) HCD-TBT corados com *Picrosirius red* (n = 5-6). (M) Número de adipócitos, (N) Diâmetro do adipócito, (O) Número de mastócitos (P) Deposição de colágeno, a, p <0,05 vs CON; b, p <0,05 vs TBT; c, p <0,05 vs HCD; d, p <0,05 vs HCD-TBT (ANOVA de uma via, teste de comparação múltipla de Tukey), (n = 5-6).

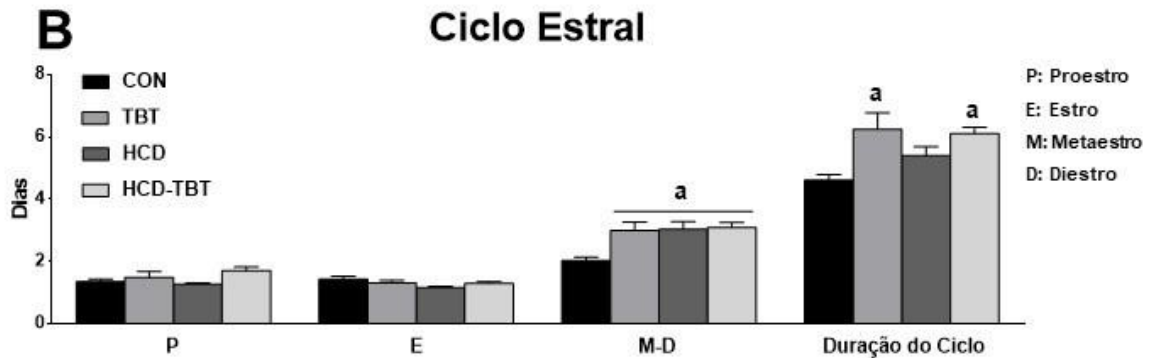
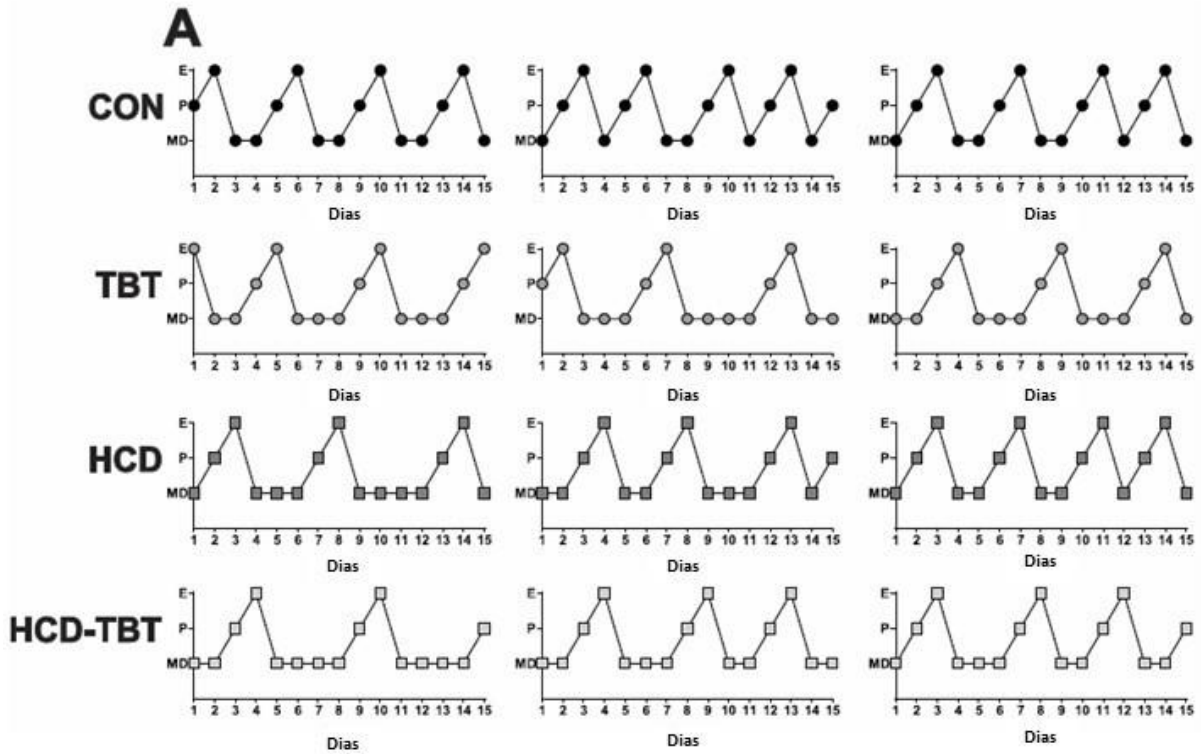


Figura 8: Avaliação do ciclo estral. (A) Representação gráfica do ciclo estral em ratas CON, TBT, HCD e HCD-TBT determinado por citologia vaginal por 15 dias, (B) Representação gráfica do número de dias em cada fase do ciclo estral e a duração total do ciclo: proestro (P), estro (E), metaestro-diestro (M-D). a, $p < 0,05$ vs CON; b, $p < 0,05$ vs TBT; c, $p < 0,05$ vs HCD; d, $p < 0,05$ vs HCD-TBT (ANOVA de uma via, teste de comparação múltipla de Tukey), (n = 12).

5.8 AUMENTO DOS NÍVEIS DE FSH E DIMINUIÇÃO DA TESTOSTERONA E AMH NO GRUPO HCD-TBT

Em relação aos hormônios sexuais, observamos um aumento nos níveis séricos de FSH basal no grupo HCD-TBT comparado aos grupos CON, TBT e HCD (Tabela 3, $p < 0,05$, $n = 5-6$).

Os níveis séricos de AMH se mostraram reduzidos nos grupos TBT (48%) e HCD-TBT (101%,) em comparação ao grupo CON. Sendo assim, foi observado um aumento na razão FSH / AMH no grupo HCD-TBT em comparação ao grupo CON (Tabela 3, $p < 0,05$, $n = 5-6$).

Houve também uma redução dos níveis séricos de testosterona (T) no grupo HCD-TBT quando comparado aos grupos CON, TBT e HCD. Não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos de P4 e E2 e nas relações P4 / T, P4 / E2 e E2 / T (Tabela 3, $p < 0,05$, $n = 5-6$).

Tabela 3 – Níveis dos hormônios sexuais

	CON	TBT	HCD	HCD-TBT
Hormônios				
FSH (mUI/mL)	3,27 ± 0,01	3,27 ± 0,021	3,35 ± 0,03	3,58 ± 0,08a
AMH (ng/mL)	10,60 ± 0,85	7,07 ± 0,45a	8,38 ± 1,25	5,15 ± 0,75a
P ₄ (ng/mL)	24,50 ± 11,50	24,75 ± 5,15	30,00 ± 5,80	46,50 ± 8,59
T (ng/mL)	0,42 ± 0,05	0,47 ± 0,04	0,48 ± 0,01	0,41 ± 0,04
E ₂ (pg/mL)	12,67 ± 1,76	12,00 ± 2,00	16,60 ± 0,81	15,80 ± 1,20
Razão				
P/T	68,58 ± 40,51	54,60 ± 12,71	63,83 ± 13,32	123,0 ± 22,95
P/E	1,67 ± 0,58	2,26 ± 0,17	1,82 ± 0,36	2,93 ± 0,44
T/E	0,03 ± 0,90,10 ⁻²	0,04 ± 0,51,10 ⁻²	0,03 ± 0,10, 10 ⁻²	0,03 ± 0,32, 10 ⁻²
FSH/AMH	1,47,10 ⁻² ± 0,14,10 ⁻²	2,10,10 ⁻² ± 0,23,10 ⁻²	2,13, 10 ⁻² ± 0,49,10 ⁻²	3,50,10 ⁻² ± 0,49,10 ⁻² a

CON: Controle; TBT: Tributilestanho; HCD: Dieta rica em carboidratos; HCD / TBT: Dieta rica em carboidratos e Tributilestanho; FSH: Hormônio folículo-estimulante; AMH: Hormônio anti-mülleriano; P₄: Progesterona; E₂: Estradiol; T: Testosterona; P / T: Proporção de progesterona por testosterona; P / E: Proporção de progesterona por estrogênio; T / E: Proporção de testosterona por estrogênio; FSH / AMH: Relação hormônio folículo-estimulante por hormônio anti-mülleriano; p: valor de p, $p < 0,05$ vs, CON (ANOVA de uma via); Valores expressos como média ± EPM, ($n = 5$).

5.9 AVALIAÇÃO DA RESERVA FOLICULAR OVARIANA

Além do prejuízo funcional ovariano, os grupos TBT, HCD e HCD-TBT apresentaram anormalidades morfológicas e distúrbio na foliculogênese (Fig. 9 A, B, C, D e E, n = 5–6). Os grupos TBT (28,5%), HCD (22%) e HCD-TBT (43%) apresentaram menor quantidade de folículos ovarianos primordiais quando comparados ao grupo CON (Fig.9 C e D, $p < 0,05$, n = 5-6). Em relação aos folículos ovarianos primários, também houve uma redução nos grupos TBT (46,6%), HCD (39%), HCD-TBT (65,3%) quando comparados ao CON (Fig.9 B, C e D, $p < 0,05$, n = 5-6).

5.10 EXPOSIÇÃO COMBINADA DE HCD-TBT PIOROU A RESERVA FOLICULAR OVARIANA E O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

Os grupos TBT (63,4%), HCD (67,7%) e HCD-TBT (77%) mostraram uma redução no número de CL em comparação ao grupo CON (Fig. 9 A, B, C, D e E, $p < 0,01$, n = 5 –6). Também houve um aumento no número de folículos císticos (Cis) nos grupos TBT (127%), HCD (112,9%) e HCD-TBT (103,5%) quando comparados ao grupo CON (Fig. 9 E, $p < 0,01$, n = 5-6). Identificamos o aumento no número de folículos atrésicos (At) dos grupos TBT (91,7%) HCD (97,2%) e HCD-TBT (101%) em comparação com o CON (Fig. 9 E, $p < 0,01$, n = 5-6). Número semelhante de folículos ovarianos pré-antrais e antrais foram encontrados nos grupos CON, TBT, HCD e HCD-TBT (Tabela 4, $p < 0,05$, n = 5-6). Ainda houve uma redução nos folículos ovarianos totais saudáveis nos grupos TBT e HCD-TBT em comparação aos ovários CON, além de um aumento no número de folículos ovarianos não saudáveis nos grupos TBT, HCD e HCD-TBT (Tabela 4, $p < 0,05$, n = 5-6).

No grupo TBT houve redução da área da teca em comparação ao grupo CON, por outro lado o grupo HCD apresentou redução na espessura da camada granulosa quando também comparado ao grupo CON. Finalmente, o grupo HCD-TBT apresentou tanto uma redução na área da teca como também na camada granulosa quando comparado ao grupo CON (Tabela 4, $p < 0,05$, n = 5-6).

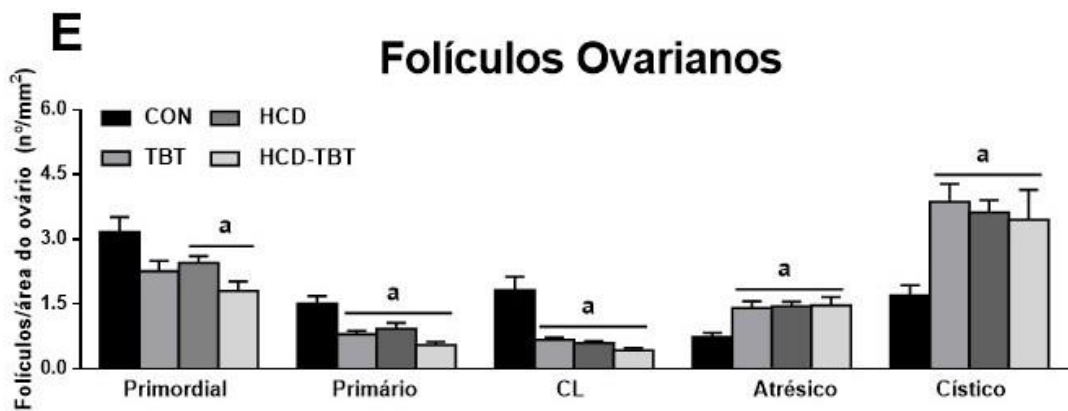
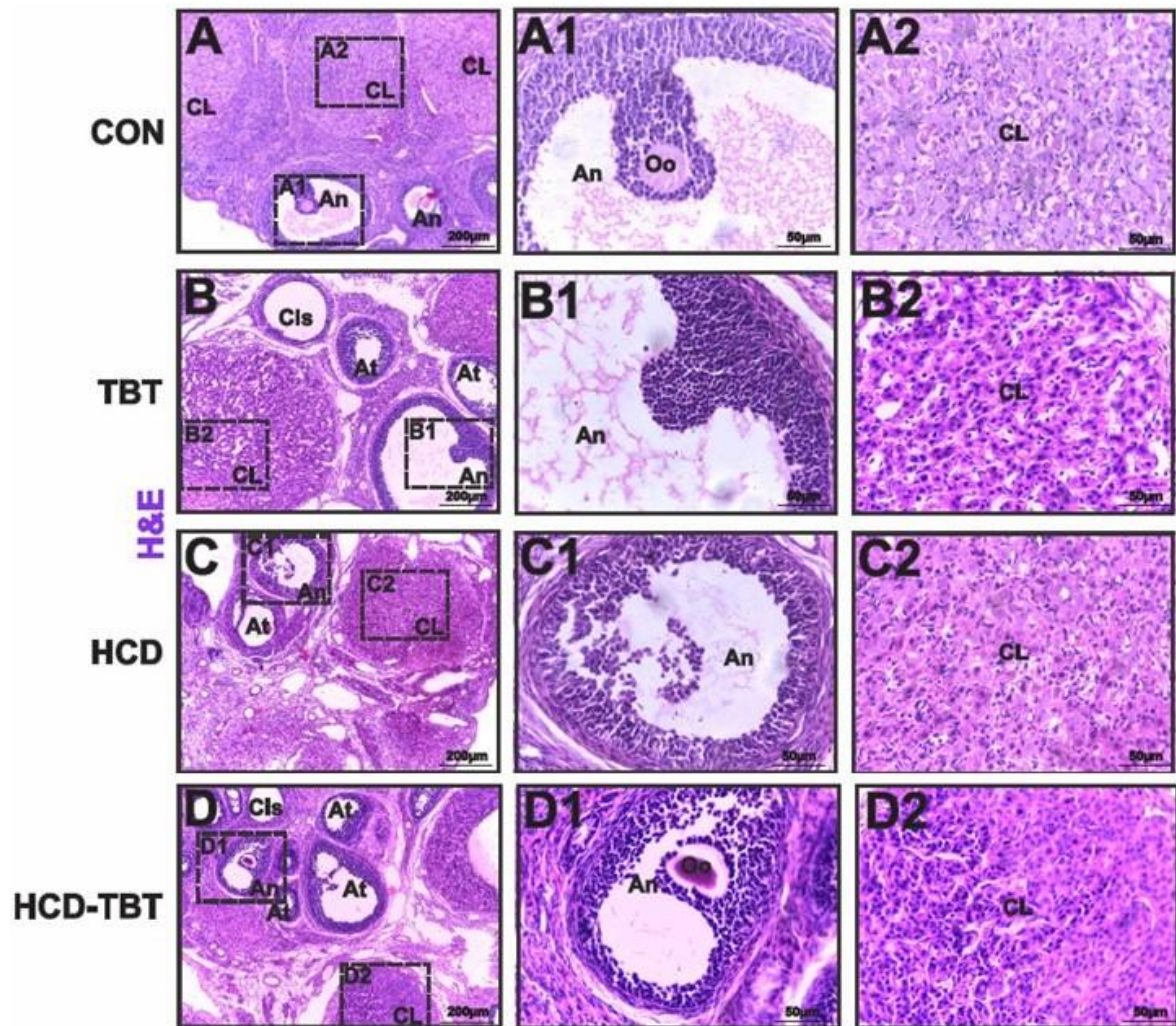


Figura 9: Morfologia dos ovários e desenvolvimento folicular. Seções representativas de (A, A1, A2) CON, (B, B1, B2) TBT, (C, C1, C2) HCD e (D, D1, D2) HCD-TBT. Os ovários foram corados com H&E, (CL) indica corpos lúteos, folículos císticos (Cls), folículos antrais (An), oócitos (Oo) e folículos atrésicos (At). (E) Redução dos folículos ovarianos primordiais, folículos ovarianos primários e número CL em ratas TBT, HCD e HCD-TBT. (E) Aumento de folículos atrésicos e císticos ovarianos em TBT, HCD e Ratas HCD-TBT. (E) a, $p < 0,05$ vs CON; b, $p < 0,05$ vs TBT; c, $p < 0,05$ vs HCD; d, $p < 0,05$ vs HCD-TBT (ANOVA de uma via, teste de comparação múltipla de Tukey), (n = 5-6).

Tabela 4 – Morfometria dos folículos ovarianos

	CON	TBT	HCD	HCD-TBT
Parâmetros Ovarianos				
Pré-antral	0,543 ± 0,102	0,506 ± 0,055	0,484 ± 0,067	0,465 ± 0,112
Antral	0,619 ± 0,105	0,477 ± 0,056	0,554 ± 0,073	0,531 ± 0,071
Saudáveis	2,590 ± 0,239	1,787 ± 0,112 a	1,970 ± 0,148 t: a	1,538 ± 0,181 a
Não saudáveis	2,383 ± 0,306	5,275 ± 0,507 a	5,076 ± 0,342 a	4,797 ± 0,838 a
Folículos Totais	4,973 ± 0,447	7,062 ± 0,508 t: a	7,046 ± 0,477 t: a	6,335 ± 1,008
Área da Teca	6379 ± 306	5025 ± 136 a	5683 ± 430	4859 ± 181 a
Espessura da Granulosa	156 ± 8,703	131 ± 7,274 t: a	129 ± 6,934 a	115 ± 4,518 a

CON: Controle; TBT: Tributilestanho; HCD: Dieta rica em carboidratos; HCD-TBT: Dieta rica em carboidratos e Tributilestanho; Saudáveis: Soma dos folículos em desenvolvimento; Não saudáveis: Soma dos folículos atrésicos e císticos. a: $p < 0,05$ com CON; t: a: Tendência com CON; ANOVA de uma via. Valores expressos como média ± EPM, (n = 9-10).

5.11 EXPOSIÇÃO COMBINADA DE HCD-TBT PREJUDICA MORFOLOGIA UTERINA

Após a análise microscópica uterina, observamos que os animais dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT apresentavam úteros com características sugestivas de atrofia em comparação aos úteros dos animais CON (Fig. 10 A, A1, A2, B, B1, B2, C, C1, C2, D, D1 e D2, n = 5– 6). Uma das características sugestivas de atrofia observada, foi o aumento na espessura do epitélio luminal (EL) nos grupos HCD e HCD-TBT quando comparado aos grupos CON e TBT (Fig.10 E $p < 0,05$, n = 5-6). Também foi identificada a redução na espessura do endométrio (End) e do miométrio (Myo) dos úteros dos animais dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT quando comparados ao grupo CON (Fig. 10 F e 10 G, $p < 0,05$, n = 5–6). Além disso, o número de glândulas uterinas endometriais (GE) nos úteros dos animais TBT, HCD e HCD-TBT, reduziu quando comparados ao número GE nos úteros dos animais CON (Fig. 10 H, $p < 0,05$, n = 5 – 6).

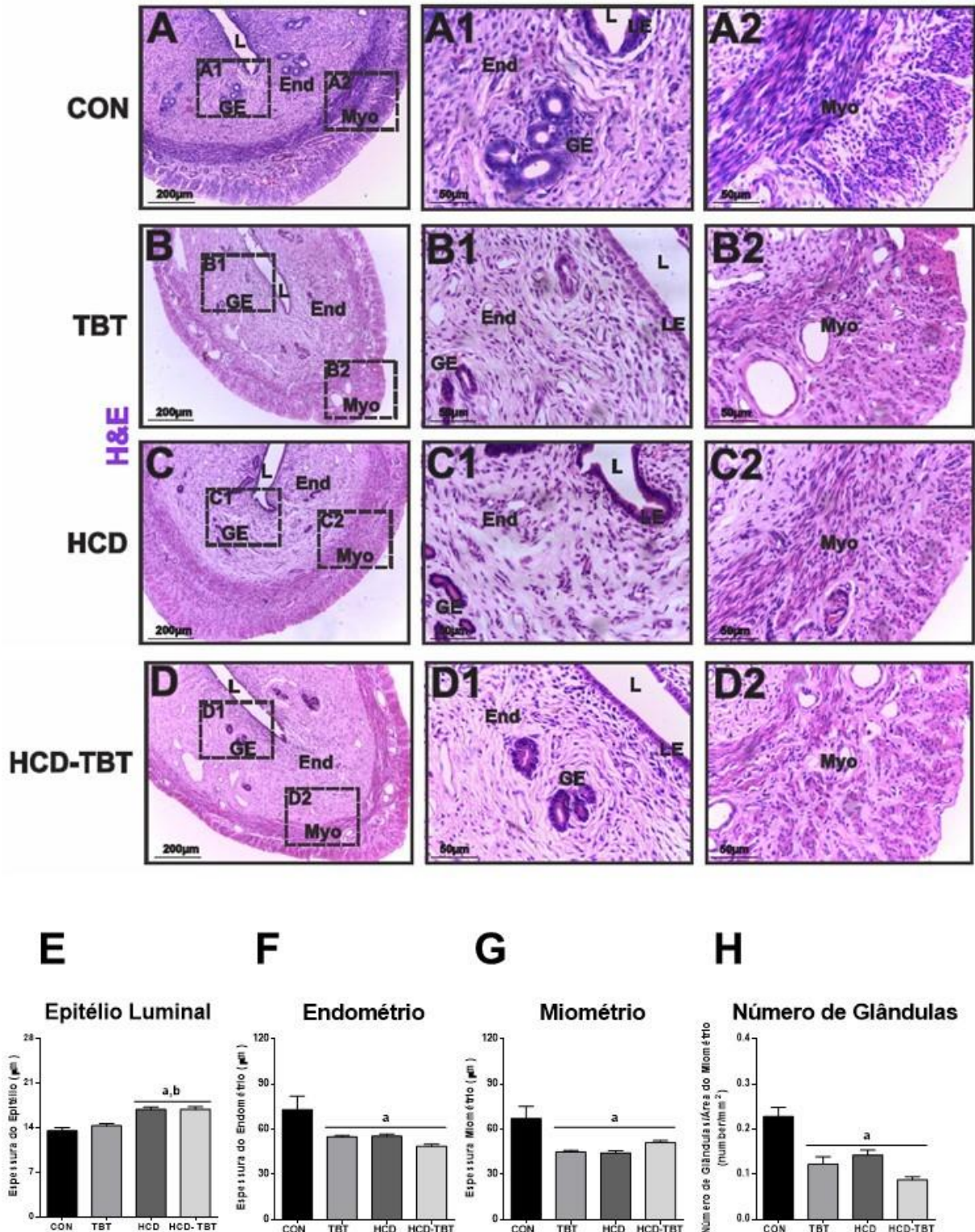


Figura 10: Análise morfométrica do útero. Seções representativas de ovários (A, A1, A2) CON, (B, B1, B2) TBT, (C, C1, C2) HCD e (D, D1, D2) HCD-TBT foram corados com H&E, indicador de atrofia no útero TBT, HCD e HCD-TBT. End: endométrio, Myo: miométrio, L: lúmen, LE: epitélio luminal, GE: glândulas endometriais; (E) Epitélio luminal, (F) Espessura do endométrio e (G) Espessura do miométrio, (H) Número de glândulas uterinas reduzidas em ratas TBT, HCD e HCD-TBT. a, $p < 0,05$ vs CON; b, $p < 0,05$ vs TBT; c, $p < 0,05$ vs HCD; d, $p < 0,05$ vs HCD-TBT (ANOVA de uma via, teste de comparação múltipla de Tukey), (n = 5-6).

5.12 GRUPO HCD-TBT APRESENTOU INFLAMAÇÃO DO TRATO REPRODUTIVO

Pudemos observar um aumento no número de mastócitos nos ovários dos animais dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT em comparação ao CON (Fig.11A, C, E, G, E e I, $p < 0,05$, $n = 5-6$). Da mesma forma, houve aumento no número de mastócitos no útero dos animais dos grupos HCD e HCD-TBT quando comparados ao grupo CON (Fig.11B, F, H e J, $P < 0,05$, $n = 5-6$).

5.13 EXPOSIÇÃO COMBINADA DE HCD-TBT CONTRIBUI PARA O AUMENTO NA DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR NO TRATO REPRODUTIVO

A deposição de matriz extracelular no trato reprodutivo foi avaliada por meio da coloração de *Picrosirius* (Fig.12). Identificamos uma maior deposição de matriz extracelular nos ovários dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT quando comparados aos ovários do grupo CON (Fig.12 A, C, E, G e I, $p < 0,05$, $n = 5-6$). Também houve aumento na deposição de matriz extracelular uterina dos grupos TBT, HCD e HCD-TBT quando comparados aos úteros dos animais CON (Fig. 12 B, D, F, H e J, $p < 0,05$, $n = 5-6$).

5.14 CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES METABÓLICOS, CARACTERÍSTICAS SEMELHANTES A IOP E OUTRAS ANORMALIDADES REPRODUTIVAS

Para avaliar a relação entre os marcadores metabólicos, como por exemplo, o diâmetro dos adipócitos, os níveis séricos de LDL e de triglicerídeos, e o índice TYG; em relação as características semelhantes à IOP, como a reserva folicular ovariana, o número de folículos não saudáveis e totais, os níveis séricos de FSH e AMH, o número de mastócitos ovarianos; e também, a outras anormalidades reprodutivas, como a duração do ciclo estral, o número de CL e a deposição de matriz extracelular ovariana, foram realizadas análises de correlação par a par e o ajuste linear foi representado na Tabela 5. Foi observada uma correlação linear negativa entre o diâmetro dos adipócitos e a reserva ovariana ($p = 0,02$), entre o diâmetro dos adipócitos em relação ao número de CL ($p = 0,01$) e em relação aos níveis de AMH ($p = 0,01$). Uma correlação linear positiva foi observada entre o diâmetro dos adipócitos e a relação FSH / AMH ($p = 0,01$) e na deposição de matriz extracelular ovariana ($p = 0,01$). Os níveis de LDL foram

positivamente correlacionados com a duração do ciclo estral ($p = 0,01$). Os níveis de triglicérides se correlacionaram positivamente com a deposição de matriz extracelular ovariana ($p = 0,02$). Já o índice TYG correlacionou-se negativamente com o número de CL ($p = 0,03$), e positivamente com os níveis de FSH ($p = 0,02$) e com a deposição de matriz extracelular ovariana ($p = 0,01$). Nenhuma outra correlação significativa foi relatada, conforme observado na Tabela 5. Outras correlações significativas foram apontadas nas Fig.13, 14 e 15.

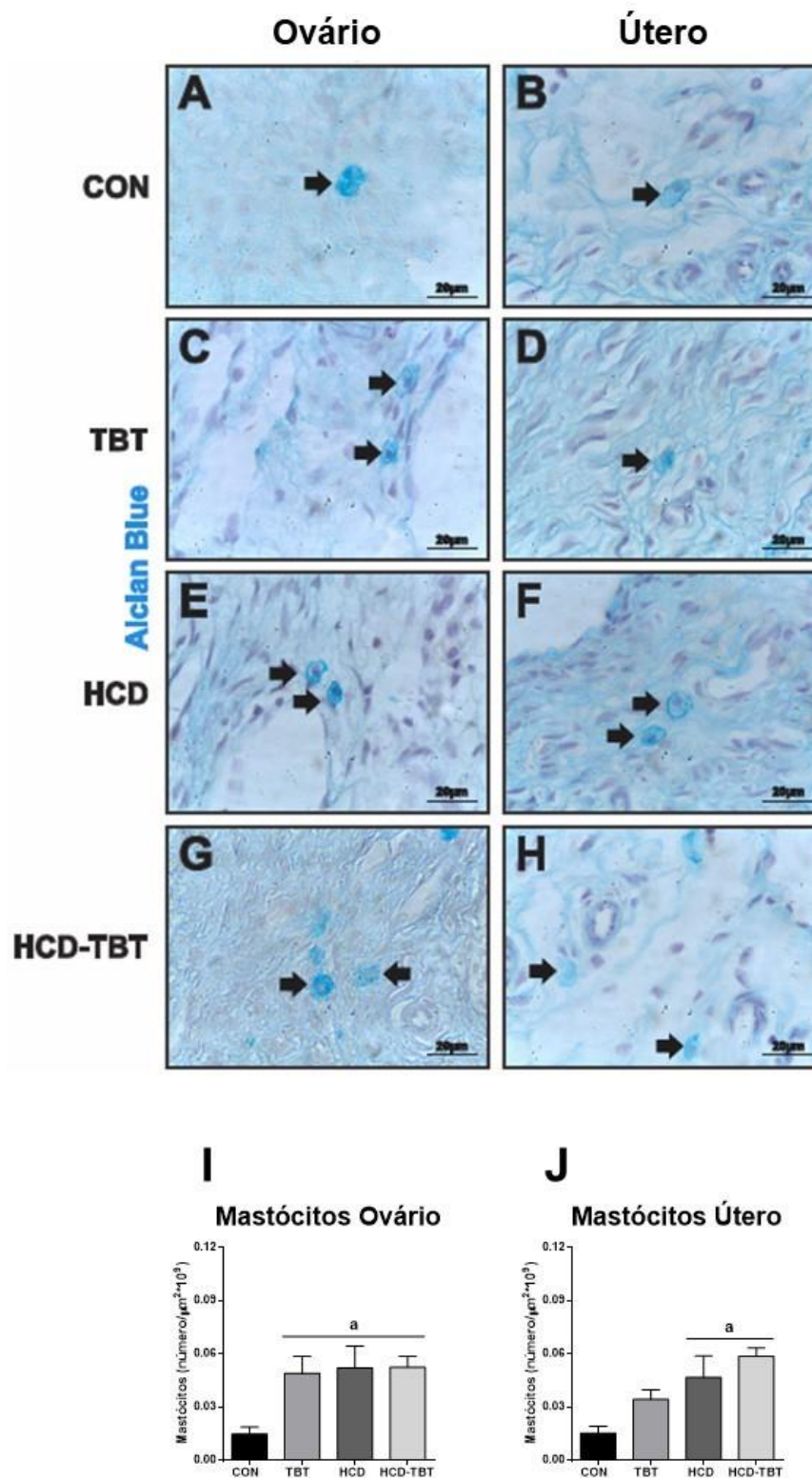


Figura 11: Inflamação no trato reprodutivo. Seções representativas de mastócitos nos ovários (A) CON, (C) TBT, (E) HCD e (G) HCD-TBT foram coradas com *Alcian blue* (seta). Mastócitos uterinos representativos em (B) CON, (D) TBT, (F) HCD e (H) HCD-TBT. Mastócitos em número aumentado no TBT, HCD e HCD-TBT (I) ovários e (J) útero. a, $p < 0,05$ vs CON; b, $p < 0,05$ vs TBT; c, $p < 0,05$ vs HCD; d, $p < 0,05$ vs HCD-TBT (ANOVA de uma via, teste de comparação múltipla de Tukey), (n = 5-6).

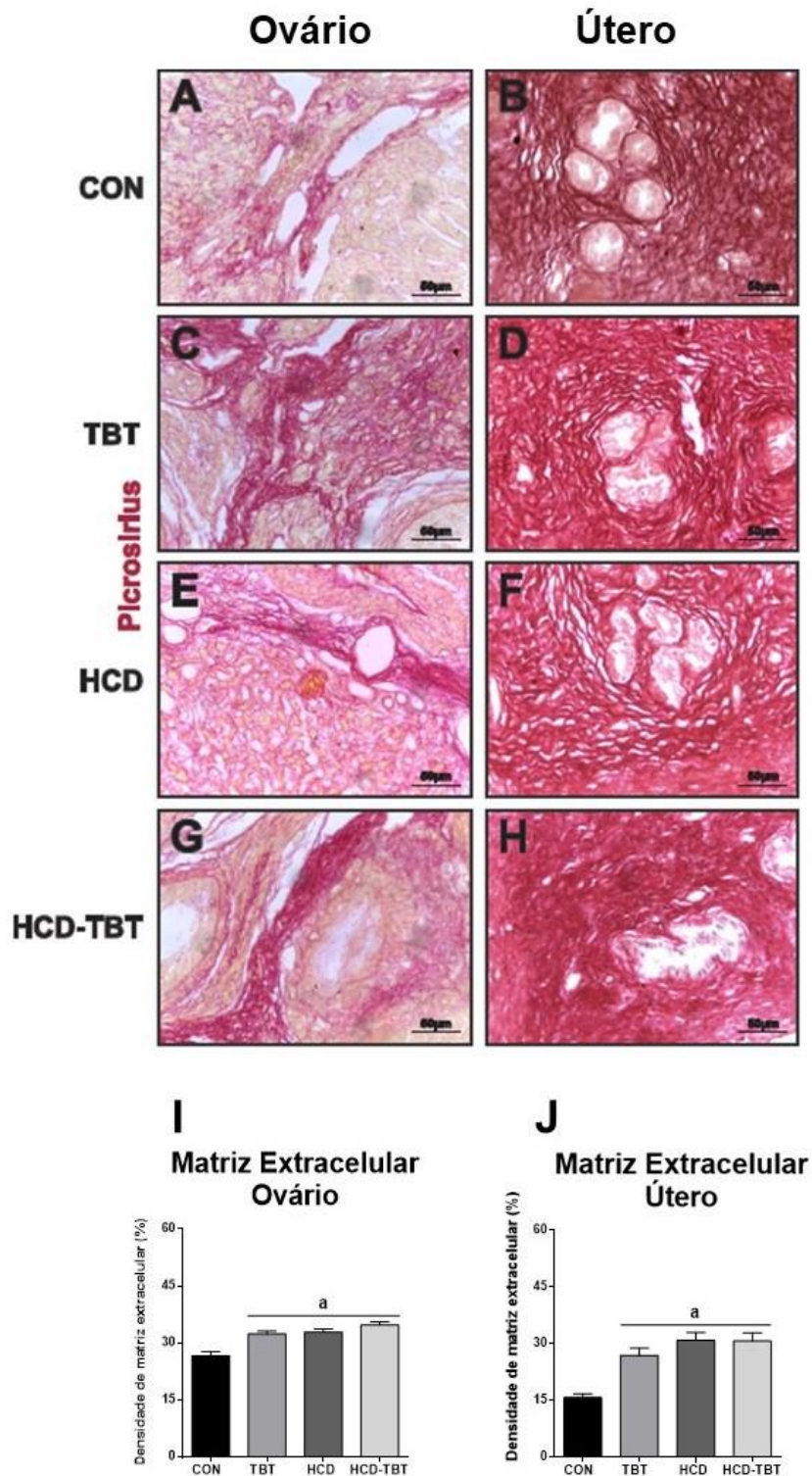


Figura 12: Densidade de Matriz Extracelular no trato reprodutivo. Seções representativas deposição de matriz extracelular dos ovários (A) CON, (C) TBT, (E) HCD e (G) HCD-TBT foram coradas com *Picrosirius red*. Avaliação da densidade de matriz extracelular uterino, representativo em ratas (B) CON, (D) TBT, (F) HCD e (H) HCD-TBT. Aumento na densidade matriz extracelular nos ovários TBT, HCD e HCD-TBT (I) e no útero (J). a, $p < 0,05$ vs CON; b, $p < 0,05$ vs TBT; c, $p < 0,05$ vs HCD; d, $p < 0,05$ vs HCD-TBT (ANOVA de uma via, teste de comparação múltipla de Tukey), (n = 5-6).

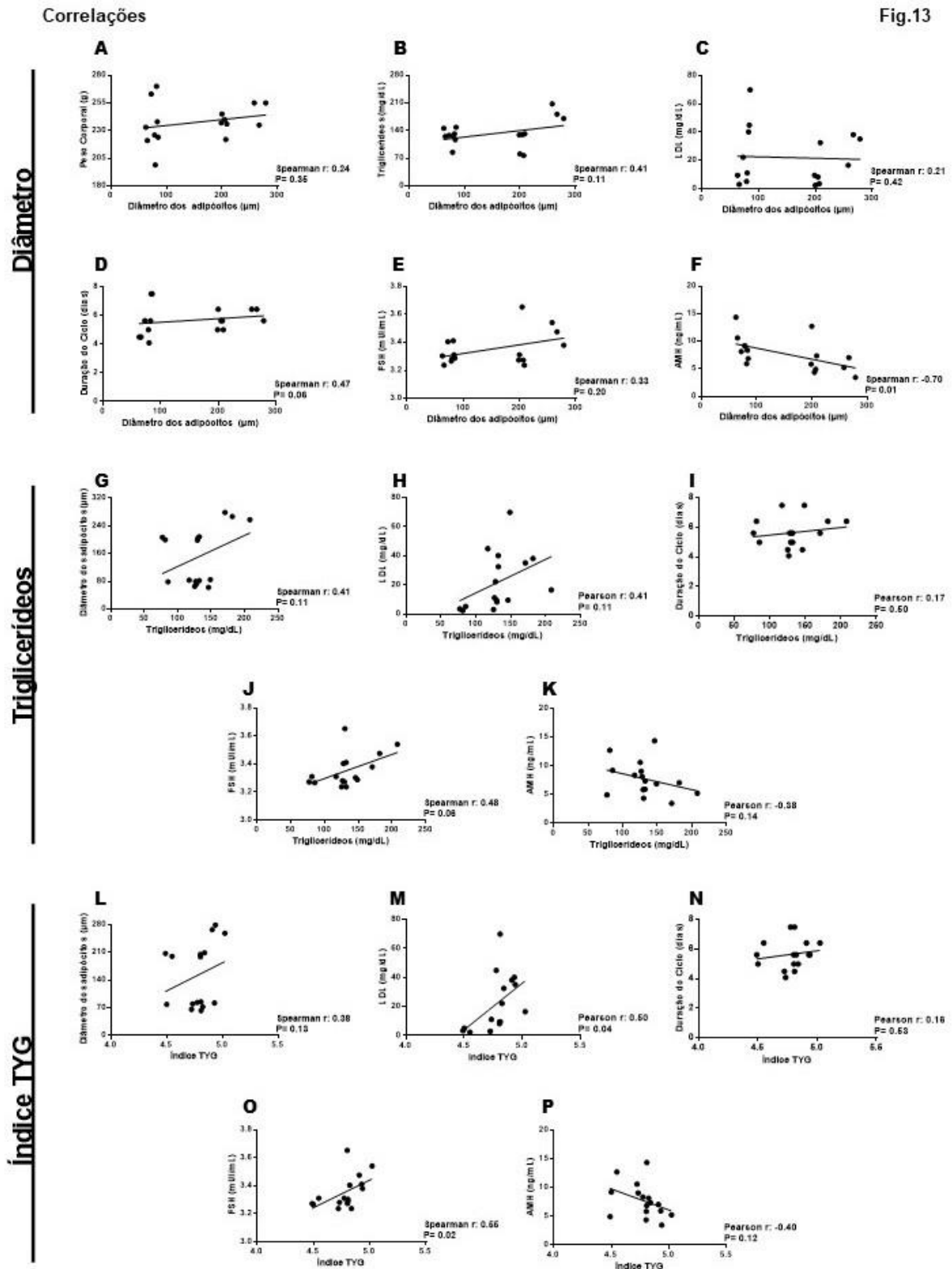
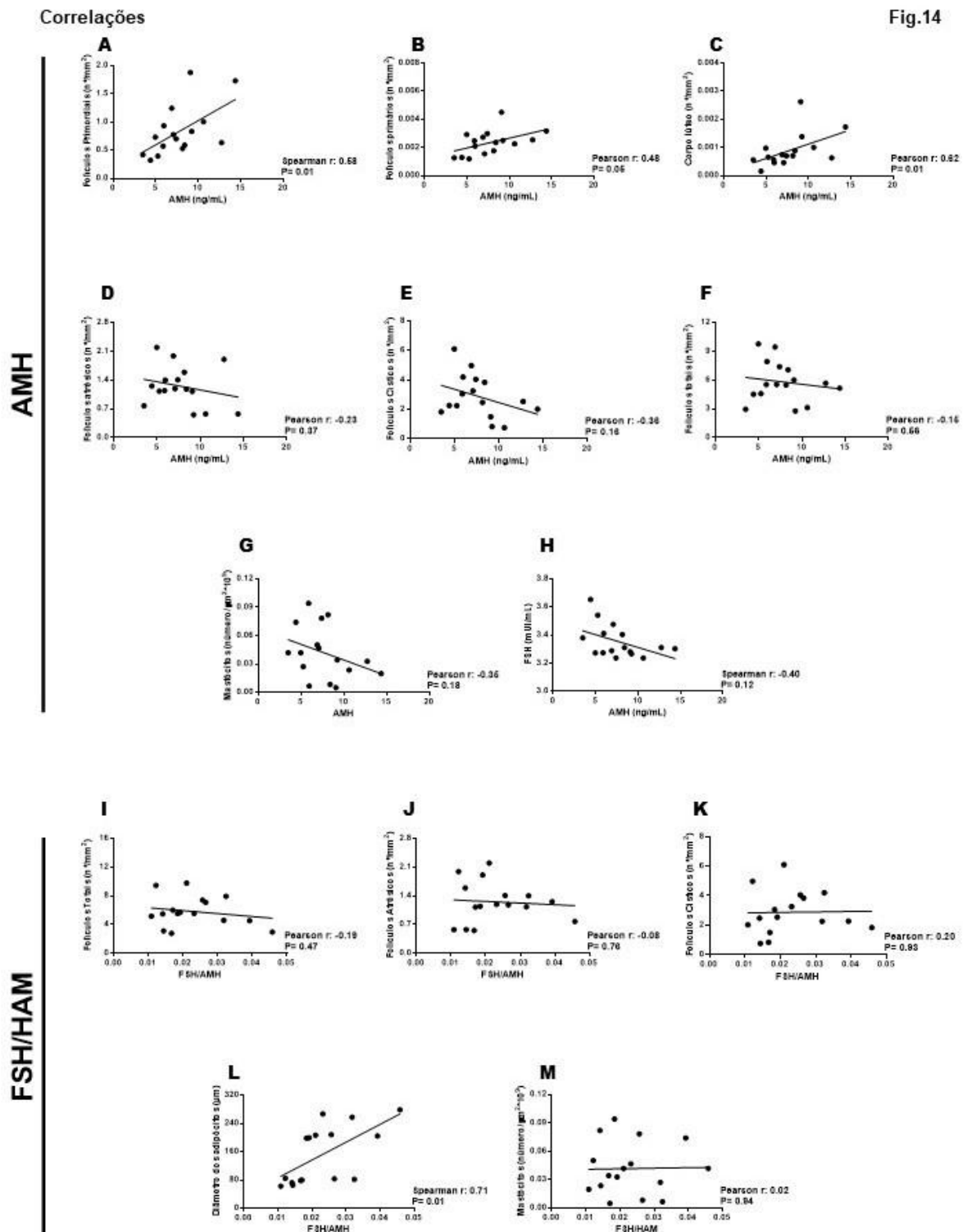


Figura 13: Correlações 1: A correlação entre o diâmetro dos adipócitos, os níveis de triglicérides séricos e o índice TYG. Os valores do diâmetro de adipócitos foram plotados com (A) peso corporal, (B) níveis de triglicérides, (C) níveis de LDL, (D) duração do ciclo estral, (E) níveis de FSH e (F) níveis de AMH. Os níveis de triglicérides eram correlacionados com (G) diâmetro de adipócito, (H) níveis de LDL, (I) duração do ciclo estral, (J) níveis de FSH e (K) níveis de AMH. O índice TYG foi correlacionado com (L) diâmetro dos adipócitos, (M) níveis de LDL, (N) duração do ciclo estral, (O) níveis de FSH e (P) níveis de AMH. Significância estatística ($p < 0,05$) foi testada usando o teste de *Spearman* ou *Pearson* se uma distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana, respectivamente, foi detectada.



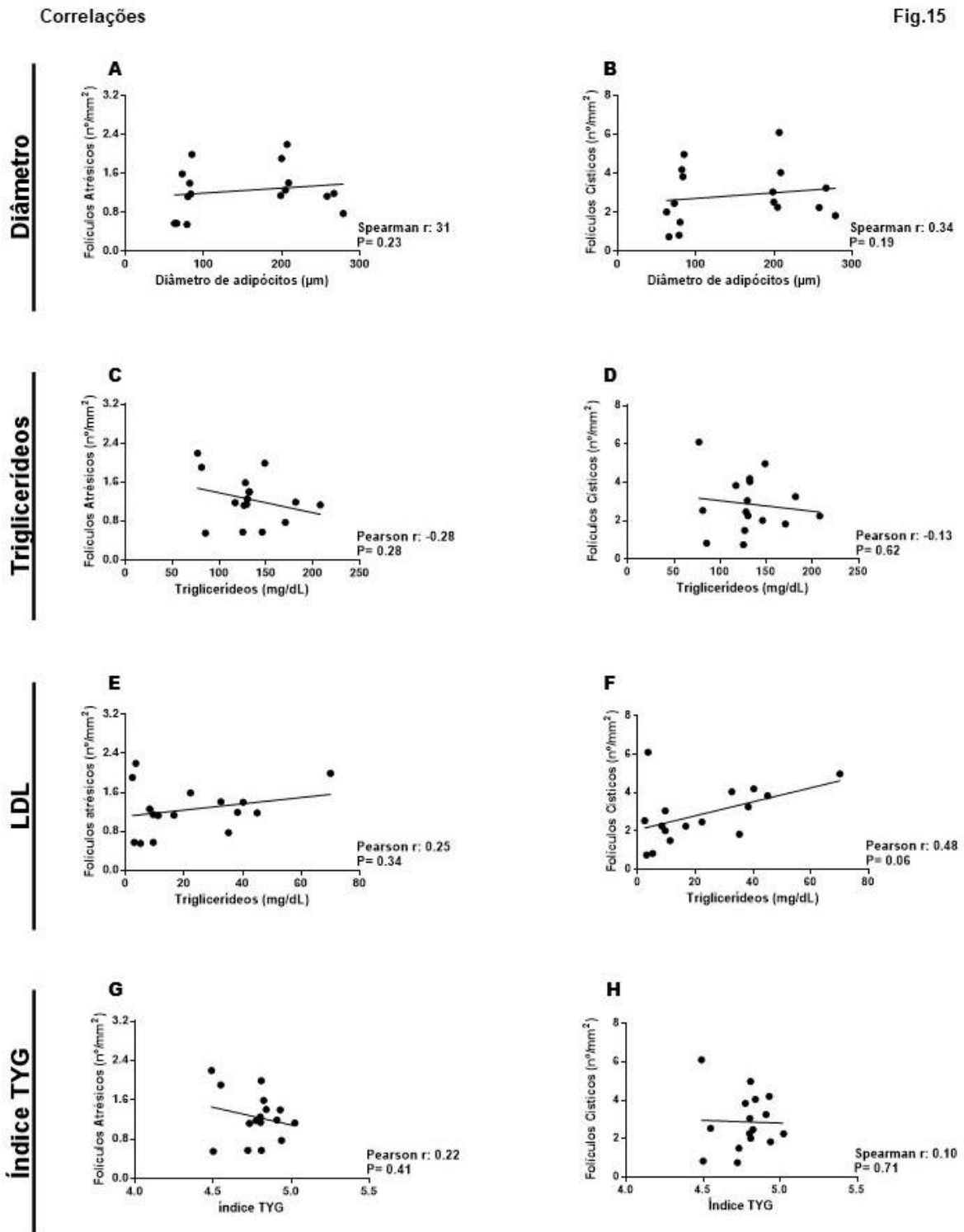


Figura 15. Correlações 3: A correlação entre o diâmetro dos adipócitos, triglicerídeos, LDL e índice TYG. Os valores do diâmetro de adipócitos foram plotados com (A) folículos atréticos, (B) folículos císticos. Os valores dos níveis séricos de triglicerídeos foram plotados com os (C) folículos atréticos, (D) folículos císticos. Os valores dos níveis séricos de LDL foram plotados com os (E) folículos atréticos, (F) folículos císticos. O índice TYG foi correlacionado com os (G) folículos atréticos, (H) folículos císticos. Significância estatística ($p < 0,05$) foi testada usando o teste de *Spearman* ou *Pearson* se uma distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana, respectivamente, foi detectada.

Tablela 5- Correlação entre marcadores metabólicos e características semelhantes a IOP.

	IOP- Características semelhantes																				
	Duração do ciclo		Reserva Ovariana		CL		Não saudáveis		Folículos Totais		FSH		AMH		FSH/AMH		Inflamação		Fibrose		
	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	Correlação r	P	
Marcadores metabólicos																					
Dímetro dos adipócitos	0.47	0.06	-0.55	0.02	-0.65	0.01	0.26	0.31	0.11	0.68	0.33	0.20	-0.70	0.01	0.71	0.01	0.36	0.16	0.82	0.01	
LDL	0.64	0.01	0.01	0.95	-0.25	0.33	0.37	0.15	0.45	0.07	0.33	0.19	-0.28	0.27	0.15	0.34	0.02	0.92	0.32	0.22	
Triglicerídeos	0.18	0.51	-0.12	0.63	-0.43	0.09	-0.09	0.72	-0.21	0.43	0.48	0.06	-0.38	0.14	0.35	0.35	0.01	0.94	0.58	0.02	
Índice TYG	0.16	0.53	-0.28	0.27	-0.52	0.03	0.02	0.94	-0.09	0.72	0.55	0.02	-0.40	0.12	0.45	0.07	0.06	0.79	0.58	0.01	

VLDL: Nível de lipoproteína de densidade muito baixa; Índice TYG: índice de triglicérides e glicose; IOP: Insuficiência ovária prematura; Reserva ovariana: Soma dos folículos ovarianos primordiais e primários; CL: corpo lúteo; FSH: hormônio folículo estimulante; Não saudáveis: Soma dos folículos atresicos e císticos; AMH: Hormônio Anti-Mülleriano; Inflamação: número de mastócitos ovarianos; Fibrose: acúmulo de colágeno ovariano. A significância estatística ($p < 0,05$) foi testada usando o teste de Spearman ou Pearson se uma distribuição de dados não gaussiana ou gaussiana, respectivamente, foi detectada. P: valor de p; n = 4.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo fornece evidências de que a exposição aguda ao HCD-TBT, de maneira combinada, por 15 dias, provocou efeitos metabólicos deletérios que se relacionam com alterações reprodutivas evidenciadas por uma piora na reserva folicular ovariana e no desenvolvimento folicular, pelo desenvolvimento de atresia uterina, inflamação e aumento na deposição de matriz extracelular no útero e nos ovários. Desta forma, podemos sugerir que os efeitos deletérios provocados pela exposição isolada ao TBT e a HCD foram potencializados pela exposição combinada, contribuindo para o desenvolvimento das características da IOP.

A exposição combinada de HCD-TBT provocou um aumento nos níveis de obesidade, aumento das camadas de gordura, inflamação dos adipócitos, aumento nos níveis séricos de colesterol total, VLDL, HDL, triglicerídeos e no índice TYG, caracterizando um quadro de dislipidemia, além de uma intolerância à glicose e RI. Também observamos uma morfologia anormal dos adipócitos, evidenciada pela hipertrofia celular e pelo aumento na deposição de matriz extracelular, sugestiva de fibrose tecidual nas em ratas *Wistar*. Além disso, uma forte correlação positiva foi observada entre o LDL sérico e o índice TYG, sugerindo sua associação com o marcador RI.

Nossos dados são consistentes com estudos anteriores que apoiam a ideia de que a exposição ao TBT e a alimentação com HCD levam a consequências deletérias da obesidade, como o aumento da adiposidade, associada a uma inflamação de baixo grau no tecido adiposo branco, a intolerância à glicose, a RI, a dislipidemia e outras disfunções fisiológicas em modelos de exposição aguda e ou de longo prazo em roedores (BERTULOSO et al., 2015; DE ARAÚJO et al., 2018; SENA et al., 2017). Dados de estudos anteriores já reportaram que a exposição ao TBT (100 ng / kg / dia) e a HCD por 15 dias causou um aumento no peso corporal de ratas *Wistar*, aumento da adiposidade, anormalidades no perfil lipídico, resistência insulínica, hipertrofia de adipócitos, inflamação e fibrose (DE ARAÚJO et al., 2018; NIÑO et al., 2020). Até onde sabemos, nenhum estudo relatou os efeitos da exposição aguda combinada de TBT e HCD na função metabólica e reprodutiva, desta forma, este estudo buscou comparar as consequências encontradas em nosso modelo atual com outros estudos que utilizaram outros modelos de DIO com consequências metabólicas ou reprodutivas semelhantes, como a própria exposição a HFD e pela exposição a dieta rica em gordura e açúcar (HFHS). Encontramos um único estudo de Chamorro-Garcia et al. (2018), que avaliou uma possível interação transgeracional entre a exposição ao TBT e níveis de gordura da dieta. Os autores relataram que

a exposição de camundongos F0 ao TBT (50 nM) durante a gravidez e lactação predispõe descendentes masculinos F4 à obesidade, quando expostos a uma dieta com maior composição em gordura. No entanto, nenhuma diferença na composição corporal foi observada em descendentes do sexo feminino F4 ao longo da exposição a dieta rica em gordura.

Assim, nossos dados sugerem que o modelo combinado de HCD-TBT levou a anormalidades morfofuncionais dos adipócitos, mostrando a importância do estudo da interação da exposição ao EDC, combinado a uma dieta de alto teor de açúcar no desenvolvimento de anormalidades metabólicas, principalmente pelo fato da exposição a estes componentes não ocorrer de maneira separada na vida normal.

As consequências metabólicas da obesidade que incidem sobre a função reprodutiva feminina após a exposição isolada ao TBT e a HCD, como por exemplo, as irregularidades do ciclo reprodutivo, a apoptose ovariana, a falha da ovulação, a redução da reserva ovariana, o perfil anormal de hormônios sexuais, a infertilidade, a inflamação do trato reprodutivo e a fibrose, são bem descritas por alguns estudos (DE ARAÚJO et al., 2018; NIÑO et al., 2020; SENA et al., 2017). Mesmo que o desfecho causado pela obesidade seja bem conhecido, as causas e os mecanismos associados entre as complicações da obesidade e as características da IOP permanecem obscuros (NIÑO et al., 2020; SARMENTO et al., 2020). Embora alguns estudos a respeito da exposição isolada ao TBT e a HCD tenham consequências semelhantes, ou seja, o aumento do tecido adiposo associado à hipertrofia de adipócitos, a inflamação, a hiperleptinemia, a intolerância à glicose, a RI e a dislipidemia (NIÑO et al., 2020; SENA et al., 2017), a associação entre os efeitos da exposição combinada do TBT e da HCD na função reprodutiva dos mamíferos não foi avaliada anteriormente.

Neste trabalho podemos identificar alterações no ciclo estral e um aumento nos níveis séricos de FSH em ratas expostas ao tratamento combinado de HCD-TBT. Estudos anteriores mostraram roedores do sexo feminino, obesos, como consequência da exposição ao TBT (100–500 ng / kg / dia) e exposição a HCD por 15 dias, exibiram anormalidade no ciclo reprodutivo, com um aumento na fase de metaestro-diestro e na duração do ciclo estral (NIÑO et al., 2020; PODRATZ et al., 2012; SARMENTO et al., 2020; SENA et al., 2017). Outros estudos demonstraram uma mudança semelhante nos níveis séricos de FSH em ratas expostas ao TBT e a HCD (NIÑO et al., 2020; SENA et al., 2017).

Neste estudo da exposição combinada de HCD-TBT, não observamos qualquer alteração nos níveis séricos de progesterona e estradiol, no entanto, houve uma redução nos níveis séricos de testosterona, quando comparado aos grupos TBT e HCD. Sena et al. (2017), demonstraram um aumento nos níveis séricos de testosterona após exposição ao TBT por 15 dias em ratas *Wistar*. Outros trabalhos relataram um aumento nos níveis séricos de testosterona, sem mudanças significativas no estrogênio e progesterona em camundongos do sexo feminino após exposição ao TBT por 12 dias (500 ng / kg / dia) (SARMENTO et al., 2020; SENA et al., 2017). Segundo Niño et al, (2020) não foram observadas alterações nos níveis de hormônios sexuais após a exposição a HCD por 15 dias em ratas *Wistar*. Desta forma, as anormalidades do ciclo estral e os níveis séricos de testosterona, encontradas neste estudo, podem estar associados a morfologia anormal no ovário.

Em relação a função ovariana, a exposição combinada de HCD-TBT, utilizada neste trabalho, provocou uma redução nos níveis séricos de AMH, redução nos números de CL, folículos primordiais, primários e totais saudáveis, redução na espessura da camada granulosa e na área da teca, com aumento no número de folículos atrésicos, císticos e não saudáveis em ratas tratadas por 15 dias. Além disso, foi observada uma forte correlação positiva entre os níveis de AMH, a reserva ovariana e o número de CL, sugerindo um marcador importante para as características da IOP.

Nossos resultados são consistentes com estudos anteriores, nos quais, a morfologia ovariana irregular e / ou níveis anormais de hormônios sexuais são características comuns da exposição ao TBT ou em vários modelos de roedores femininos DIO, como a exposição a HFD e a HCD (DE ARAÚJO et al., 2018; DIVALL et al., 2015; NIÑO et al., 2020; SARMENTO et al., 2020; WU et al., 2014). A redução no número de CL e o aumento dos folículos atrésicos, sem alteração nos números de folículos pré-antrais e antrais, também foram observados na exposição ao TBT por 15 dias em ratas *Wistar* (PODRATZ et al., 2012; SENA et al., 2017). A redução no número de folículos primordiais, primários e antrais e nos números de CL, bem como o aumento no número de folículos císticos foi observada em camundongos fêmeas expostos ao TBT por 12 dias (500 ng / kg / dia) (SARMENTO et al., 2020). A redução da reserva ovariana, dos números de folículos pré-antrais, antrais e de CL, além da diminuição na espessura da camada granulosa, com o aumento do número de folículos atrésicos e císticos foi observada na exposição ao HCD por 15 dias em ratas *Wistar* (NIÑO et al., 2020). Wu et al. (2014), mostraram uma redução no número de CL e nenhuma alteração nos níveis de E2 em camundongos fêmeas alimentados com HFD por 12 semanas. Um aumento no número de

folículos císticos sem alterações nos níveis de testosterona sérica foi observado em ratas alimentadas com HFHS por 11 semanas (DIVALL et al., 2015). Hohos et al. (2020), relataram uma redução significativa no número de CL, de folículos primordiais e nos níveis de AMH em camundongos alimentados com HFD por 10 semanas.

Nossas ratas HCD-TBT apresentaram sinais característicos de IOP, como os altos níveis de FSH e os baixos níveis de AMH, além da redução do número de folículos primordiais e primários, e ausência de ovulação, dados que corroboram com uma forte correlação negativa entre o diâmetro dos adipócitos e a reserva ovariana, o número de CL e os níveis de AMH. Foi observada uma forte correlação positiva entre o diâmetro dos adipócitos e a relação FSH / AMH, também observamos uma correlação negativa entre o índice TYG e o número de CL e uma correlação positiva entre o índice TYG e os níveis de FSH.

A IOP é um distúrbio associado ao recrutamento folicular ovariano inadequado, levando à depleção dos folículos (DA COSTA, et al., 2021; JIAO et al., 2018; NELSON et al., 1982). A depleção dos folículos primordiais e / ou primários, levando a uma redução no número de CL, é o principal mecanismo pelo qual as mulheres fazem a transição para o período em que ocorre a menopausa ou para outras anormalidades reprodutivas (FADDY et al., 1992; GOUGEON; ECOCHARD; THALABARD, 1994; TATONE et al., 2008). A IOP é uma condição que afeta aproximadamente 1% das mulheres em idade reprodutiva (DUMESIC et al., 2015). O aumento nos níveis de gonadotrofina, principalmente nos níveis de FSH, e uma redução nos níveis de AMH e nos hormônios sexuais também são observados nas complicações da IOP (ARORA et al., 2011; KODAMAN, 2017; PAL; TORREALDAY; SHARIF et al., 2019). Além disso, Roberts et al. (2020), demonstraram que a relação FSH / AMH é um outro marcador importante para a saúde ovariana e o estado folicular, e está correlacionada com o tamanho dos adipócitos em ratas obesas após exposição a HFHS por 12 semanas.

Assim, nosso modelo HCD-TBT apresenta anormalidades metabólicas e reprodutivas, piorando as características da IOP, demonstrando que a exposição ao TBT combinada ao excesso de carboidratos na dieta tem papel importante nas complicações da obesidade na morfofisiológica ovariana.

Em relação as alterações uterinas, nosso modelo atual apresentou aumento na espessura do epitélio luminal, redução na espessura do endométrio e miométrio, e a redução no número de GE em ratas expostas de forma combinada ao HCD-TBT, sendo ainda necessários

estudos futuros para entender o mecanismo dessas anormalidades. Em estudos anteriores, notamos que a exposição isolada ao TBT e ao HCD levou a anormalidades uterinas (NIÑO et al., 2020; SARMENTO et al., 2020; SENA et al., 2017). Sena et al. (2017) e De Araújo et al. (2018), relataram uma atrofia uterina com redução da área do endométrio e miométrio em ratas expostas ao TBT (100 ng / kg / dia) por 15 ou 30 dias, respectivamente. Da mesma forma, Sarmento et al. (2020), observaram uma redução na área do endométrio e miométrio com redução no número de GE em camundongos fêmeas expostas ao TBT (500 ng / kg / dia) por 12 dias. A alimentação com HCD por 15 dias em ratas é responsável pela redução da área do endométrio e miométrio e pelo baixo número de GE (NIÑO et al., 2020).

Outras anormalidades do trato reprodutivo feminino foram observadas em modelos de exposição ao TBT e a HCD, como inflamação, fibrose ovariana e uterina (DE ARAÚJO et al., 2018; NIÑO et al., 2020; SENA et al., 2017). Nossos resultados atuais são consistentes com esses achados anteriores, pois observamos um aumento no número de mastócitos ovarianos e uterinos, e uma maior deposição de matriz extracelular nas ratas HCD-TBT. Esses dados sugerem que a exposição combinada e aguda ao HCD-TBT podem levar a irregularidades ovarianas e uterinas, e inflamação, que podem ser substituídas por tecido fibroso no trato reprodutivo em ratas. Além disso, a IOP também pode resultar da inflamação primária ou secundária no ovário, levando à atresia folicular (ALTUNTAS; JOHNSON; TUOHY, 2006; NIÑO et al., 2020; SEDMAK; HART; TUBBS, 1988) conforme observado em nossos dados por meio do aumento no número de mastócitos ovarianos e folículos atrésicos.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a exposição aguda combinada de TBT e HCD resultou em anormalidades metabólicas e reprodutivas nas ratas *Wistar*, de maior importância quando comparadas as alterações decorrentes da exposição isolada ao TBT ou ao HCD. A exposição combinada ao HCD- TBT induziu a uma disfunção metabólica, evidenciada pela hipertrofia dos adipócitos, alterações no perfil lipídico e resistência à insulina. Essas disfunções metabólicas estão relacionadas à um prejuízo na função reprodutiva, uma vez que esses animais apresentaram irregularidades no ciclo estral, aumento nos níveis séricos de FSH, redução na reserva ovariana, nos níveis séricos de AMH e no número de CL, além de também apresentarem fibrose nos ovários. Portanto, este estudo aumenta nossa compreensão dos efeitos deletérios da exposição combinada de HCD-TBT na função reprodutiva, mostrando a importância de se investigar cada vez mais a interação existente entre esses compostos e os seus prejuízos em decorrência da sua exposição combinada.

8. REFERÊNCIAS

ALTUNTAS, C. Z.; JOHNSON, J. M.; TUOHY, V. K. Autoimmune Targeted Disruption of the Pituitary-Ovarian Axis Causes Premature Ovarian Failure. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1988–1996, 2006.

ALZIEU, C. Tributyltin: Case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean and Coastal Management**, v. 40, n. 1, p. 23–36, jul. 1998.

ANTUNES, M. M. et al. A high-carbohydrate diet induces greater inflammation than high-fat diet in mouse skeletal muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 3, p. 4–11, 2020.

ARORA, P.; POLSON, D.P. Diagnosis and management of premature ovarian failure, **The Obstetrician & Gynecologist**, p. 67–72, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1576/toag.13.2.67.27648>>. Acesso em 21 de nov. 2021.

AYE, I.L.M.H. et al. Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. **Biology of reproduction**, v. 90, n. 6, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24759787/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

BAZZANO, M. V. et al. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, n. 5, p. 655–667, 1 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.rbmojournal.com/article/S147264831500382X/fulltext>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

BERTAN, C.M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824–840, 2006. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-463904>>. Acesso em 21 de nov. 2021.

BERTULOSO, B. D. et al. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**, v. 235, n. 1, p. 45–59, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.03.009>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

BISCHOFF, S. C. et al. Towards a multidisciplinary approach to understand and manage

obesity and related diseases. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 4, p. 917–938, 1 ago. 2017. Disponível em:< DOI: 10.1016/j.clnu.2016.11.007>. Acesso em 21 de nov. 2021.

BLÜHER, M.; KAHN, B.B; KAHN, C. R.. Extended Longevity in Mice lacking insulin signal receptor.pdf. v. 299, n. January, p. 2000–2002, 2003.Disponível em:<DOI: 10.1126/science.1078223>. Acesso em 21 de nov. 2021.

BOURLIER, V.; BOULOUMIE, A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. **Diabetes and Metabolism**, v. 35, n. 4, p. 251–260, 2009. Disponível em:< DOI: 10.1016/j.diabet.2009.05.001>. Acesso em 21 de nov. de 2021.

BOYER, I. J. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. **Toxicology**, v. 55, n. 3, p. 253–298, 15 maio 1989. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2655175/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

BRASIL. RN no 15/2013 - Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica.Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal., Brasil, 2013. p. 20

BRENNER, R. M.; WEST, N. B. Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. **Annual review of physiology**, v. 37, p. 273–302, 1975. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/164819/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.

BROWN, R. P. et al. A critical review of the scientific literature on potential endocrine-mediated effects in fish and wildlife. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, n. 1, p. 17–25, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11386712/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

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

CALDWELL, A. S. L. et al. Characterization of Reproductive, Metabolic, and Endocrine Features of Polycystic Ovary Syndrome in Female Hyperandrogenic Mouse Models. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3146–3159, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/155/8/3146/2433322>>. Acesso em: 4 mar. 2021.

CHAMORRO-GARCIA, Raquel et al. Ancestral perinatal obesogen exposure results in a transgenerational thrifty phenotype in mice. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-017-01944-z>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

COSTA, M B et al. *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda: Ranellidae): A New Bioindicator of Organotin Compounds Contamination? **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, n. 1, p. 65–69, 2008. Disponível em: <www.imo.org>. Acesso em: 28 nov. 2021.

COUTINHO, J. V. S et al. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. **Toxicology Letters**, v. 260, p. 52–69, 2016. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.08.007 >. Acesso em: 28 nov. 2021.

CURRY, T. E.; OSTEEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 4, p. 428–465, ago. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12920150/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.

DA COSTA, C. S. et al. The tributyltin leads to obesogenic mammary gland abnormalities in adult female rats. **Toxicol. Lett.** 307 (2019) 59–71.

DA COSTA, C. S. et al. Subacute cadmium exposure disrupts the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, leading to polycystic ovarian syndrome and premature ovarian failure features in female rats. **Environmental Pollution**, v. 269, p. 116-154, 2021.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. C. **Anatomia sistêmica e segmentar**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DE ARAÚJO, J. F.P. et al. The obesogen tributyltin induces abnormal ovarian adipogenesis in adult female rats. **Toxicology Letters**, v. 295, p. 99–114, 1 out. 2018.

DE CARVALHO OLIVEIRA, R.; SANTELLI, R. E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 9–24, 30 jun. 2010.

DE LIMA, L. F. et al. Papel da homeopatia na regulação da foliculogênese in vivo e in vitro.

Reprodução & Climatério, v. 31, n. 2, p. 112–119, 1 maio 2016.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, jun. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19502515/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

DIVALL, S. A. et al. Insulin Receptor Signaling in the GnRH Neuron Plays a Role in the Abnormal GnRH Pulsatility of Obese Female Mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119995, 17 mar. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119995>>. Acesso em: 4 mar. 2021.

DORNELES, P. R. et al. Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. **Environmental Pollution (1987)**, v. 156, n. 3, p. 1268–1276, dez. 2008. Disponível em: <http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:40058046>. Acesso em: 28 nov. 2021.

DUMESIC, D. A. et al. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 487–525, 2015.

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

FADDY, M.J. et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. **Human Reproduction**, v. 7, n. 10, p. 1342–1346, nov. 1992.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Importance of the biotechnique of MOEPF for the study of folliculogenesis and in vitro embryo production in large scale. 2008. Disponível em: <www.cbra.org.br>. Acesso em: 26 nov. 2021.

FILARDO, E. J. et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 16, n. 1, p. 70–84, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11773440/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

FILICORI, M. et al. Characterization of the Physiological Pattern of Episodic Gonadotropin Secretion throughout the Human Menstrual Cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 62, n. 6, p. 1136–1144, 1 jun. 1986. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article/62/6/1136/2674418>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

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

FREITAS-LIMA L. et al. Tributyltin impacts in metabolic syndrome development through disruption of angiotensin II receptor signaling pathways in white adipose tissue from adult female rats. **Toxicol Lett**. Dec 15;299:21-31, 2018.

FRIEDMAN, J. M. Modern science versus the stigma of obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 6, p. 563–569, 2004.

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

GARCIA, E. et al. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 67, n. 1, p. 80–87, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2454244/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.

GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. 211p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249644>>. Acesso em: 7 ago. 2021

GOUGEON, A.; ECOCHARD, R.; THALABARD, J.C. Age-Related Changes of the Population of Human Ovarian Follicles: Increase in the Disappearance Rate of Non-Growing and Early-Growing Follicles in Aging Women. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 3, p. 653–663, 1 mar. 1994. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/2762635/Age-Related>>. Acesso em: 4 mar. 2021.

GROSS, L. S. et al. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: An ecologic assessment. **American Journal of Clinical**

Nutrition, v. 79, n. 5, p. 774–779, 2004.

GRÜN, F. et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 9, p. 2141–2155, 2006.

GUSTAFSSON, J. Å.. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 9, p. 479–485, 1 set. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12967773/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

HASLAM, D.W.; JAMES, W. P. T. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197–1209, 2005.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International review of cytology**, v. 124, n. C, p. 43–101, 1 jan. 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2001918/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment — an overview. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 7–8, p. 719–743, 1 jun. 2001.

HOHOS, N.M et al. High-fat diet-induced dysregulation of ovarian gene expression is restored with chronic omega-3 fatty acid supplementation, **Mol. Cell. Endocrinol.** p. 499. 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110615>>. Acesso em 26 nov.2021.

HOSSAIN, P. ; KAWAR, B. ; EL NAHAS, M.. Obesity and diabetes in the developing world - A growing challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 213–215, 2007.

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. <http://dx.doi.org/10.1080/10520290500138422>, v. 80, n. 2, p. 79–87, mar. 2009. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10520290500138422>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

HUTT, K. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. KIT/KIT Ligand in Mammalian Oogenesis and Folliculogenesis: Roles in Rabbit and Murine Ovarian Follicle Activation and Oocyte Growth. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 3, p. 421–433, 1 set. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/75/3/421/2629113>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION. International Convention on the control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships, 2001. In: (The Stationery Office Limited, Ed.) 2001, London. Anais... London: Foreign & Commonwealth Office, 2001.

- IRELAND, J.J. **Control of follicular growth and development**. Disponível em: <<https://www.bioscioproceedings.org/bp/0009/pdf/bp0009rdr5.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- JANESICK, A.; BLUMBERG, B. The Role of Environmental Obesogens in the Obesity Epidemic. p. 383–399, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-7034-3_19>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- JENKINS, S. et al. Oral exposure to bisphenol a increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 6, p. 910–915, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19590682/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- JIAO, X. et al. Molecular Genetics of Premature Ovarian Insufficiency. Trends in Endocrinology and Metabolism. **Cell Press**, v. 29, p. 795-807, 2018. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1043276018301309/fulltext>>. Acesso em: 4 mar. 2021.
- KABIR, M. et al. Dietary Amylose-Amylopectin Starch Content Affects Glucose and Lipid Metabolism in Adipocytes of Normal and Diabetic Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 1, p. 35–43, 1998.
- KJAERGAARD, M. et al. Hypothalamic oxidative stress and inflammation, and peripheral glucose homeostasis in Sprague-Dawley rat offspring exposed to maternal and postnatal chocolate and soft drink. **Nutrition and Diabetes**, v. 8, n. 1, 2018.
- KOBAYASHI, A. ; BEHRINGER, R. R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. **Nature Reviews Genetics** **2003 4:12**, v. 4, n. 12, p. 969–980, dez. 2003. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrg1225>>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- KUIPER, G.G.J.M. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5925, 11 jun. 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16004980/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- LATINI, G. Monitoring phthalate exposure in humans. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 361, n. 1–2, p. 20–29, nov. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16004980/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- LE STUNFF, C. et al. The insulin gene VNTR is associated with fasting insulin levels and

- development of juvenile obesity. **Nature Genetics**, v. 26, n. 4, p. 444–446, 2000.
- LEMALE, J. et al. Membrane progesterin receptors alpha and gamma in renal epithelium. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 12, p. 2234–2240, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18722485/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- LIMA-VERDE, I B; ROSSETTO, R; FIGUEIREDO, J R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese Influence of steroid hormones on folliculogenesis. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 4, p. 472–482, 2011. Disponível em: <www.cbra.org.br>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- LIMAVERDE, A. M. et al. Stramonita haemastoma as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. **Marine environmental research**, v. 64, n. 3, p. 384–398, set. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17459467/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- LIU, L. et al. Association of hypercholesterolemia and cardiac function evaluated by speckle tracking echocardiography in a rabbit model. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 9 ago. 2014. Disponível em: <<https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-13-128>>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- LUDGERO-CORREIA, A. et al. Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. **Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 316–323, 1 mar. 2012.
- LUDWIG, D. S, EBBELING, C. B. The Carbohydrate-Insulin model of obesity: beyond CICO. **Jama**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2018.
- MAGIAKOU, M. A. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 816, p. 42–56, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9238254/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- MANDL, M.; MANDL, M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY**, p. 576–584, 1951. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.585.2935>>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- MANSOOR, N. et al. Effects of low-carbohydrate diets v. low-fat diets on body weight and

cardiovascular risk factors a meta-analysis of randomised controlled trials. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 3, p. 466–479, 2016.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4 A, p. 609–614, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/bjb/a/NMS668rnQ4sdwMkrwdZPp9Q/?lang=en>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

MATARESE, G.; LA CAVA, A. Immune responses in obesity models. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 2, n. 3, p. 177–181, 2005.

MATTHIESSEN, P. Detection, monitoring, and control of tributyltin--an almost complete success story. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 32, n. 3, p. 487–489, mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23418041/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P. E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 37–43, 1 jan. 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.5620170106>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

MEHRAN, A. E. et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 6, p. 723–737, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.019>>.

MERLO, E. et al. The Environmental Pollutant Tributyltin Chloride Disrupts the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis at Different Levels in Female Rats. **Endocrinology**, v. 157, n. 8, p. 2978–2995, ago. 2016.

MILLER, B. H.; TAKAHASHI, J. S. Central circadian control of female reproductive function. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. JAN, p. 195, 2014.

MOYSÉS, M. R.; BARKER, L. A.; CABRAL, A. M. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 7, p. 949–958, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/bjmbr/a/mzqs5YjzWQRWjSSyGBJr7WS/?lang=en>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

MYERS, M et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 569–580, maio 2004.

NATH, M. Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: a review. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 598–612, 1 out. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aoc.1436>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

NELSON, J. F. et al. A Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I. Cycle Frequency, Length and Vaginal Cytology1. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 2, p. 327–339, 1 set. 1982. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod27.2.327>>. Acesso em: 4 mar. 2021.

NIÑO, O.M.S. et al. High-refined carbohydrate diet leads to polycystic ovary syndrome-like features and reduced ovarian reserve in female rats. **Toxicology Letters**, v. 332, n. 15, p. 42–55, 2020.

NTEEBBA, J.; GANESAN, S.; KEATING, A. F. Impact of obesity on ovotoxicity induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in mice. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 3, p. 68–69, 1 mar. 2014a. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/90/3/68>, 1-10/2514340>. Acesso em: 26 nov. 2021.

OLIVEIRA, J. et al. Padrão hormonal feminino: menopausa e terapia de reposição - **Revista RBAC**, 2016. Disponível em: <<http://www.rbac.org.br/artigos/padrao-hormonal-feminino-menopausa-e-terapia-de-reposicao-48n-3/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, 2013.

PAL, L.; TORREALDAY, S.; KODAMAN, P. Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 1–15, 2017.

PARROTT, JA; SKINNER, MK. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production - **Mol Reprod Dev**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10602274/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

PAWLAK, D. B.; KUSHNER, J. A.; LUDWIG, D.S. Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homeostasis, and plasma lipids in animals. **Lancet**, v. 364, n. 9436, p. 778–

785, 2004.

PODRATZ, P. L et al. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 75, n. 16–17, p. 1035–1046, 2012.

POHLMEIER, W. E. et al. Progressive obesity alters the steroidogenic response to ovulatory stimulation and increases the abundance of mRNAs stored in the ovulated oocyte. **Molecular reproduction and development**, v. 81, n. 8, p. 735–747, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24824196/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

PROSSNITZ, E. R. Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. **Life sciences**, v. 75, n. 8, p. 893–899, 9 jul. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15193949/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

RACHÓN, D.; TEEDE, H.. Ovarian function and obesity—Interrelationship, impact on women’s reproductive lifespan and treatment options. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 172–179, 25 mar. 2010.

REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 11 mar. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15705806/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

RICHARDSON, K. A. et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) alters proliferation and uterine gland numbers in the uteri of adult exposed mice. **Reproductive Toxicology**, v. 77, p. 70–79, abr. 2018.

ROBERTS, J.A. et al. FSH/AMH ratio and adipocyte size are linked to ovarian dysfunction, **Endocr. Res.** v. 45, p. 174–189, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1080/07435800.2020.1721015>>.Acessado em 21 de nov.1021.

SADOWSKA, J.; GĘBCZYŃSKI, A. K.; KONARZEWSKI, M.. Metabolic risk factors in mice divergently selected for BMR fed high fat and high carb diets. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

SALIHU, H. M. Maternal Obesity and Stillbirth. **Seminars in Perinatology**, v. 35, n. 6, p. 340–344, 1 dez. 2011.

SANTOS, T. Fisiologia do ovário e da Fecundação. **Manual de Ginecologia**, v. 1, p. 39-56,

2009.

SARMENTO, I. V. et al. Subchronic and low dose of tributyltin exposure leads to reduced ovarian reserve, reduced uterine gland number, and other reproductive irregularities in female mice. **Toxicological Sciences**, v. 176, n. 1, p. 74–85, 2020.

SEDMAK, D. D.; HART, W. R.; TUBBS, R. S. **Autoimmune Oophoritis: A histopathologic study of involved ovaries with immunologic characterization of the mononuclear cell infiltrate**. . [S.l.]: Obstet. Gynecol. Surv. , 1988

SENA, G. C. et al. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 319, p. 22–38, 15 mar. 2017.

SHARIF, K. et al. Insights into the autoimmune aspect of premature ovarian insufficiency. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 101323, 2019.

SHI, D. et al. A Unique Rodent Model of Cardiometabolic Risk Associated with the Metabolic Syndrome and Polycystic Ovary Syndrome. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4425–4436, 1 set. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/150/9/4425/2456430>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SKAZNIK-WIKIEL, M. E. et al. High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice. **Biology of reproduction**, v. 94, n. 5, 1 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27030045/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SONAK, S. et al. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of environmental management**, v. 90 Suppl 1, n. SUPPL. 1, 15 fev. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18977581/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SOUSA, A.C.A. et al. History on organotin compounds, from snails to humans. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 117–137, mar. 2014. Disponível em: <<https://publons.com/publon/444728/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SZAWKA, R. E. ; ANSELMO-FRANCI, J. A. A secondary surge of prolactin on the estrus

afternoon. **Life sciences**, v. 75, n. 8, p. 911–922, 9 jul. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15193951/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SZEGDA, K. L. et al. Adult adiposity and risk of early menopause. **Human Reproduction**, v. 32, n. 12, p. 2522–2531, 2017.

TATONE, J.C. et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing, **Hum. Reprod.** 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/humupd/dmm048>>. Acesso em 21 de nov. 2021.

TOBIAS, D. K et al. ..Efecto de las bajas grasas versus otras intervenciones dietéticas en el cambio de peso a largo plazo en adultos: una revisión sistemática y metaanálisis. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, v. 3, n. 12, p. 968–79, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527511>>.

VOS, J. G. et al. Health effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000.

WANG, N.A et al. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 1, p. 94–103, 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.metabolismjournal.com/article/S0026049513002801/fulltext>>. Acesso em: 4 mar. 2021.

WESTWOOD, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375–384, 8 maio 2008. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623308315665?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed>. Acesso em: 28 nov. 2021.

WHALEN, M. M.; LOGANATHAN, B. G.; KANNAN, Kurunthachalam. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. **Environmental research**, v. 81, n. 2, p. 108–116, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10433842/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

WU, S et al. Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. **Diabetes**, v. 63, n. 4, p. 1270–1282, abr. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24379345/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.


YEN, S. S. C. The human menstrual cycle. S. S. C. YEN & R. B. JAFFE (eds). Reproductive Endocrinology. Saunders. Philadelphia, PA, 126 p. 1978.

YU, I.C et al. Neuronal androgen receptor regulates insulin sensitivity via suppression of hypothalamic NF-kB-mediated PTP1B expression. Diabetes 62, 411–423, 2013.


ZUKERMAN, S.; MANDL, A.M.; ECKSTEIN, P. (1962) The ovary. Vol. 1. Academic Press, New York, London.

9 ANEXOS

9.1 CERTIFICADO CEUA



**Universidade Federal
do Espírito Santo**



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **PAPEL DA SIRTUÍNA NA DISFUNÇÃO METABÓLICA INDUZIDA PELO TRIBUTILESTANHO**

Registrada sob o n.º **03/2016** sob a responsabilidade de **JONES BERNARDES GRACELI**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia **23/11/2018**

Vigência da autorização: abril/16 a maio/21 **Finalidade:** Pesquisa

Espécie(s): Rato (*Rattus norvegicus*)

Linagem(ns)/raça(s): Wistar

Peso: 100 gramas **Idade:** 4 semanas **Sexo:** Fêmea

Número de animais: 114

Origem: Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, Ufes, Campus Maruípe, Vitória-ES

Vitória-ES, 26/11/2018

Breno S. Salgado
Breno Souza Salgado
Coordenador da CEUA-Ufes

*Este certificado resgata o preceito emitido aprovado na reunião Ordinária de 16/04/2016
 Emitido em Vitória em 16 de Novembro de 2018
 Avenida Marechal Cunha, 1488 - Maruípe - Vitória-ES - CEP: 29043-910 - Telefone: (71) 3333-7048 - e-mail: ceua@ufes.br - www.ceua.ufes.br

9.2 ARTIGO VINCULADO A DISSERTAÇÃO

Reproductive Toxicology 103 (2021) 106–123



Contents lists available at ScienceDirect

Reproductive Toxicology

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

Tributyltin and high-refined carbohydrate diet lead to metabolic and reproductive abnormalities, exacerbating premature ovary failure features in the female rats

Jordana F. Zanol^{a,1}, Oscar M.S. Niño^{a,b,1}, Charles S. da Costa^{a,1}, Leandro C. Freitas-Lima^a,
Leandro Miranda-Alves^{c,d}, Jones B. Graceli^{a,*}

^a Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, CEP: 29090-090 Vitória, ES, Brazil

^b Bachelor of Physical Education and Sport, Faculty of Human Sciences and Education, Universidad de los Llanos, Edfaricentro Mesa, Colombia

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

^d Postgraduate Program in Endocrinology, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 366 do Conceptor, Cidade Universitária, RJ, UFRJ, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Flaminia Pasarella

Keywords:

Tributyltin (TBT)
High-refined carbohydrate diet (HCD)
Adipocyte hypertrophy
Follicle-stimulating hormone (FSH)
Anti-Müllerian hormone (AMH)
Premature ovarian failure (POF)

ABSTRACT

Exposure to the obesogen tributyltin (TBT) alone or high carbohydrate diet (HCD) alone leads to obesity and reproductive complications, such as premature ovary failure (POF) features. However, little is known about interactions between TBT and nutrition and their combined impact on reproduction. In this study, we assessed whether acute TBT and HCD exposure results in reproductive and metabolic irregularities. Female rats were treated with TBT (100 ng/kg/day) and fed with HCD for 15 days and metabolic and reproductive outcomes were assessed. TBT and HCD rats displayed metabolic impairments, such as increased adiposity, abnormal lipid profile and triglyceride and glucose (TGC) index, worsening adipocyte hypertrophy in HCD-TBT rats. These metabolic consequences were linked with reproductive disorders. Specifically, HCD-TBT rats displayed irregular estrous cyclicity, high follicle-stimulating hormone (FSH) levels, low anti-Müllerian hormone (AMH) levels, reduction in ovarian reserve, and corpora lutea (CL) number, with increases in atretic follicles, suggesting that HCD-TBT exposure exacerbated POF features. Further, strong negative correlations were observed between adipocyte hypertrophy and ovarian reserve, CL number and AMH levels. HCD-TBT exposure resulted in reproductive tract inflammation and fibrosis. Collectively, these data suggest that TBT plus HCD exposure leads to metabolic and reproductive abnormalities, exacerbating POF features in female rats.

1. Introduction

Obesity is a worldwide epidemic that keeps growing and has spared no age group, affecting children, teenagers, and adults of both sexes [1, 2]. Obesity is a concern for overall health because it is a condition of low-grade chronic inflammation, with an increase in fat mass, releasing pro-inflammatory cytokines and it is associated with an increased risk of insulin resistance (IR), metabolic syndrome and other systemic abnormalities [3–6]. However, the exact contributing factors behind these metabolic deleterious effects are not completely known, obesity appears to be a multifactorial combination of genetics, dietary macronutrient

balance, modern lifestyle, and other factors [7,8].

Although positive energy balance plays an important role in obesity and other associated metabolic irregularities, emerging data link the exposure to endocrine disrupting chemicals (EDCs) to the obesity epidemic [9–11]. The Endocrine Society defines EDCs as “exogenous chemicals, or mixtures of chemicals, that interfere with any aspect of hormone action” [12,13]. Obesogens are a subset of EDCs that promote adiposity by increasing fat cell number and/or size, or by interfering with hormonal modulation of metabolism, appetite, and satiety [10,11]. Our and other studies reported that the obesogen tributyltin (TBT) modulates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ),

* Corresponding author at: Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular, Departamento de Morfologia/CES, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Pádua do Lúcio I, sala 5, CEP: 29040-090 Vitória, ES, Brazil.

E-mail addresses: jzanol@ufes.br (J.F. Zanol), oscarcastaneda@ufes.br (O.M.S. Niño), charlescosta@ufes.br (C.S. da Costa), lf_freitas@ufes.br (L.C. Freitas-Lima), almiranda@ufes.br (L. Miranda-Alves), jgraceli@gmail.com (J.B. Graceli).

¹ Jordana F. Zanol, Oscar M.S. Niño and Charles S. da Costa contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.10.090>

Received 24 March 2021; Received in revised form 28 May 2021; Accepted 2 June 2021

Available online 5 June 2021

0950-4230/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.