

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO  
TRIBUTILESTANHO NOS PARÂMETROS  
MORFOLÓGICOS E METABÓLICOS EM RATOS  
EXPOSTOS AO FRIO**

**Eduardo Merlo**

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas**

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

**Vitória, junho de 2022**

EDUARDO MERLO

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO  
TRIBUTILESTANHO NOS PARÂMETROS  
MORFOLÓGICOS E METABÓLICOS EM RATOS  
EXPOSTOS AO FRIO**

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

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jones Bernardes Graceli

**VITÓRIA - ES  
2022**

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

---

M564a Merlo, Eduardo, 1992-  
AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO TRIBUTILESTANHO  
NOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E METABÓLICOS EM  
RATOS EXPOSTOS AO FRIO / Eduardo Merlo. - 2022.  
113 f. : il.

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

1. Obesidade. 2. Poluentes. 3. Compostos organoestanhos. 4.  
Tecido adiposo marrom. I. Graceli, Jones Bernardes. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
Saúde. III. Título.

CDU: 612

---

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

Aos meus pais, **Carlos e Darlene**, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas, serem meus primeiros incentivadores dos estudos e da pesquisa.

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

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

Aos meus amigos de laboratório, do programa de pós-graduação em ciências fisiológicas e da Ufes.

As agências de fomento, **CNPq, CAPES e FAPES**, pelos recursos financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
	Objetivo geral .....	43
	Objetivo específico .....	43
<b>7.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
	Composto .....	44
	Animais experimentais .....	44
	.....	45
	Aferição da temperatura retal e teste de tolerância ao frio .....	45
	Adiposidade, perfil lipídico, tolerância à glicose e análise de sensibilidade à insulina.....	46
	Ensaio hormonal .....	46
	Avaliação das atividades das enzimas hepáticas.....	47
	Dissecção do tecido adiposo marrom.....	47
	Análise morfológica .....	48
	Avaliação da presença de mastócitos .....	49
	Avaliação de atividade de mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- $\beta$ -d-glicosaminidase (NAG) .....	49
	Avaliação da densidade de superfície de colágeno .....	50

Ensaio de ânion superóxido .....	50
Análise estatística .....	51
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
Efeitos da exposição ao TBT no peso corporal, adiposidade, função do TAB e perfil lipídico.....	52
Efeitos da exposição ao TBT no metabolismo da glicose .....	55
Efeitos da exposição ao TBT na morfofisiologia hepática .....	55
Efeitos da exposição ao TBT na morfofisiologia da tireoide .....	59
Efeitos da exposição ao TBT na temperatura corporal.....	60
A exposição ao TBT induz alterações morfológicas no BAT .....	62
Números de vasos sanguíneos no TAM após exposição ao TBT .....	65
Efeitos da exposição ao TBT no perfil lipídico, enzimas hepáticas e concentrações hormonais em condições de frio .....	65
A exposição ao TBT induz aumento da presença de mastócitos no TAM .....	66
A exposição ao TBT induz a produção de espécie reativa de oxigênio no TAM .....	68
A exposição ao TBT induz a deposição de colágeno no TAM .....	68
<b>9. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores de risco para desenvolvimento da obesidade. ....	15
Figura 2. A produção de produtos químicos orgânicos sintéticos e a porcentagem de adultos com excesso de peso nos Estados Unidos durante o século XX. ....	17
Figura 3. Estrutura do composto tributilestano.....	20
Figura 4. Captura de tela Islands 44 Plus <sup>TM</sup> como anunciado no site Sea Hawk Paints. ....	22
Figura 5. Características gerais dos adipócitos marrons, brancos e bege. ....	29
Figura 6. Localização e função UCP1 na cadeia respiratória mitocondrial (CRM).30	
Figura 7. Locais de depósitos de TAM em humanos e roedores. ....	35
Figura 8. Modelo experimental. ....	45
Figura 9. Peso corporal, adiposidade, peso e morfologia do tecido adiposo TAE e níveis de adipocinas em ratos machos. ....	54
Figura 10. Metabolismo da glicose e avaliação da morfologia do pâncreas em ratos machos.....	56
Figura 11. Avaliação da função e morfologia hepática em ratos machos.. ....	58
Figura 12. Avaliação da função e morfologia da tireóide em ratos machos. ....	60
Figura 13. Temperatura retal em ratos machos. ....	61
Figura 14. Morfologia do TAM em ratos machos.....	65
Figura 15. Avaliação de células inflamatórias no TAM em ratos machos. ....	68
Figura 16. Avaliação da produção de EROs no TAM em ratos machos. ....	69
Figura 17. Avaliação da deposição de colágeno no TAM em ratos machos. ....	70
Figura 18. Correlação entre temperatura retal, níveis séricos de T4 livre e parâmetros do TAM (acúmulo de lipídios, número de adipócitos multiloculares, número de mastócitos e produção de EROs).....	74
Figura 19. Modelo dos principais efeitos da exposição do TBT sobre o TAM. ....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação do peso de órgãos e tecidos. ....	53
Tabela 2. Efeitos da exposição ao TBT sobre o perfil lipídico. ....	53
Tabela 3. Avaliação do peso corporal, de órgãos e tecidos após TTF. ....	62
Tabela 4. Efeitos da exposição ao TBT sobre parâmetros séricos após TTF. ....	66



## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

- 18F-FDG: [18F]fluoroglicose
- AMPc: 3', 5' Adenosina monofosfato cíclico
- ATP: Adenosina trifosfato
- AUC: Área sob a curva
- CRM: Cadeia respiratória mitocondrial
- DBT: Dibutilestanho
- DDE: Diclorodifenildicloroetileno
- DDT: Diclorodifeniltricoroetano
- DHE: Dihidroetídio
- EDC: Compostos Interferentes Endócrinos
- EPM: Erro padrão da média
- H&E: Hematoxilina e Eosina
- HDL: Lipoproteína de baixa densidade
- HT: Hormônios da tireoide
- IMC: Índice de massa corporal
- IMO: Organização Marítima Internacional
- LDL: Lipoproteína de alta densidade
- MBT: Monobutilestanho
- MPO: Mieloperoxidase
- NAG: n-Acetil- $\beta$ -d-glicosaminidase
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion Superóxido

OMS: Organização Mundial da Saúde

OTs: Organoestânicos

PET/CT: tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada

PIB: Produto Interno Bruto

PPAR $\gamma$ : Receptor ativado por Proliferadores de Peroxissoma gama

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

TAB: Tecido adiposo branco

TAE: Tecido adiposo epididimal

TAM: Tecido adiposo marrom

TMT: Trimetilestanho

TBT: Tributilestanho

TDI: Ingestão diária tolerável

TG: Triglicerídeos

TGO: transaminase oxalacética

TGP: transaminase pirúvica

TPT: Trifenilestanho

TSI: Teste de sensibilidade à insulina

TTG: Teste tolerância à glicose

UCP1: Proteína desacopladora 1

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

## 1. RESUMO

O cloreto de tributilestano (TBT) é um obesogênico associado a várias complicações metabólicas. O tecido adiposo marrom (TAM) é um alvo emergente que pode amenizar algumas das complicações metabólicas. No entanto, poucos estudos avaliaram o efeito do TBT na função do TAM. Nesse trabalho, avaliamos se a exposição subaguda e baixa de TBT (100 ng/kg/dia por 15 dias via gavagem) resulta em alterações morfofisiológicas do TAM em ratos machos. Os parâmetros do TAM foram avaliados em condições de temperatura ambiente (23°C) e após teste de tolerância ao frio (condição de frio – 6°C). Uma redução na concentração sérica T4 livre foi observada em ratos TBT da condição ambiente. Uma redução na temperatura corporal foi observada em ambas as condições nos ratos TBT, sugerindo uma função termogênica anormal. Foram observadas irregularidades na morfologia do TAM em ratos TBT. Especificamente, acúmulo de lipídios no TAM e aumento do número de adipócitos uniloculares. O TBT também reduziu as gotículas lipídicas e o número de adipócitos multiloculares em temperatura ambiente. Todos esses parâmetros foram opostos na condição de frio. Foram observados sinais de inflamação no TAM em ratos TBT em condição ambiente. O acúmulo de colágeno no TAM aumentou na condição ambiente, exacerbando na condição de frio nos ratos TBT. A produção de EROs aumentou em ambas as condições. Além disso, correlações negativas foram observadas entre temperatura corporal e acúmulo de lipídios no TAM e acúmulo de lipídios no TAM e concentrações séricas de T4 e número de adipócitos multiloculares. Foi também observada correlação positiva entre acúmulo de lipídios no TAM e inflamação e níveis de ânion superóxido. Assim, esses dados sugerem que a exposição subaguda e baixa de TBT prejudicou a morfofisiologia do TAM associada ao acúmulo de lipídios, inflamação, fibrose e estresse oxidativo em ratos machos.

## 2. ABSTRACT

Tributyltin (TBT) chloride is an endocrine-disrupting chemical linked with several metabolic complications. Brown adipose tissue (BAT) is emerging as a therapeutic target for metabolic complications. However, few studies have evaluated the TBT effect on BAT function. This study assessed whether a TBT exposure (100 ng/kg/day for 15 days via gavage) could modulate BAT morphophysiology. We evaluated the BAT parameters at room temperature (23°C) and after a cold tolerance test (CTT – 6°C) conditions. Interestingly, were observed low T4 levels in TBT rats under normal temperatures. A reduction in body temperature was observed in both conditions in TBT rats, suggesting an abnormal thermogenic function. BAT morphology irregularities were observed in TBT rats. Specifically, an increase in BAT lipid accumulation and unilocular adipocyte number. TBT also reduced lipid droplets and multilocular adipocyte number at room temperature. All these parameters were opposite in the CTT condition. Inflammation signals were observed in the TBT BAT. Collagen accumulation in TAM increased in the ambient condition, exacerbating in the cold condition in TBT rats. ROS production increased under both conditions. Finally, we observed negative correlations between body temperature and BAT lipid accumulation, BAT lipid accumulation and T4 levels, and multilocular adipocyte number. Conversely, and positive correlation was observed between BAT lipid accumulation, inflammation, and ROS production. Thus, these data suggest that the subacute and low dose of TBT exposure impaired BAT morphophysiology linked with lipid accumulation, inflammation, fibrosis, and oxidative stress in male rats.

### 3. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença endócrino-metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura a tal ponto que gera prejuízos à saúde do indivíduo (DE HEREDIA; GÓMEZ-MARTÍNEZ; MARCOS, 2012; PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). A prevalência e incidência de sobrepeso e obesidade em todo o mundo aumentaram significativamente nas últimas três décadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 1975, a obesidade quase triplicou e, a cada ano, pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem em decorrência da obesidade ou sobrepeso. Temos mais de 1,9 bilhões de obesos no mundo e cerca de 60 % da população já tem algum grau de sobrepeso (MAFFETONE; RIVERA-DOMINGUEZ; LAURSEN, 2017; WHO, 2003). Em 2016, 41 milhões de crianças menores de 5 anos e 340 milhões de crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos estavam acima do peso ou obesos (GONZÁLEZ-CASANOVA et al., 2020). No Brasil, dados recentes do Ministério da Saúde mostram que a frequência de adultos obesos está próxima 22,5 % (VIGITEL). Esses números explicam a razão pela qual esta doença atingiu padrões de pandemia, sendo que sua compreensão e controle são prioridades de saúde pública.

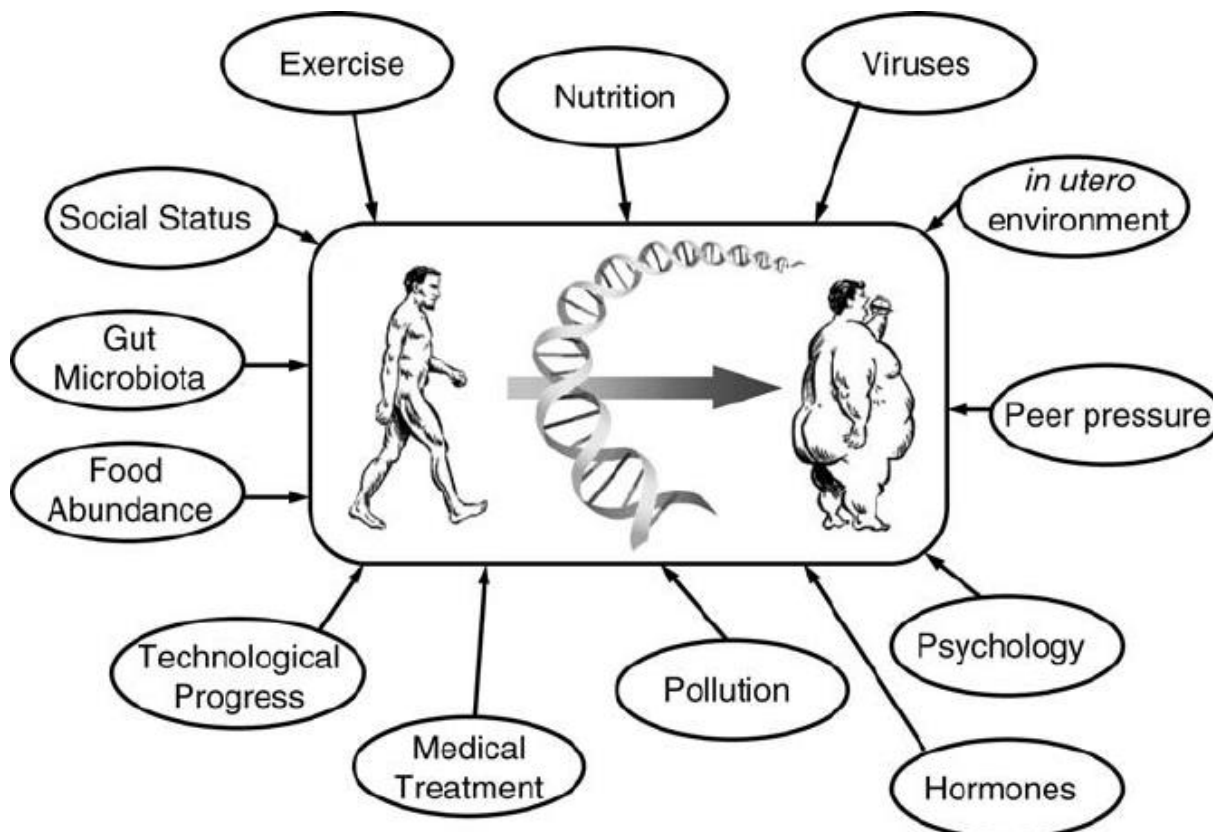
Uma forma de investigar a presença de obesidade é por meio do índice de massa corporal (IMC). Calculado pela divisão do peso corporal em quilogramas pelo quadrado da altura em metros, o qual é uma métrica simples usada para indicar a gordura corporal total (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; SWINBURN et al., 2011). Para adultos, as diretrizes atuais dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC) e da OMS definem uma faixa normal de IMC como 18,5 a 24,9, enquanto um  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$  é considerado excesso de peso e um  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$  é classificado como obeso, com obesidade grave definida como  $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$  (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; SWINBURN et al., 2011). Porém, essa definição é uma forma simplista de diagnóstico de uma doença tão complexa. A obesidade é uma doença multifatorial que resulta do balanço energético positivo crônico, ou seja, quando a ingestão de energia dietética excede o gasto energético por um longo período. O excesso de energia é convertido em triglicerídeos que são armazenados

em depósitos de tecido adiposo que se expandem em tamanho, aumentando assim a gordura corporal e causando conseqüentemente ganho de peso (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; “Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years,” 2017; SWINBURN et al., 2011).

A obesidade pode afetar pessoas de qualquer idade. Estudos anteriores que avaliaram as tendências da obesidade descobriram que sua prevalência aumentou em adultos e crianças independentemente da idade, sem descrição de localidade geográfica, etnia ou status socioeconômico (“Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years,” 2017; SWINBURN et al., 2011). Em países em desenvolvimento, a obesidade é geralmente mais prevalente entre adultos de classe média (especialmente mulheres), no Brasil a frequência entre homens e mulheres adultos é similar (Vigitel); já em países desenvolvidos, afeta ambos os sexos e todas as idades, mas sua prevalência é desproporcionalmente maior entre os grupos desfavorecidos (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; “Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years,” 2017; SWINBURN et al., 2011).

A obesidade prejudica diversas funções fisiológicas do corpo e compreende uma ameaça significativa à saúde pública (WILLIAMS et al., 2015). Aumenta o risco de desenvolvimento de várias doenças, como diabetes *mellitus* (NANDIPATI; SUBRAMANIAN; AGRAWAL, 2017; SINGH et al., 2013), doenças cardiovasculares (CZERNICHOW et al., 2011; SINGH et al., 2013), vários tipos de câncer (LAUBY-SECRETAN et al., 2016), uma série de distúrbios musculoesqueléticos (ANANDACOOMARASAMY et al., 2008) e problemas de saúde mental (ANSTEY et al., 2011), todos os quais têm efeitos negativos sobre a qualidade de vida, produtividade no trabalho e custos de saúde. Nos EUA, os custos com saúde relacionados aos cuidados de pacientes com obesidade foram de US\$ 149,4 bilhões em 2014 (KIM; BASU, 2016). Na Europa, estima-se que o custo total direto e indireto atribuível ao sobrepeso e à obesidade foi equivalente a 0,47-0,61 % do produto interno bruto (PIB) (VON LENGERKE; KRAUTH, 2011)

Historicamente, acreditava-se que a origem da obesidade se baseava na ingestão de alimentos altamente calóricos e no sedentarismo (PRENTICE, 2001; PRENTICE; JEBB, 1995). Contudo, estas duas causas sozinhas não explicam o crescimento exponencial no número de casos de pessoas obesas (BHUPATHIRAJU; HU, 2016; SELLAYAH; CAGAMPANG; COX, 2014). Diversos estudos indicam que a etiologia dessa doença crônica é multivariada e complexa. Os fatores biológicos predisponentes incluem características genéticas e ambientais, determinantes pré-natais e microbiota intestinal, entre outros. Pessoas propensas a desenvolver obesidade também podem ser afetadas por causas comportamentais, como ingestão excessiva de alimentos calóricos, aumento do tamanho das porções e a prática de um estilo de vida sedentário. Ao contrário, a predisposição genética para a obesidade pode ser influenciada por gatilhos epigenéticos, como alta disponibilidade de alimentos, *status* socioeconômico ou presença de contaminantes químicos no ambiente (BAILLIE-HAMILTON, 2002; KADOUH; ACOSTA, 2017; NEWBOLD et al., 2008).

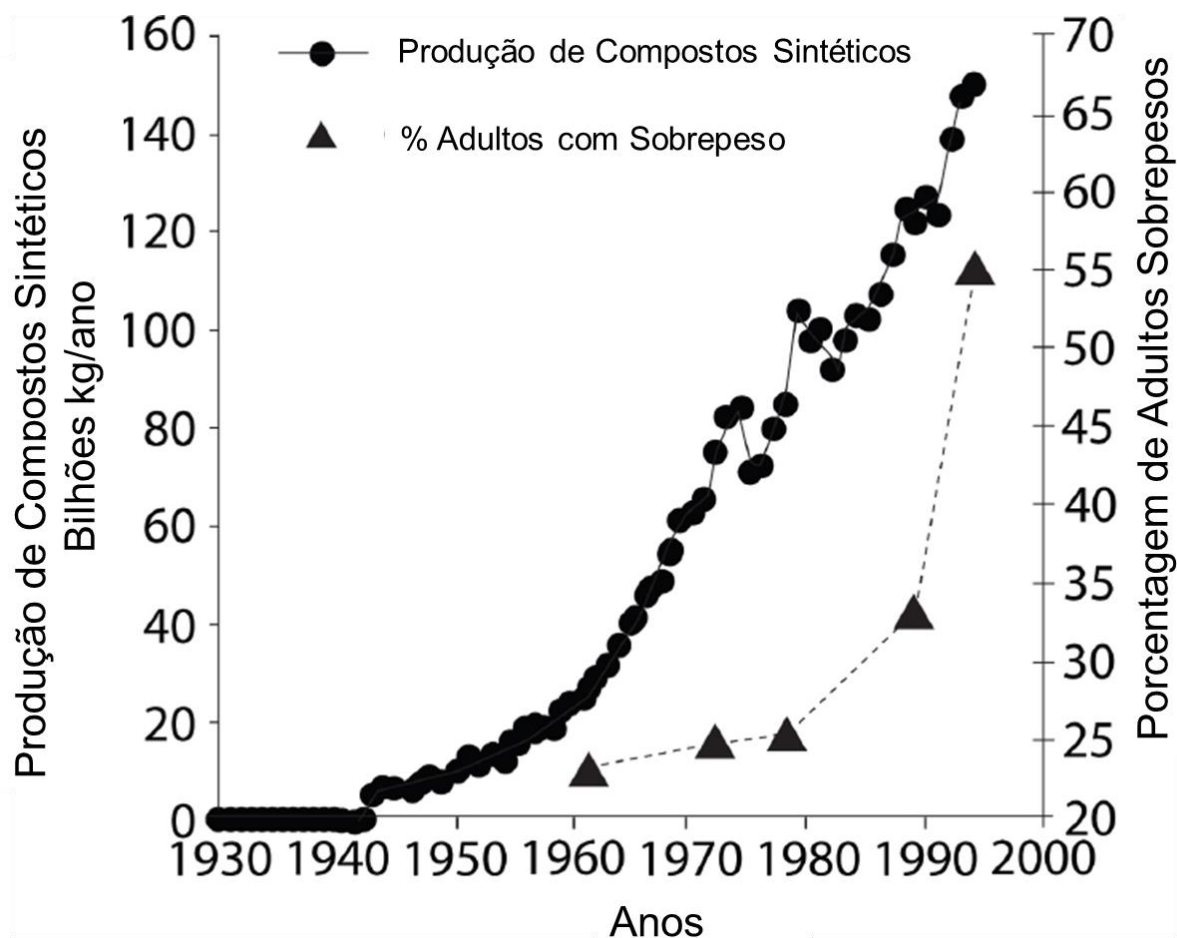


**Figura 1. Fatores de risco para desenvolvimento da obesidade.** As complexas interações subjacentes à obesidade poligênica demonstram que fatores genéticos, sociais, comportamentais e ambientais são todos capazes de influenciar o fenótipo obeso. (MUTCH; CLÉMENT, 2006)

Com o crescimento da industrialização e modernização mundial ocorreu o crescimento do desenvolvimento e da produção de compostos químicos orgânicos e inorgânicos. Notavelmente, este aumento se relacionou diretamente ao crescimento no número de pessoas obesas no mundo (BAILLIE-HAMILTON, 2002). Por essa razão foi questionado a participação desses compostos na patogênese da obesidade, e até mesmo no aumento de casos de outras doenças (MAGUERESSE-BATTISTONI et al., 2017; MCALLISTER et al., 2009). Nos últimos anos, foi



identificada uma classe de substâncias químicas que podem interferir nos processos metabólicos. O Centro Espanhol de Pesquisa Biomédica em Fisiopatologia da Obesidade e Nutrição (CIBERObn), que reúne 24 grupos de pesquisa, mostrou que certos compostos químicos sintéticos presentes no meio ambiente e na vida cotidiana, associados a pesticidas e inseticidas, mas também perfumes, plásticos ou cosméticos predispõem à obesidade. Esses compostos químicos também são encontrados em fertilizantes sintéticos, lixo eletrônico e aditivos alimentares que estão presentes na cadeia alimentar e produtos de consumo regular como alimentos, bebidas, produtos de cuidados pessoais e produtos de limpeza doméstica (HEINDEL et al., 2017; VELMURUGAN et al., 2017; WONG; DURRANI, 2017).



**Figura 2. A produção de produtos químicos orgânicos sintéticos e a porcentagem de adultos com excesso de peso nos Estados Unidos durante o século XX. A ilustração foi retirada de The Detox Diet, de Paula Baillie-Hamilton. Modificado de BAILLIE-HAMILTON, 2002.**

A OMS classifica essas moléculas como desreguladores endócrinos (EDC), também conhecidos como interferentes ou disruptores endócrinos. Além disso, a OMS define EDC como uma substância ou mistura exógena que altera(m) a função do sistema endócrino e conseqüentemente, causa(m) efeitos adversos para a saúde em um organismo intacto, sua progênie ou (sub) populações (WHO, 2013).

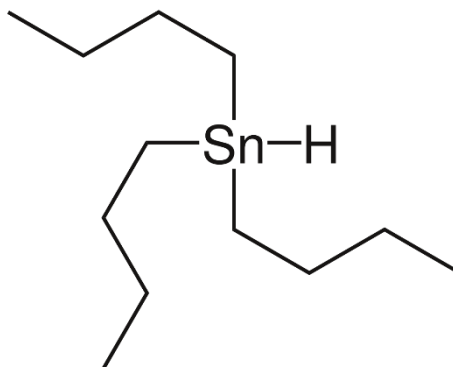
Presentes cada vez em maiores quantidades e variedades no meio ambiente, estes compostos são uma fonte de contaminação aos seres vivos e motivo de desenvolvimento de doenças (BOYER, 1989; JENKINS et al., 2009; LATINI, 2005).

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

Dentro da classe de EDCs, os compostos que estão relacionados com o desenvolvimento da obesidade são denominados desreguladores endócrinos obesogênicos, ou apenas obesogênicos. Os obesogênicos podem atuar alterando a diferenciação ou função das células adiposas e/ou iniciando ou exacerbando a desregulação dos controles homeostáticos (GRUn 2009). Estes incluem compostos aos quais a população humana está diariamente exposta por meio de seu uso em pesticidas/herbicidas, produtos industriais e domésticos, plásticos, detergentes, retardantes de chama e como ingredientes em produtos de higiene pessoal (THAYER et al., 2012). Devido ao efeito deletério dos obesogênicos sobre a saúde, é necessário caracterizar os danos causados pelas diferentes vias de exposição desses compostos. Isso implica determinar os mecanismos envolvidos nos quais os indivíduos entram em contato com o contaminante. Também é necessário entender o papel como desregulador metabólico e as diferentes consequências fisiológicas e patológicas, em particular a relação com os processos de adipogênese (GONZÁLEZ-CASANOVA et al., 2020; HEINDEL et al., 2017). Como exemplos

conhecidos desses compostos existem o bisfenol A, os ftalatos e os organoestânicos (OTs) (MAGUERESSE-BATTISTONI et al., 2017).

Organoestânicos são derivados tetravalentes sintéticos de estanho (IV) com uma fórmula geral de  $R(4-n)SnX_n$ , onde R representa substituintes orgânicos e X pode ser um haleto, ânion ou um grupo orgânico ligado covalentemente através de um heteroátomo (O, N, S, Cl, etc.) (Fig. 1) (HOCH, 2001). Mono-, di-, tri- e tetra-organoestânicos têm muitas aplicações industriais, como por exemplo, estabilizantes de PVC, biocidas em tintas anti-incrustantes, catalisadores na produção de polímeros, agentes preservativos de madeiras, pesticidas e fungicidas agrícolas, biocidas em materiais de construção e itens de casa, desinfetantes de superfície (incluindo aqueles usados em hospitais e prática veterinária), higienizadores de roupas, repelentes de roedores, detectores de cintilação de raios  $\gamma$  e raios X, aditivos balísticos para combustíveis sólidos de foguetes, ionóforos em eletrodos seletivos de íons de membrana líquida e fármacos, por exemplo, anti-inflamatórios e drogas para o tratamento de câncer (ROSENBERG, 2013; SOUSA et al., 2014). Dentre a gama de usos dos OTs a aplicação que gerou maior destaque foi sua ação em tintas anti-incrustantes. Estas tintas são aplicadas nos cascos de navios para evitar incrustações de organismos marinhos devido à ação biocida dos OTs, dessa forma, reduzindo o custo de manejo naval, do tempo de docagem e do consumo de combustíveis. Dentre os OTs aplicados para essa finalidade o tributilestanho (TBT) ganhou maior destaque (BRYAN et al., 1986; GRACELI et al., 2013). Estimasse que o uso de TBT nas tintas gerou uma renda na ordem de bilhões para a indústria naval por reduzir os gastos causados pelas incrustações (SOUSA et al., 2014).



**Figura 3. Estrutura do composto tributilestanho.**

[https://pt.wikipedia.org/wiki/Tributil\\_estanho](https://pt.wikipedia.org/wiki/Tributil_estanho) Acessado em 06 de junho 2022.

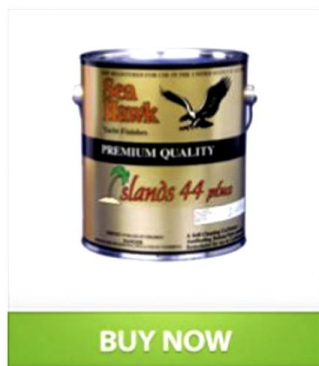
Contudo, por volta da década de 1970 surgiram os primeiros relatos de efeitos tóxicos do uso de TBT em tintas anti-incrustantes sobre organismos não alvos (ALZIEU, 1998; BLABER, 1970). Na Inglaterra o pesquisador Blaber (1970) encontrou sinais de alterações na anatomia do gastrópode *Nucella lapillus*, as quais se caracterizavam pelo surgimento de órgãos sexuais masculinos em indivíduos fêmeas. Este fenômeno foi denominado imposex, sendo comprovado posteriormente que a causa era exclusivamente a exposição ao TBT (MATTHIESSEN, 2013).

As primeiras regulamentações adotadas para o uso do TBT como biocida nas tintas anti-incrustantes surgiram em 1982, pelo Ministério Francês do Ambiente, com a finalidade de reduzir sua utilização (ALZIEU, 1998). Entretanto, esta diminuição não foi generalizada devido à importância econômica dessas tintas para as indústrias que utilizam o transporte marítimo (LIU et al., 1997). Com o passar do tempo, o TBT, bem como sua bioacumulação no ambiente, apresentou elevada toxicidade sobre várias espécies, o que gerou a adoção de uma série de restrições em vários países (DORNELES et al., 2008; MATTHIESSEN; GIBBS, 1998; WHALEN; LOGANATHAN; KANNAN, 1999). Em 2001, a Organização Internacional

Marítima (IMO) adotou um decreto, segundo o qual tintas com TBT teriam que ser removidas ou seladas dos cascos das embarcações até janeiro de 2008 (IMO, 1999).

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

## Islands 44 Plus™



### Available Colors:

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

Overview

Tech Specs

Buy Now

Related Products

### Tin-Based – 1000 Series

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

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

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

**Figura 4. Captura de tela Islands 44 Plus™ como anunciado no site Sea Hawk Paints.** <https://www.seahawkpaints.com/product/islands-44-plus/> Acessado em agosto de 2017.

A exposição ao biocida tributilestanho (TBT) continua sendo um importante problema de saúde pública por ser um poluente persistente e bioacumulativo e possuir uma longa história de amplo uso global (ANTIZAR-LADISLAO, 2008; BARBOSA et al., 2021; ECHA, 2008). Apesar dos esforços da IMO, por meio da Convenção Internacional sobre o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Nocivos em Navios para proibir o uso de tintas anti-incrustantes à base de TBT (setembro de 2008), e da Convenção de Rotterdam para proibir a comércio de tributilestanho (TBT), tintas anti-incrustantes contendo TBT como princípio ativo ainda estão sendo registradas para comercialização atualmente. De fato, estudos recentes relataram que anos depois a mesma situação não apenas persiste, mas pode ter uma

distribuição global ainda maior de TBT do que se pensava anteriormente (PAZ-VILLARRAGA; CASTRO; FILLMANN, 2022; UC-PERAZA; CASTRO; FILLMANN, 2022).

O TBT ainda é detectado em sedimentos marinhos (0,5–20.000 ng/g), água do mar (0,1–281,8 ng/l) e frutos do mar (0,15–19.757 ng/g), representando um problema ambiental ao longo de áreas costeiras sob a influência de portos e marinas, como Europa (FURDEK et al., 2012), Ásia (GARG et al., 2011), África do Sul (VAN GESSELLEN; BOUWMAN; AVERBUJ, 2018), Oceania (ROACH; WILSON, 2009), América do Norte (KEITHLY; CARDWELL; HENDERSON, 1999; TALLMON, 2012) e América do Sul (ABREU et al., 2021; BATISTA-ANDRADE et al., 2018; CASTRO et al., 2018). A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) estabeleceram uma ingestão diária tolerável para humanos (TDI) de 250 e 300 ng/kg/dia de TBT, respectivamente. O TDI foi obtido pela aplicação de um fator de segurança de 100 vezes ao nível de efeito adverso não observado (NOAEL) em camundongos, o qual é 25 µg/kg/d (EFSA, 2004; EPA, 1997; VOS et al., 1990).

No Brasil, diferentes estudos vêm demonstrando ao longo do tempo o perfil de contaminação por TBT no litoral brasileiro (CASTRO et al., 2008; DE CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012; FERNANDEZ et al., 2002). No Estuário de Santos foi encontrada a presença de TBT em crustáceos que foram coletados próximo a áreas de atividade naval, como ancoragem e docagem (CRISTALE et al., 2012). No sul da Bahia foi demonstrada a presença de gastrópodes afetados pelo fenômeno imposex, o qual é caracterizado como um indicador da contaminação por TBT (ZEIDAN; BOEHS, 2016). Já no Espírito Santo (ES) investigações demonstraram níveis preocupantes de contaminação por OTs no litoral do Espírito Santo utilizando espécies indicadoras, como as fêmeas do gastrópode *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (COSTA et al., 2008), essa contaminação se mostrou persistente com indícios de continuação do uso dessas tintas (COSTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2017). Todos esses dados demonstram a presença do TBT em grande parte do litoral brasileiro.



Além disso, o TBT tem uma meia-vida de dias a meses na água e até vários anos em sedimentos (ECHA, 2008; RÜDEL, 2003). O TBT possui alta taxa de acúmulo em organismos marinhos; entretanto, sua bioacumulação não segue a partição do equilíbrio ambiental (DORNELES et al., 2008). Organismos aquáticos podem ser expostos através da coluna de água, sedimentos e ingestão de alimentos contaminados. Organismos terrestres também podem ser expostos via sedimentos contaminados com TBT, aplicação de produtos biocidas e/ou lodo de esgoto contaminado no solo, deposição atmosférica e por ingestão de alimentos ou água contaminados (ANTIZAR-LADISLAO, 2008; SILVA et al., 2014). Assim, para a população em geral, a principal via de exposição à maioria dos OT é a ingestão, por meio do consumo de água, bebidas e alimentos contaminados, principalmente alimentos marinhos (AZENHA; VASCONCELOS, 2002; CHIEN et al., 2002).

A história do TBT está longe de terminar; de fato, a descoberta de suas novas potenciais ações como EDC o colocou novamente na vanguarda da pesquisa científica. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* com crustáceos, gastrópodes, anfíbios, peixes, roedores e humanos demonstraram que o TBT é capaz de interferir em muitos processos fisiológicos, induzindo efeitos tóxicos complexos (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013; GRÜN et al., 2006; Horiguchi et al., 1994; Jordão et al., 2015; Shi; Zhu; Guo, 2014; Zhang et al., 2011). Uma ampla gama de respostas prejudiciais é observada em moluscos, peixes e anfíbios expostos a baixos níveis de TBT (0,1-100 ng/L), tais como impossex, apoptose e metamorfose irregular (Horiguchi et al., 1994; Shi; Zhu; Guo, 2014; Zhang et al., 2011). Além disso, o OT pode se acumular em aves e mamíferos marinhos levando a disfunção reprodutiva e metabólica (Coenen et al., 1992; Dorneles et al., 2008). Em modelos de roedores, estudos toxicológicos mostraram anormalidades reprodutivas, metabólicas, cardiovasculares, renais, neurais, imunológicas e outras usando diferentes doses de TBT (100 ng – 100 mg/Kg) (Bertuloso et al., 2015; Coutinho et al., 2016; De Araújo et al., 2018; Dos Santos et al., 2012; EMA, 1999; GRÜN et al., 2006; Merlo et al., 2016; Podratz et al., 2012, 2015; SENA et al., 2017; Ximenes et al., 2017). Portanto, dados em diferentes modelos animais

demonstram os efeitos deletérios da exposição ao TBT em múltiplos sistemas de órgãos.

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

Dentre todas as outras ações tóxicas, os efeitos metabólicos do TBT requerem atenção por sua gravidade. O TBT é capaz de ativar o receptor PPAR $\gamma$ , que, dentre outras funções, é responsável pelo controle de adipogênese e lipogênese (GRÜN et al., 2006). Importante destacar que ele é capaz de ativar a adipogênese em diferentes idades e ambos os sexos (PENZA et al., 2011). Além disso, o TBT é capaz de causar inflamação e esteatose no fígado, aumentar as concentrações de insulina no sangue, induzir resistência à insulina e diminuir a tolerância à glicose, além de aumentar a adiposidade, com hipertrofia do tecido adiposo e inflamação neste que caracterizam um quadro de obesidade (BERTULOSO et al., 2015; CEOTTO FREITAS-LIMA et al., 2018).

O estudo da programação fetal relatou que a exposição ao TBT no útero leva a distúrbios metabólicos e imunológicos na vida adulta (COOKE et al., 2008; GRÜN et al., 2006; KIRCHNER et al., 2010). Camundongos fêmeas prenhas expostas a TBT (0,05 ou 0,5 mg/Kg) durante os dias gestacionais 12 a 18 têm filhotes com aumento da adiposidade no fígado, testículo, glândula mamária, gordura inguinal e epididimal durante a vida adulta. O TBT também estimulou a formação de adipócitos em células estromais da medula óssea humana com alta expressão de mRNA de proteína de ligação de ácidos graxos de adipócitos e menor expressão de proteínas

de fatores hematopoiéticos após 14 dias de exposição (1-10 nM) (CARFI' et al., 2008). Da mesma forma, anormalidades reprodutivas e metabólicas são encontradas em modelos de roedores de exposição a TBT com concentrações séricas de estanho variando entre 41 e 48,7 ng/g (BERTULOSO et al., 2015; SENA et al., 2017).

Apesar de vários estudos experimentais e evidências de que humanos podem ser expostos a diferentes fontes de TBT, dados disponíveis sobre sua ação em humanos são limitados (ANTIZAR-LADISLAO, 2008; GRACELI et al., 2013; RANTAKOKKO et al., 2013, 2014). Assim, há uma crescente preocupação pública sobre os possíveis efeitos nocivos à saúde humana resultantes da exposição ao TBT. Embora a exposição oral à água e/ou frutos do mar contaminados com OT tenha sido relatada como a principal causa de exposição humana, a taxa de consumo de frutos do mar per capita varia consideravelmente entre os diferentes países e regiões (KEITHLY; CARDWELL; HENDERSON, 1999). Amostras de frutos do mar coletadas em mercados asiáticos, europeus e norte-americanos em 1997 exibiram concentrações de TBT em média de 185 ng (g/peso seco) (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Peixes e frutos do mar coletados nos mercados finlandeses em 2000-2002 exibiram concentrações de TBT, MBT, trifenilestanho (TPT), DBT e difenilestanho (DPhT) de 2,53, 1,52, 1,11, 0,25 e 0,14 ng/g de peso fresco, respectivamente (RANTAKOKKO et al., 2006). A ingestão combinada de TBT, DBT e TPT de pessoas que consomem peixes e frutos do mar regularmente na Noruega foi entre 33-83 ng/kg de peso seco por dia, enquanto uma média entre pessoas que consomem grandes quantidades desses alimentos foi de 70-170 ng/kg de peso seco por dia (EFSA, 2004; FLOYD; GEORGE, 2005).

Em voluntários adultos alemães com idade entre 18 e 54 anos, ambos os sexos apresentaram concentrações séricas de TBT e TPT variando de 0,02–0,05 µg/L e 0,17–0,67 µg/L, respectivamente (LO et al., 2003). Tsuda et al. (1995) relataram uma ingestão diária de óxido de tributilestanho (TBTO) estimada em 6-9 µg/dia avaliada durante 1991 e 1992 no Japão. As concentrações de monobutilestanho, DBT e TBT em fígados humanos obtidos por autópsia no

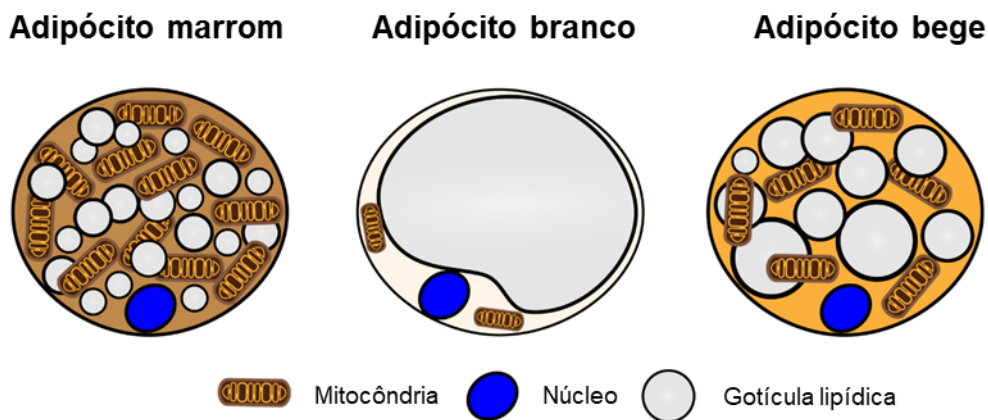
Hospital Universitário Ehime, Japão, entre 1997-1998, estavam na faixa de 14-22, 45-78 e <2 ng/g, peso úmido, respectivamente (TAKAHASHI et al., 1999). Concentrações de tributilestanho variando de 320 a 1510 ng/g de peso seco foram observados em amostras de ostras de Taiwan e foram dependentes dos locais de amostragem. A ingestão de ostras pelos pescadores foi relatada entre 94 e 250 g/dia, e da população geral foi de 139 g/dia (CHIEN et al., 2002). O consumo médio de frutos do mar de um chinês foi relatado como 68,8 g/dia (1997-1999), e o nível médio tolerável de resíduos para frutos do mar na China é estimado em 90,8 ng Sn/g. As concentrações de TBT, DBT e MBT em moluscos coletados da baía chinesa de Bohai em 2003 variaram de <2,8 a 383,9, <3,2 a 158,1 e <2,5 a 52,2 ng Sn/g, respectivamente (CAO et al., 2009; YANG et al., 2006). Gui-bin et al. (2000) também relataram eventos de envenenamento humano na China como resultado da exposição ao TMT (trimetilestanho). O estudo mostrou que dezoito funcionários foram expostos ao TMT em 1998 devido ao seu uso como estabilizador plástico sem equipamento de proteção, resultando na morte de um dos trabalhadores.

No entanto, a estimativa da taxa de ingestão de frutos do mar das comunidades ribeirinhas brasileiras é de 200 g/dia/70 kg com base na literatura anterior de avaliações de risco à saúde humana (FERNANDEZ; LIMAVERDE; SCOFIELD, 2005; HO; LEUNG, 2014). Observamos altas concentrações séricas de estanho ( $37,0 \pm 2,0$  Sn ng/g), ciclos estrais irregulares, desenvolvimento folicular ovariano anormal e deposição de colágeno ovariano em ratas como resultado da exposição oral a taxas semelhantes às de ribeirinhos brasileiros através do consumo de frutos do mar contaminados com OT ( $844,3 \pm 7,0$  Sn ng/g) coletados na Baía de Vitória, ES, Brasil em 2007-2012 (PODRATZ et al., 2015, 2020). TBT (155 ng/ml) foi detectado em sangue humano de participantes do estudo em Michigan, EUA (WHALEN; LOGANATHAN; KANNAN, 1999). Outros estudos mostraram que as concentrações de TBT no tecido humano variam entre 0,01 e 85,0 ng/g (KANNAN et al., 1996; NIELSEN; STRAND, 2002; RANTAKOKKO et al., 2013, 2014).

Atualmente, existem dados disponíveis limitados sobre o acúmulo de OT/TBT humano, e a avaliação de risco com base em estudos experimentais em animais e ingestão humana estimada de fontes de alimentos contaminados com OT/TBT pode levantar preocupações devido à disparidade de dados qualitativos e quantitativos (MERLO et al., 2018).

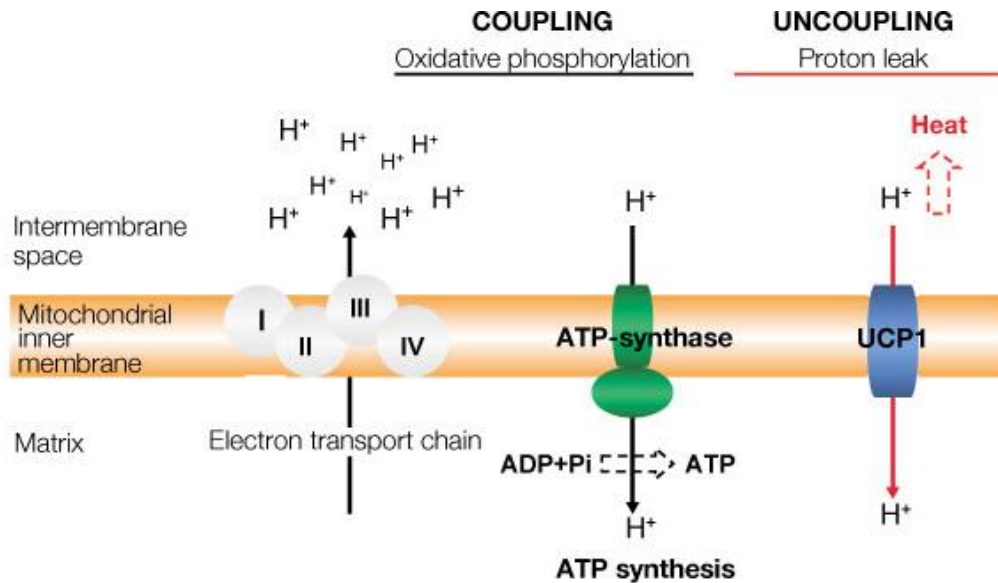
No contexto da patogênese da obesidade e exposição a compostos capazes de causar alterações endócrino-metabólicas, há um componente que vem ganhando destaque, o tecido adiposo marrom (TAM). Esse tecido relacionado com a manutenção da temperatura corporal em recém-nascidos e animais de pequeno porte, surge como possível alvo terapêutico para controle dessa doença (CHONDRONIKOLA; SIDOSSIS, 2019; SCHEELE; WOLFRUM, 2020). Contudo, a investigação dos efeitos dos EDCs se faz cada vez mais importante para elucidar o papel desse tecido na complexa trama da obesidade (DI GREGORIO et al., 2019).

O TAM possui essa coloração por apresentar alta vascularização e grandes quantidades de mitocôndrias nos seus adipócitos, o que o diferencia do tecido adiposo branco (TAB) (CANNON; NEDERGAARD, 2004), sendo que essas características são essenciais para o desempenho de suas funções. Ao contrário do TAB, que tem por função o armazenamento de gordura e controle endócrino-metabólico, o TAM é um órgão que realiza alto gasto energético. Este gasto ocorre para a formação de calor, a qual pode ser realizada com ou sem tremor por mamíferos (Fig. 3) (WARWICK; BUSBY, 1990). A termogênese no TAM ocorre sem tremor devido a ação da proteína desacopladora 1 (UCP1) nas mitocôndrias dos adipócitos marrons. A UCP1 desacopla o fluxo de prótons da cadeia respiratória mitocondrial gerando calor pela dissipação da energia que seria utilizada para a produção de ATP (Fig. 4) (CANNON; NEDERGAARD, 2004; VAN DEN BERG et al., 2017). A alta vascularização é necessária para distribuição do calor produzido pelo TAM para o restante do corpo. Há também o tecido adiposo bege que se diferencia do TAM por necessitar de estimulação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos e frio para expressar UCP1 em suas mitocôndrias, diferentemente do TAM o qual expressa UCP1 constitutivamente (Van de berg).



	<i>Marrom</i>	<i>Branco</i>	<i>Bege</i>
<b>Expressão UCP1</b>	Positivo	Negativo	Positivo
<b>Densidade mitocondrial</b>	Alta	Baixa	Média
<b>Morfologia da GL</b>	Multilocular	Unilocular	Multilocular
<b>Função primária</b>	Termogênese Endócrina	Guardar energia Endócrina	Termogênese? Endócrina?

**Figura 5. Características gerais dos adipócitos marrons, brancos e bege.** O adipócito marrom estimulado (esquerda) contém numerosas pequenas gotículas lipídicas, muitas mitocôndrias e expressa altos níveis de proteína de desacoplamento 1 (UCP1), que está incorporada na membrana mitocondrial interna e necessária para a termogênese. A cor da gordura marrom reflete o alto teor de ferro das mitocôndrias. Um adipócito branco (meio) em contraste contém uma única gota de lipídio grande (unilocular), menos mitocôndrias e não expressa UCP1. Um adipócito bege (à direita) é caracteristicamente intermediário entre o adipócito marrom e o branco, possuindo múltiplas gotículas lipídicas (multilocular) (embora muitas vezes maiores do que as observadas em um adipócito marrom), mais mitocôndrias do que um adipócito branco e expressa UCP1. Modificado de JUNG; SANCHEZ-GURMACHES; GUERTIN, 2019.



**Figura 6. Localização e função UCP1 na cadeia respiratória mitocondrial (CRM).** Os números I-IV correspondem aos complexos CRM. A ATP-sintase é o quinto complexo da CRM. Durante a respiração, os prótons são bombeados através dos complexos CRM, e um gradiente de prótons é gerado. A energia do gradiente de prótons conduz a síntese de ATP pelo complexo ATP-sintase. UCP1 catalisa uma reentrada regulada de prótons na matriz, desacoplando o CRM e, conseqüentemente, reduzindo a síntese de ATP e gerando calor (BRONDANI et al., 2012).

A atividade termogênica do TAM é altamente regulada pelo sistema nervoso autônomo simpático, o qual é ativado nos casos de exposição ao frio (VAN DEN BERG et al., 2017). A ação do simpático sobre o TAM ocorre via ativação do receptor de membrana  $\beta$ 3-adrenérgico, um receptor acoplado a proteína Gs, o qual encontra-se em sua maioria no TAM. Este receptor ativa a adenilato ciclase e dessa maneira aumenta os níveis de AMPc na célula, o AMPc ativa a quinase dependente de AMPc (PKA) (CANNON; NEDERGAARD, 2004; LOWELL; SPIEGELMAN, 2000). A PKA ativa a termogênese em duas fases: agudamente aumentando a

lipólise, a captação de glicose e a atividade da UCP1 nos adipócitos; e cronicamente aumentando a transcrição gênica, a partir da ativação de fatores de transcrição e seus coativadores, como a proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB), PPAR $\gamma$  e PPAR coativador 1 alfa (PGC-1 $\alpha$ ), e do aumento da expressão genes ligados a termogênese, como o gene da UCP1 e genes que regulam a biogênese mitocondrial (LOWELL; SPIEGELMAN, 2000; PUIGSERVER; SPIEGELMAN, 2003).

Embora a atividade simpática provavelmente seja um importante regulador abrangente da atividade do TAM, outros mediadores também participam dessa regulação. As “batocinas”, do termo em inglês, *batokines*, são substâncias produzidas pelo TAM e atuam nos diferentes tipos de células que o compõem (SCHEELE; WOLFRUM, 2020; YANG; STANFORD, 2022). As batocinas podem ser ferramentas valiosas para aumentar a quantidade de adipócitos marrons ativos maduros em humanos adultos. As batocinas têm atividades autócrinas, parácrinas ou endócrinas. As batocinas abrangem uma variedade de moléculas de sinalização, incluindo peptídeos, metabólitos, lipídios ou microRNAs (YANG; STANFORD, 2022).

Outro regulador importante da ação do TAM é a inflamação. Diferentes células inflamatórias e citocinas por elas liberadas agem no TAM (VILLARROYA et al., 2018). A sinalização pró-inflamatória pode prejudicar a sensibilidade à insulina do BAT (CANNON; NEDERGAARD, 2004; VILLARROYA et al., 2018). O BAT está entre os tecidos mais sensíveis à insulina em modelos experimentais de roedores e o efeito da sinalização pró-inflamatória na captação de glicose induzida pela insulina é exemplificado pelo TNF $\alpha$ , que induz fortemente a resistência à insulina em adipócitos marrons através da interação com receptores TNF (TNFR) em sua superfície celular (LORENZO et al., 2008; NIETO-VAZQUEZ et al., 2008; VALVERDE et al., 1998). Além de seus efeitos metabólicos, as citocinas pró-inflamatórias parecem alterar a atividade termogênica específica do TAM. Assim, a inflamação induzida por macrófagos infiltrados no TAM pode causar resistência à insulina e reduzir a termogênese (SAKAMOTO et al., 2016). Além dos efeitos diretos



que as citocinas pró-inflamatórias parecem transmitir ao interagir com os receptores na membrana dos adipócitos marrons, a inflamação pode inibir especificamente a estimulação de adipócitos marrons baseada no sistema nervoso simpático (NGUYEN et al., 2011; QIU et al., 2014).

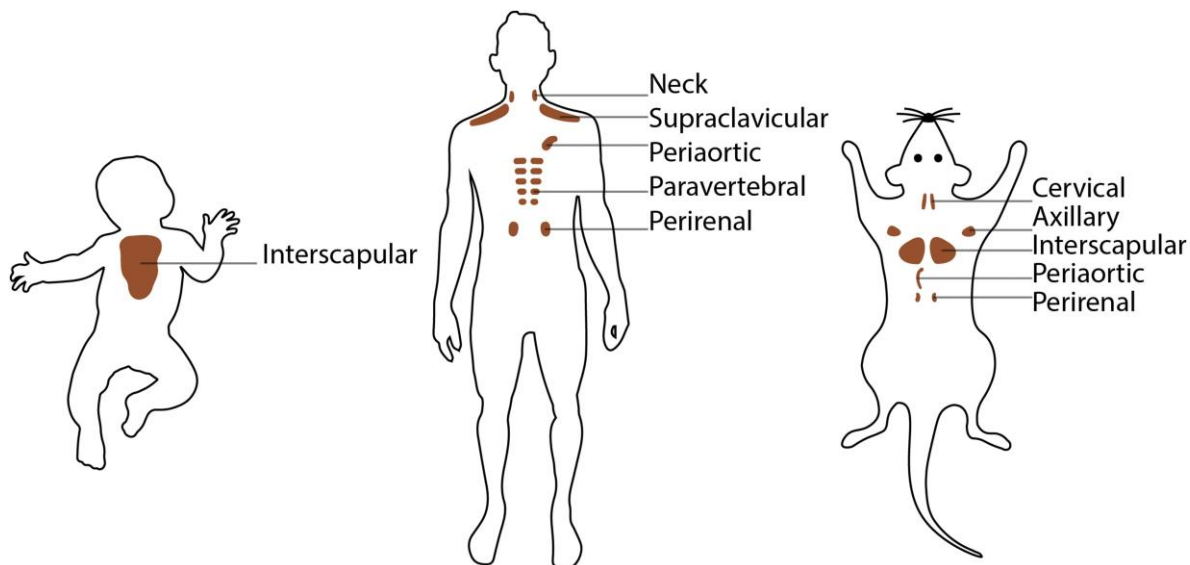
O tecido adiposo marrom (TAM) foi primeiramente descrito em roedores por Conrad Gessner em 1551 (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Estudos na década de 1980 forneceram uma evidência clara de que o TAM não está presente apenas em recém-nascidos, mas também em humanos adultos, mostrando a presença da UCP1 em depósitos adiposos diversos, e sua ativação em pacientes com feocromocitoma (LEAN et al., 1986a, 1986b). Desde o início do século 20, os anatomistas notaram que o tecido adiposo é um tecido contendo aspecto altamente heterogêneo (CHONDRONIKOLA; SIDOSSIS, 2019). Os primeiros estudos localizaram o TAM nas áreas interescapular, axilar, paravertebral e perirrenal, tanto em bebês (CHONDRONIKOLA; SIDOSSIS, 2019) quanto em adultos (HEATON, 1972). Embora esses estudos iniciais tenham apoiado que o TAM ainda está presente em adultos (BOUILLAUD; COMBES-GEORGE; RICQUIER, 1983; HEATON, 1972; HUTTUNEN; HIRVONEN; KINNULA, 1981; HUTTUNEN; KORTELAINEN, 1990) até a nona década de vida (LEAN, 1989), prevaleceu a noção de que apenas animais e humanos recém-nascidos possuem quantidades fisiologicamente significativas de TAM (CUNNINGHAM; STOLWIJK; WENGER, 1978; LEAN, 1989) e o interesse científico em TAM humano não ganhou força.

Em 2002 radiologistas realizando tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada (PET/CT) usando 2-desoxi-2-[18F]fluoroglicose (18F-FDG) radiomarcada para fins de diagnóstico de câncer, relataram um aumento da captação de glicose radiomarcada incomum e simétrico no tecido adiposo perto da base do pescoço, tórax e áreas do ombro que não correspondiam ao câncer (HANY et al., 2002). Semelhante às lesões malignas, o TAM metabolicamente ativo capta quantidades significativas de glicose e 18F-FDG da circulação e, assim, pode ser facilmente visualizado por PET/CT. A prevalência desse aumento da captação de 18F-FDG na área supraclavicular foi associada à

menor temperatura externa (CHRISTENSEN; CLARK; MORTON, 2006; COHADE; MOURTZIKOS; WAHL, [s.d.]; KIM et al., 2008), magreza (STURKENBOOM et al., 2004) e ao sexo feminino (COHADE et al., 2003; TRUONG et al., 2004). A administração de propranolol (betabloqueador não seletivo) reduziu a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG (SÖDERLUND; LARSSON; JACOBSSON, 2007; TATSUMI et al., [s.d.]). Embora os radiologistas estivessem convencidos de que o aumento da atividade metabólica observado correspondia ao TAM hipermetabólico (HANY et al., 2002), o resto do mundo científico continuou a ignorar sua presença. Há pouco tempo, Nedergaard et al. resumiu os achados mencionados anteriormente, apoiando a noção há muito negligenciada de que os adultos humanos possuem quantidades significativas de TAM (NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007). Em 2009, três estudos independentes forneceram evidências sólidas de que humanos adultos possuem quantidades significativas de TAM funcional (CYPESS et al., 2009; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009; VIRTANEN et al., 2009).

O mapeamento morfológico de autópsias (AHERNE; HULL, 1964; HEATON, 1972) e a ressonância magnética *post-mortem* (LIDELL et al., 2013) revelaram grandes quantidades de TAM em bebês humanos, sugerindo que essa gordura é um regulador necessário da temperatura corporal no início da vida, quando o tremor muscular ainda não é desenvolvido (LIDELL, 2018). Esta produção de calor provavelmente também é a função mais importante em pequenos mamíferos, como os ratos e camundongos (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Um extenso mapeamento *post-mortem* de adipócitos marrons em tecidos adiposos humanos desde a infância e até os 80 anos de idade revelou uma mudança gradual na morfologia dos adipócitos multiloculares (que possuem múltiplas gotículas de lipídios) (HEATON, 1972). Durante a primeira década de vida, os adipócitos multiloculares eram abundantes e continham apenas pequenas quantidades de lipídios. Esse fenótipo foi encontrado até os 20 anos de idade, embora com menor frequência entre os indivíduos. Após isso, adipócitos multiloculares ainda foram encontrados, no entanto, essas células estavam mais cheias de lipídios (HEATON, 1972).

Nos mamíferos de pequeno porte, independentemente da idade, e nos de grande porte recém-nascidos o TAM é um órgão bem desenvolvido o qual garante o controle da temperatura (Fig.5) (DE JONG et al., 2015; SMITH, 1964). Contudo, em adultos de animais de grande porte, como os humanos, acreditava-se que os depósitos de TAM eram totalmente perdidos e a termogênese era exclusivamente dependente de músculo esquelético. Entretanto, estudos demonstraram que humanos adultos possuem depósitos de TAM espalhados pelo corpo, que são formados por adipócitos marrons em pequenas quantidades e/ou adipócitos brancos com características de adipócitos marrons, e que estes participam do balanço energético. Esses adipócitos parecidos com adipócitos marrons estão presentes principalmente no TAB e são induzidos quando expostos a estímulos externos, como frio ou agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (GIRALT; VILLARROYA, 2013; HARMS; SEALE, 2013; LEE; LEE; OH, 2019). O tecido adiposo bege, como é conhecido, também expressa UCP1, mas em condições normais a expressão de UCP1 é muito menor no tecido adiposo bege do que no TAM clássico. No entanto, quando exposto a estímulos externos, como exposição ao frio ou  $\beta$ -adrenérgica, a UCP1 é regulada positivamente e o tecido adiposo bege se assemelha ao TAM clássico (VELICKOVIC et al., 2018; WU et al., 2012). UCP1 é conhecido por ser o marcador definidor para as atividades termogênicas de adipócitos marrons/bege (SHAPIRA; SEALE, 2019).



**Figura 7. Locais de depósitos de TAM em humanos e roedores.** Os recém-nascidos humanos têm um depósito interescapular distinto de TAM que regride com a idade. Os adultos humanos têm depósitos de TAM supraclaviculares na região do pescoço. Depósitos menores também podem ser encontrados ao longo da aorta, vértebras e rins. TAM é encontrado em diferentes locais em roedores. O TAM cervical está localizado abaixo dos músculos que vão da parte de trás da cabeça até a área interescapular. A porção ventrolateral das escápulas é um depósito axilar de TAM. O principal depósito de TAM é encontrado na região interescapular. TAM também é proeminente ao redor da aorta e do hilo dos rins. (VAN DEN BERG et al., 2017).

Curiosamente, de forma semelhante aos pequenos mamíferos (CANNON; NEDERGAARD, 2004), a atividade do TAM adulto é aumentada em associação com uma refeição e está ligada à captação de ácidos graxos livres e glicose (U DIN et al., 2018), sugerindo um papel independente do frio, embora ainda simpaticamente regulado, do TAM promovendo a homeostase metabólica. Notavelmente, como mencionado acima, a morfologia do TAM em humanos adultos difere daquela dos

bebês e é caracterizada por uma mistura heterogênea de adipócitos uniloculares e multiloculares com um teor de gordura maior do que o observado no TAM infantil homogeneamente multilocular (HEATON, 1972; JESPERSEN et al., 2013, 2019; ZINGARETTI et al., 2009). A este respeito, o TAM infantil se assemelha ao TAM interescapular de camundongos alojados em temperaturas abaixo da termoneutralidade (30°C), enquanto o TAM de adultos tem a morfologia do TAB inguinal de camundongos alojados em condições frias ou TAM interescapular de camundongos alojados na termoneutralidade (SANCHEZ-GURMACHES et al., 2018). Assim, a morfologia do TAM parece refletir o uso ou atividade do tecido.

Desde a descoberta de que humanos adultos possuem TAM funcionalmente competente ou uma foto comparando roedores e humanos pela presença do TAM (CYPESS et al., 2009; SAITO et al., 2009; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009; VIRTANEN et al., 2009; ZINGARETTI et al., 2009), vários estudos abordaram sua função no metabolismo energético. Foi demonstrado que em humanos adultos o conteúdo ativo de TAM está negativamente correlacionado com o IMC (SAITO et al., 2009; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009) e estudos *in vivo* sugerem um papel funcional de TAM no metabolismo de todo o corpo (CHONDRONIKOLA et al., 2014, 2016; CYPESS et al., 2015; LEE et al., 2014; SCHEELE; NIELSEN, 2017). É importante ressaltar que estudos usando 18F-FDG PET/CT após a exposição ao frio sugerem que nem todos os indivíduos têm TAM responsivo ao frio, revelando uma perda de uma função metabólica potencialmente importante em uma grande parte da população (BETZ et al., 2013; GERNGROSS et al., 2017; SAITO et al., 2009; YONESHIRO et al., 2011, 2013). Embora tenham sido relatados pequenos aumentos na resposta do TAM após a exposição repetida ao frio (HANSSEN et al., 2015, 2016; LEE et al., 2014), a ativação do TAM está claramente associada à idade (YONESHIRO et al., 2011, 2013) e nenhuma abordagem satisfatória para restaurar eficientemente o TAM funcional em indivíduos idosos e obesos foi relatada até o momento.

Duas descobertas importantes no final dos anos 2000 despertaram um interesse renascentista no TAM: (1) os adipócitos marrons, diferentemente das

células de TAB, são derivados de precursores miogênicos (TIMMONS et al., 2007) e (2) existe um terceiro tipo de adipócitos (célula de gordura bege) que expressam UCP1 juntamente com outros marcadores moleculares de adipócito marrom (PETROVIC et al., 2010; WU et al., 2012). É um debate de longa data se a interconversão ocorre entre adipócitos marrons e adipócitos brancos (FRONTINI et al., 2013) e se isso constitui um processo uni ou bidirecional. Foi demonstrado que a diferenciação de adipócitos termogênicos em TAB durante a aclimação ao frio ocorreu através do recrutamento *de novo* de pré-adipócitos (WANG et al., 2013). No entanto, ainda não está claro se a interconversão branca de adipócitos marrons é devido a uma mudança de identidade celular ou devido à formação de um estado de adipócitos marrons “inativo” “ou dormente” (ROSENWALD et al., 2013). No entanto, um estudo recente sobre TAM perirrenal em adultos demonstra a presença de adipócitos uniloculares que são positivos para UCP1, e a fração vascular estromal de biópsias adiposas nesta região continha pré-adipócitos que se diferenciaram em adipócitos termogênicos *in vitro* (JESPERSEN et al., 2019). Em conjunto, esses achados enfatizam a plasticidade do TAM e parecem refletir uma contínua adaptação dependente do ambiente desse tecido (SCHEELE; NIELSEN, 2017).

As primeiras demonstrações de uma ligação entre obesidade e TAM foram obtidas em camundongos obesos genéticos (camundongos ob/ob), onde foi encontrada redução nas atividades termogênicas do TAM, bem como em ratos alimentados com dieta de cafeteria onde foi evidente a ativação do TAM (ROTHWELL; STOCK, 1979, 1981; THURLBY; TRAYHURN, 1979). Essas observações iniciais foram seguidas por vários estudos de outros modelos genéticos e não genéticos de obesidade, confirmando a ligação entre a termogênese no TAM e a obesidade em roedores (TRAYHURN; BEATTIE, 2001). Um ponto crítico é a confirmação se os dados que mostram a ligação entre TAM e obesidade em modelos experimentais animais podem sugerir uma correlação semelhante em humanos. Estudos demonstraram que variantes genéticas de UCP1 são associados ao metabolismo da gordura, obesidade e diabetes (JIA et al., 2010).

A descoberta de que adipócitos multiloculares também estão presentes no TAB abriu novas oportunidades no direcionamento do tecido adiposo para combater doenças induzidas pela obesidade (BARGUT et al., 2017; CEREIJO; GIRALT; VILLARROYA, 2015). De fato, alteração na expressão gênica termogênica do tecido adiposo foi encontrado em resposta à obesidade e diabetes (KELLER; ATTIE, 2010; MARCELIN; CHUA JR, 2010; RUSCHKE et al., 2010). Além disso, também foi sugerido que TAB e TAM, apesar de suas funções opostas, compartilham a capacidade de diferenciação trans reversível recíproca em resposta a necessidades fisiológicas. Assim, o balanço energético positivo crônico tem sido sugerido para induzir o clareamento, enquanto a necessidade crônica de termogênese tem sido sugerida para induzir o escurecimento (CINTI, 2011, 2018). Embora existam algumas preocupações sobre se a termogênese facultativa do TAM pode ser mais do que um componente muito menor do gasto energético em humanos adultos, essas últimas descobertas levam a um interesse renovado na ativação e/ou recrutamento de TAM na etiologia e terapia da obesidade e doenças metabólicas relacionadas em humanos. Portanto, os adipócitos marrons são atualmente possíveis alvos para tentativas de tratamento da obesidade e suas complicações por meio do aumento do gasto energético (TIMMONS et al., 2007; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009). Estudar fatores secretados de TAM metabolicamente ativo, conhecido como batocinas, oferece uma abordagem alternativa para identificar novos alvos de drogas para regulação metabólica.

Como já mencionado a função do TAM diminui com a obesidade e o envelhecimento, dando-lhe uma aparência esbranquiçada, mas os mecanismos que contribuem para esse declínio não foram completamente definidos. Enquanto mais de 100 estudos analisaram recentemente o mecanismo de escurecimento do TAB, muito poucos estudos se concentraram nos processos pelos quais o TAM clareia (MORI et al., 2014; VERNOCHE et al., 2014). Foi demonstrado em um modelo de rato que a obesidade induz o clareamento do TAM que é caracterizado pela diminuição da sinalização  $\beta$ -adrenérgica, acúmulo de grandes gotículas lipídicas e disfunção e perda mitocondrial (SHIMIZU et al., 2014). A influência potencial de

poluentes ambientais na homeostase energética e no desenvolvimento da obesidade, alterando a atividade termogênica do TAM, recentemente chamou atenção como possível causa de clareamento e indução de obesidade (ZHANG; SUN; LIU, 2016).

Em relação aos poluentes obesogênicos a literatura apresenta poucas informações sobre EDCs e a atividade do TAM. O diclorodifeniltricloroetano (DDT), e seu metabólito primário diclorodifenildicloroetileno (DDE) (LA MERRILL et al., 2014; LEE et al., 2011; TAYLOR et al., 2013), bem como em partículas finas transportadas pelo ar (poluentes de trânsito) (XU et al., 2010, 2011a, 2011b), são alguns compostos que demonstraram prejudicar a massa e a função do TAM em associação com o desenvolvimento de obesidade e/ou metabolismo doenças relacionadas. Em relação aos poluentes anti-obesogênicos, o perfluorooctanossulfonato (PFOS) e o ácido perfluorooctanóico (PFOA), que têm uma associação reversa com a obesidade e estão associados ao aumento da expressão de UCP1 e aumento da capacidade oxidativa nas mitocôndrias da gordura marrom (SHABALINA et al., 2015, 2016). Os efeitos opostos desses diferentes poluentes ambientais sugerem que mais estudos são necessários para esclarecer a resposta metabólica aos EDCs. Poucos estudos relataram os efeitos do TBT na função do BAT adulto (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013; SHOUCRI et al., 2018). Chamorro-García et al., (2013) observaram um efeito modesto na morfologia do BAT em camundongos machos adultos e um efeito mais modesto ou inalterado em camundongos fêmeas após a exposição pré-natal ao TBT. O tratamento com TBT resulta na incapacidade de induzir marcadores de escurecimento dos adipócitos, em parte devido à sinalização sustentada do interferon (SHOUCRI et al., 2018).

Visto o estudo da possibilidade do aumento da participação do consumo energético por meio da ativação de TAM em pacientes obesos como uma forma de tratamento (ORAVA et al., 2011; SAITO et al., 2009; WICKSTEED; DICKSON, 2017), poucos estudos investigaram a consequência da obesidade sobre o TAM, os quais demonstraram que nesse quadro o TAM apresenta características



semelhantes ao TAB, adipócitos uniloculares, com grande acúmulo de lipídios, baixa função mitocondrial e baixa vascularização (FAN et al., 2016; SHIMIZU; WALSH, 2015). Contudo, mesmo com a grande influência dos compostos desreguladores endócrinos sobre o surgimento da epidemia de obesidade, a sua participação sobre o TAM ainda foi pouco investigada.

Assim, os efeitos do TBT sobre a função do TAM permanecem obscuros. No presente estudo, investigamos se o nosso modelo de exposição usando uma dose subaguda baixa de TBT levaria a anormalidades do TAM, como prejuízo na termogênese, intolerância ao frio, acúmulo de lipídios do TAM, inflamação, estresse oxidativo e fibrose por meio de um mecanismo de desregulação endócrina.

#### **4. HIPÓTESE**

Nossa hipótese é que a exposição ao composto TBT pode alterar a morfometria e função do TAM, e até mesmo prejudicar a geração de calor do indivíduo. Este possível comprometimento da função termogênica do TAM, por alteração de vias moleculares regulatórias, componentes celulares e/ou extracelulares necessários para sua correta função, seja por ação direta do TBT ou por ação indireta causada pela obesidade induzida pelo TBT, pode contribuir para o efeito obesogênico apresentado pelo TBT.

## 5. JUSTIFICATIVA

A população mundial atualmente sofre os efeitos da pandemia de obesidade, doença que afeta diferentes aspectos da vida e está relacionada a graves comorbidades e até mesmo a morte. Dentre os fatores que desencadeiam a obesidade se encontram compostos químicos denominados obesogênicos. Sendo TAM um possível alvo terapêutico para o tratamento da obesidade é de grande importância o estudo dos efeitos da exposição ao TBT, um composto com capacidade de geração de obesidade, sobre a função do TAM para maior entendimento dos possíveis efeitos a partir desta exposição. Possibilitando assim a geração de conhecimento para embasar a criação e/ou reavaliação de normas das agências regulamentadoras.

## 6. OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

Avaliar o efeito da exposição subaguda de baixa dose de TBT sobre a função metabólica de ratos, com foco na termogênese.

### **Objetivo específico**

Avaliar os efeitos da exposição ao TBT sobre a morfofisiologia dos diferentes órgãos que participam da função metabólica:

1. Tecido adiposo branco;
2. Pâncreas;
3. Fígado;
4. Tireoide;
5. Tecido adiposo marrom.

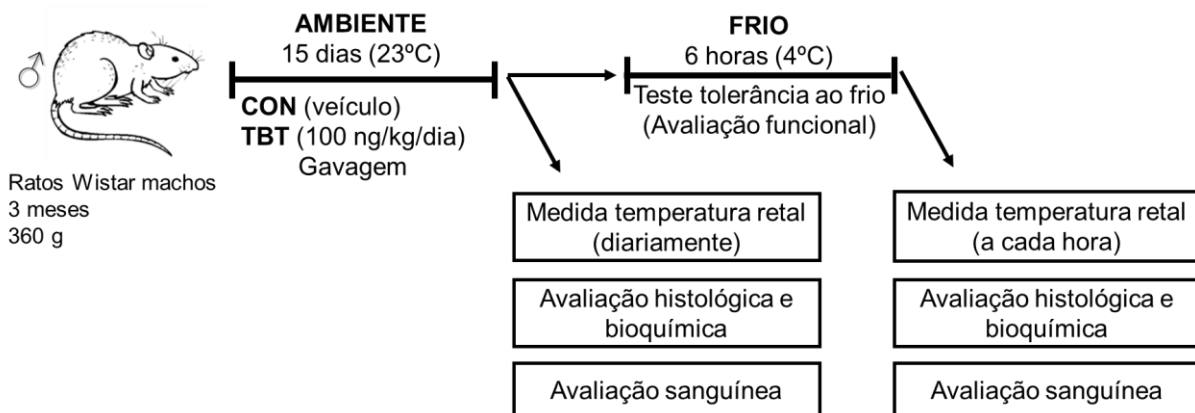
## 7. MATERIAL E MÉTODOS

### Composto

Foi utilizado o Cloreto de tributilestanho – TBT - (TBT, 96%, Sigma, St. Louis, Mo., USA), o qual foi dissolvido em 0,4% etanol, baseado em protocolos de estudos prévios (BERTULOSO et al., 2015; PODRATZ et al., 2012). O reagente usado foi de grau analítico.

### Animais experimentais

Ratos Wistar adultos (12 semanas de idade) foram mantidos sob temperatura controlada entre 23-25°C com ciclo claro/escuro de 12:12 h. Ração para ratos e água filtrada da torneira foram fornecidas à vontade. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética em Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES) (60/2017). Os ratos foram divididos em dois grupos: ratos controle (CON, n=30) foram tratados diariamente com veículo (0,4% etanol) e ratos TBT (TBT, n=30) foram tratados diariamente com TBT (100 ng/kg/dia) por 15 dias por gavagem. Após o tratamento alguns animais (n=15) foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 mg/kg e 4,5 mg/kg, respectivamente, injeção intraperitoneal) antes da eutanásia e os órgãos úmidos foram pesados (Fig. 6). Alguns animais passaram por um teste de tolerância ao frio antes da eutanásia (n=15). As doses e vias de exposição foram escolhidas com base em nossos estudos anteriores (BERTULOSO et al., 2015; MERLO et al., 2016) para induzir um aumento nas concentrações séricas de estanho e complicações metabólicas (BERTULOSO et al., 2015; SENA et al., 2017).



**Figura 8. Modelo experimental.**

### **Aferição da temperatura retal e teste de tolerância ao frio**

Os animais foram mantidos a  $24 \pm 1$  °C (condição ambiente). Nos dias de medição os animais tiveram um tempo de habituação de 2h ao ambiente do teste. Os animais foram imobilizados antes do teste, estes passaram por adaptação à imobilização previamente. As medições basais das temperaturas internas do corpo foram realizadas com um termômetro retal (Physitemp, RET-3 probe). Para aferição da temperatura o termômetro era inserido no reto do animal sem ultrapassar a profundidade de 2 cm, evitando contato com fezes para não influenciar na medida de temperatura. Todo procedimento foi realizado por pesquisador devidamente treinado neste protocolo, evitando um desconforto do animal e garantindo coleta adequada dos dados. Estudos de teste de tolerância ao frio foram realizados em incubadoras de roedores com temperatura controlada. Os ratos foram colocados em gaiolas pré-refrigeradas a 4-5 °C com cama, maravalha, acesso livre a comida e água padrão. A temperatura foi medida a cada 60 min durante um período de 6h. Animais com redução de temperatura abaixo de 32 °C foram retirados do protocolo, para evitar sofrimento e potencialmente morte por hipotermia (EMMETT et al., 2017; MEYER; OOTSUKA; ROMANOVSKY, 2017). A morfofisiologia do TAM também foi avaliada após o teste de tolerância ao frio (condição de frio).

### **Adiposidade, perfil lipídico, tolerância à glicose e análise de sensibilidade à insulina**

Para avaliar os parâmetros metabólicos de ratos CON e TBT, foram avaliados peso corporal, adiposidade (que foi obtida pela soma dos pesos dos tecidos adiposos epididimal, abdominal, retroperitoneal e perirrenal), peso e morfologia do fígado (BERTULOSO et al., 2015; SENA et al., 2017). As concentrações séricas de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG) foram avaliados a partir do soro. A avaliação de CT, HDL, LDL e TG foi realizada por meio de kits colorimétricos de acordo com as orientações do fabricante (Biolin) (BERTULOSO et al., 2015; MERLO et al., 2016). Um teste de sensibilidade à insulina (TSI) foi realizado sem jejum, os animais foram injetados i.p. com insulina (0,75 U/kg de peso corporal; Sigma-Aldrich). As concentrações de glicose no sangue foram registradas em 0, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de insulina. Para avaliar o teste de tolerância à glicose (TTG), ratos em jejum receberam i.p. D-glicose (2 mg/g de peso corporal) e as concentrações de glicose no sangue foram registradas em 0, 15, 30, 60 e 90 min usando um glicosímetro Accu-Chek (Roche Diagnostics Corp, Ind) (BERTULOSO et al., 2015; SENA et al., 2017).

### **Ensaio hormonal**

As concentrações séricas de insulina, adiponectina, leptina, T4 livre e T3 total foram medidos por meio de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Diagnostic Prod. Corporation, LA, CA) (CEOTTO FREITAS-LIMA et al., 2018; KURIYAMA et al., 2007).

### **Avaliação das atividades das enzimas hepáticas**

As atividades séricas da transaminase pirúvica (TGP) e da transaminase oxalacética (TGO) foram medidas usando kits colorimétricos de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) (BERTULOSO et al., 2015).

### **Dissecção do tecido adiposo marrom**

Para dissecção do TAM foi preciso primeiro retirar o TAB subcutâneo que fica acima do mesmo. O TAB subcutâneo anterior está localizado entre as escápulas, descendo da nuca até as axilas do animal e encontra-se diretamente em cima do depósito TAM interescapular. Para isolar o depósito subcutâneo anterior, o animal foi colocado em decúbito ventral, sua pele dorsal na nuca foi levantada e foi feito um pequeno corte na pele. Com cuidado foi feita uma incisão vertical na linha média (2-3 cm) através da pele, começando na nuca e descendo ao longo da coluna até o meio das costas e duas incisões horizontais (1 cm cada), estendendo-se lateralmente a partir da linha média, na parte superior e inferior da incisão vertical. A pele foi descascada cuidadosamente para expor a parte anterior do depósito subcutâneo. O depósito foi retirado seguindo as bordas naturais do tecido. Para isolar o TAM foi feito um corte horizontal ao longo da parte inferior borda do tecido subcutâneo anterior, seguindo a borda natural do depósito. Em seguida foram feitas duas incisões verticais ao longo da lateral bordas do depósito, seguindo as bordas naturais do tecido. O TAB foi virado cuidadosamente para cima e assim foi revelado o TAM interescapular em forma de borboleta embutido no TAB. O TAM foi separado cuidadosamente do TAB circundante (BAGCHI; MACDOUGALD, 2019).



### **Análise morfológica**

O tecido adiposo epididimal (TAE), fígado, pâncreas, tireoide e TAM foram removidos de ratos CON e TBT e fixados em PBS-formalina (4%) (pH 7,4) por 24 – 48 horas em temperatura ambiente. Os órgãos embebidos em parafina foram seccionados em fatias de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (H&E); as fatias foram examinadas como imagens de alta qualidade (2048×1536 pixels) usando um microscópio Olympus (AX70; Olympus, Center Valley, PA), fotografadas com uma câmera AxioCamICc1 e exportadas para o software AxioVision (software 4.8). As fotomicrografias foram obtidas com objetivas de 10 e 100x e foram utilizadas para avaliar a estrutura organizacional geral e a composição celular (BERTULOSO et al., 2015; SENA et al., 2017). O diâmetro dos adipócitos do TAE foi determinado como a média da distância entre os diâmetros maior e menor dos adipócitos (LUDGERO-CORREIA et al., 2012). O número de ilhotas pancreáticas foi contado e representado como número de ilhotas por milímetro quadrado (YAMABE; KANG; ZHU, 2010). O número de folículos tireoidianos foi contado e representado como número de folículos por milímetro quadrado e o diâmetro do folículo foi determinado como a distância média entre os folículos maiores e menores (RODRIGUES-PEREIRA et al., 2022). O teor de lipídios do TAM foi mostrado como a porcentagem da área coberta por vesículas lipídicas, medida usando ImageJ. O número de vasos sanguíneos BAT foi contado e representado como número de vasos sanguíneos por milímetro quadrado. O número de gotículas lipídicas foi calculado usando o plugin Adiposoft do programa ImageJ (GALARRAGA et al., 2012). A densidade numérica de adipócitos uni e multiloculares foi estimada dividindo-se o número total de núcleos contados na área de teste, exceto aqueles que tocam a linha de exclusão, pela área de teste em mm<sup>2</sup> e selecionando o número de gotículas em cada adipócito a partir da imagem gerada pela análise do plugin Adiposoft (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013; RANGEL-AZEVEDO et al., 2022; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012; SHIMIZU et al., 2014).

### **Avaliação da presença de mastócitos**

Cortes dos tecidos foram corados com Alcian Blue de acordo com um protocolo padrão (Sigma-Aldrich Co, LLC). Cada uma das seções de 5 µm foi usada para obter fotomicrografias (objetivas de 40 e 100x). O número de células coradas positivamente (ou seja, células contendo grânulos citoplasmáticos roxos) dentro do tecido foi avaliado. O número de células coradas positivamente foi então expresso por unidade de área (mm<sup>2</sup>) (BERTULOSO et al., 2015; MERLO et al., 2016).

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

O número de neutrófilos nos tecidos foram mensurados pela avaliação de atividade de MPO, como previamente descrito (ARAÚJO et al., 2010). Os órgãos foram pesados, homogeneizados em tampão pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO<sub>4</sub> e 0,015 M NaEDTA) e centrifugados. Os pellets foram então suspensos em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5%, seguido por 3 ciclos de congelamento e descongelamento usando N<sub>2</sub>(l) e centrifugados. Atividade de MPO no sobrenadante das amostras foi avaliada pela medida da mudança de absorção óptica (DO) em 450 nm usando tetrametilbenzeno (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 mM). A reação foi terminada pela adição de 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 M). Os resultados são expressos como mudança de DO/mg de proteína.

A infiltração de células mononucleares nos tecidos foi quantificada pela medida do nível da enzima lisossomal NAG, a qual está presente em altos níveis em macrófagos ativados (BARCELOS et al., 2005). A hipófise e adrenal foram homogeneizadas em salina 0,9% contendo Triton X-100 0,1% vol/vol (Promega) e depois centrifugados. Uma amostra do sobrenadante foi incubada por 10 minutos com 100 mL de p-nitrofenil-n-acetil-β-d-glicosamida (Sigma-Aldrich Co, LLC) que foi preparada em tampão citrato/fosfato (0,1M ácido cítrico e 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 4,5) para atingir uma concentração final de 2,24 mM. A reação foi terminada adicionando

100 mL de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6). Hidrólise do substrato foi determinado pela mensuração da absorção em 400 nm. Os resultados são expressos como DO/mg de tecido.

### **Avaliação da densidade de superfície de colágeno**

Cortes de TAM foram corados com Picosirius red e usados para obter 15 fotomicrografias usando a objetiva de 20x. As áreas do TAM foram selecionadas aleatoriamente e as áreas contendo apenas adipócitos unicelulares e vasos sanguíneos foram evitadas. Os campos aleatórios de cada órgão foram analisados usando o software ImageJ. As imagens foram convertidas em imagens de alto contraste preta e brancas para visualizar as áreas coradas de colágeno. Os resultados representam a porcentagem de colágeno depositado na área total de TAM (MERLO et al., 2016; PODRATZ et al., 2015).

### **Ensaio de ânion superóxido**

Para detectar os níveis do ânion superóxido ( $O_2^-$ ), criosecções (8  $\mu$ m) do TAM embebidos em OCT foram descongelados e incubados com o corante fluorescente sensível a  $O_2^-$  dihidroetídio (DHE) a 37°C por 30 minutos no escuro (MERLO et al., 2019). Imagens foram obtidas usando um microscópio Leica com detector de fluorescência a 585 nm (DM 2500). A intensidade do sinal, indicando a produção de  $O_2^-$ , foi analisada na área de interesse em 20 secções do órgão por um estudo cego. Processamento e análise microscópica foram realizados no Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica, UFES. Os níveis de  $O_2^-$  indicam estresse oxidativo.

## **Análise estatística**

Todos os dados são relatados como a média  $\pm$  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* dessa 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 o teste t de Student não pareado para dados gaussianos. Além disso, para os dados não gaussianos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. ANOVA de duas vias foi utilizada para linhas do gráfico para verificar a interação entre as variáveis independentes (tempo e deformação) e foi seguida pelo pós-teste de Turkey. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Para avaliar a relação entre os parâmetros avaliados, foi utilizada a correlação de Spearman ou Pearson caso fosse detectada uma distribuição não gaussiana ou gaussiana, respectivamente. Todas as correlações foram obtidas a partir de valores de animais pareados. Finalmente, quando a significância estatística foi identificada, testamos se a regressão linear ou não linear era mais adequada. As análises estatísticas e a construção gráfica foram realizadas no GraphPad Prism versão 6.00 (La Jolla, CA, EUA).

## 8. RESULTADOS

### **Efeitos da exposição ao TBT no peso corporal, adiposidade, função do TAB e perfil lipídico**

Ratos expostos a uma dose subaguda baixa de TBT não apresentaram alterações significativas no peso corporal, peso TAE e adiposidade em comparação com ratos CON ( $p > 0,05$ , Fig.6A, B e C, respectivamente). Da mesma forma, não foram observadas alterações significativas no diâmetro dos adipócitos no TAE, presença de mastócitos e atividade de MPO e NAG (presença de neutrófilos e macrófagos) ( $p > 0,05$ , Fig.6D, E, F, G, H, I, J e K), bem como entre as concentrações séricas de adiponectina e leptina entre os grupos experimentais analisados (Fig.6L e M). Os pesos de TAM, fígado, rim, adrenal, baço, coração, testículos, epidídimo, gordura retroperitoneal, perirrenal e mesentérica foram semelhantes entre os ratos CON e TBT (Tabela 1,  $p > 0,05$ ). Ratos TBT não apresentaram alterações significativas nas concentrações séricas de TG, TC e HDL em comparação com ratos CON ( $p > 0,05$ , Tabela 2). No entanto, um aumento nas concentrações séricas de LDL foi observado em ratos TBT em comparação com ratos CON (Tabela 2,  $p > 0,05$ ).

**Tabela 1. Avaliação do peso de órgãos e tecidos.**

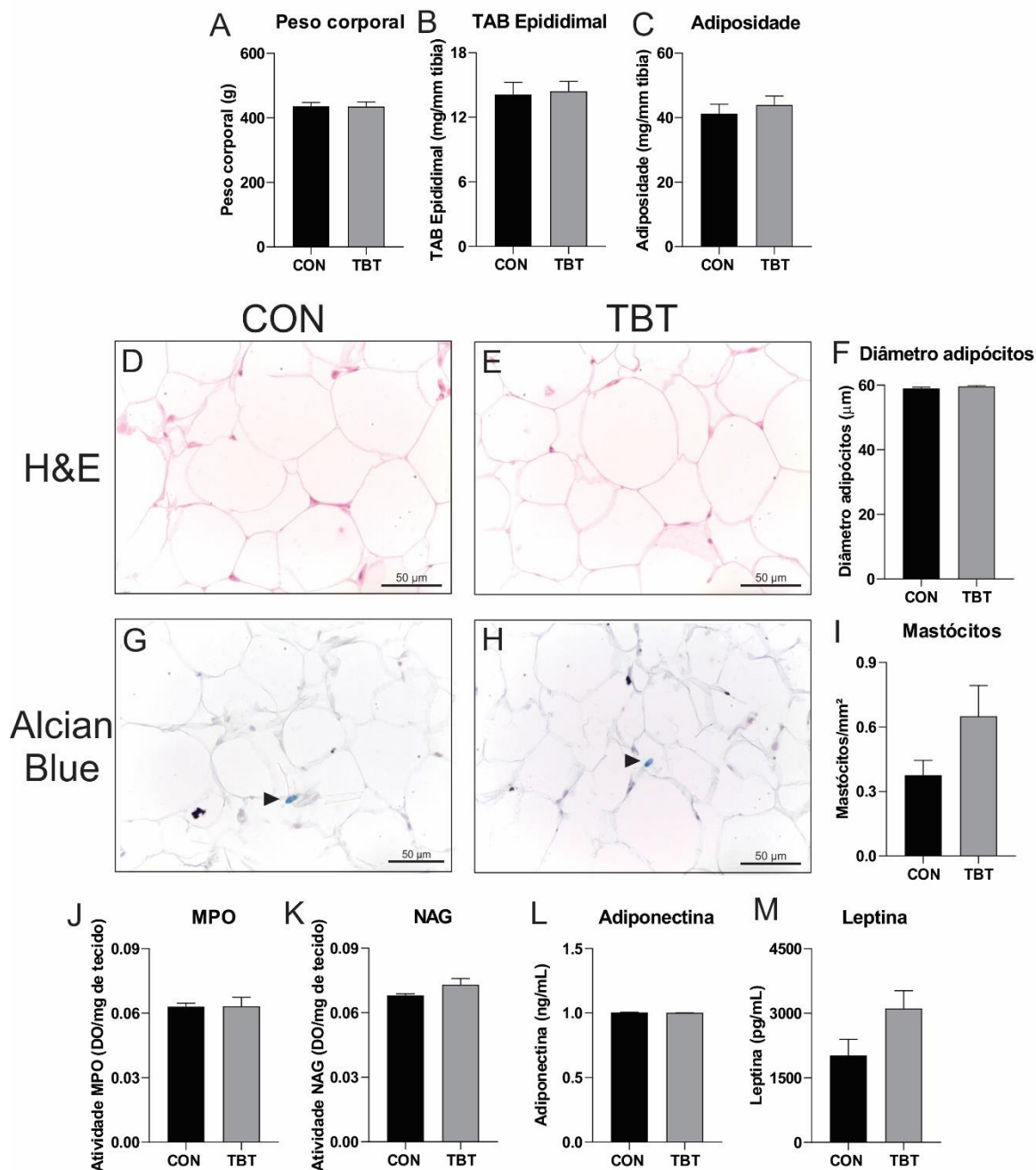
Peso (mg/mm tibia)	CON	TBT
Tecido adiposo marrom	0,60 ± 0,03	0,70 ± 0,06
TAB retroperitoneal	121,3 ± 5,89	134,7 ± 8,14
TAB perirrenal	37,4 ± 3,07	44,0 ± 3,29
TAB mesentérico	104,0 ± 7,82	116,7 ± 11,4
Fígado	383,1 ± 28,2	385,6 ± 49,2
Rins	64,3 ± 3,14	62,5 ± 3,57
Adrenal	1,15 ± 0,16	1,20 ± 0,11
Baço	18,8 ± 0,57	18,5 ± 0,85
Coração	30,1 ± 1,08	29,4 ± 0,99
Testículos	71,1 ± 1,36	68,5 ± 5,76
Epididímos	22,5 ± 0,89	21,9 ± 1,08

Os valores são expressos como média ± EPM (n = 5). TAB: Tecido adiposo branco. (Teste t de Student).

**Tabela 2. Efeitos da exposição ao TBT sobre o perfil lipídico.**

	CON	TBT
<b>TG</b>	174,6 ± 30,6	145,3 ± 17,9
<b>CT</b>	87,5 ± 6,07	78,3 ± 7,84
<b>HDL</b>	12,1 ± 2,31	17,0 ± 8,17
<b>LDL</b>	10,0 ± 2,06	15,1 ± 1,56*

CT: Colesterol Total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; TBT: Tributilestanho; TG: Triglicerídeos. p < 0,05 vs CON. Média ± EPM. n = 4 (Teste t de Student).



**Figura 9. Peso corporal, adiposidade, peso e morfologia do tecido adiposo TAE e níveis de adipocinas em ratos machos.** (A) peso corporal, (B) peso TAE e (C) adiposidade em ratos CON e TBT. Cortes representativos corado com H&E de TAE de ratos CON (D) e TBT (E). (F) Diâmetro dos adipócitos no TAE. Cortes representativos corado com Alcian Blue de TAE de ratos CON (G) e TBT (H). (I) Número de mastócitos, (J) atividade de MPO e (K) atividade de NAG no TAE. Níveis

séricos (L) de adiponectina e (M) de leptina. Teste t de Student. Ponta de seta: Mastócitos; MPO: Mieloperoxidase (presença de neutrófilos); NAG: N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase (presença de macrófagos); TAE: tecido adiposo epididimal.

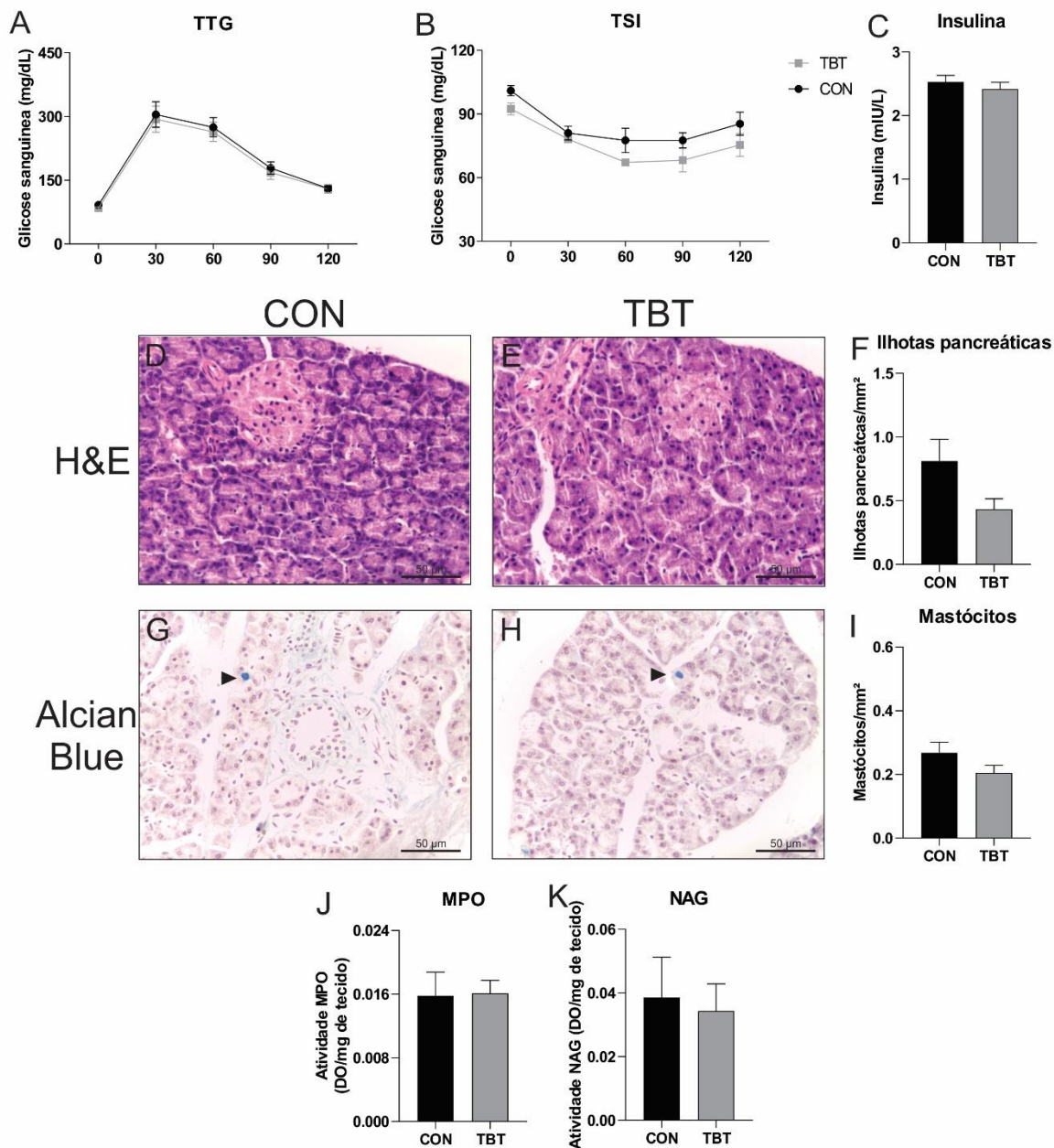
### **Efeitos da exposição ao TBT no metabolismo da glicose**

O teste de tolerância à glicose e o teste de sensibilidade à insulina demonstraram que os ratos TBT respondem de forma semelhante aos ratos CON após estímulos de glicose e insulina, bem como as concentrações séricas de insulina não apresentaram alterações ( $p > 0,05$ , Fig.7A, B e C, respectivamente). O número de ilhotas, número de mastócitos e atividade de MPO e NAG do pâncreas não mostraram alterações significativas após a exposição a TBT ( $p > 0,05$ , Fig.7D, E, F, G, H, I, J e K, respectivamente).

### **Efeitos da exposição ao TBT na morfofisiologia hepática**

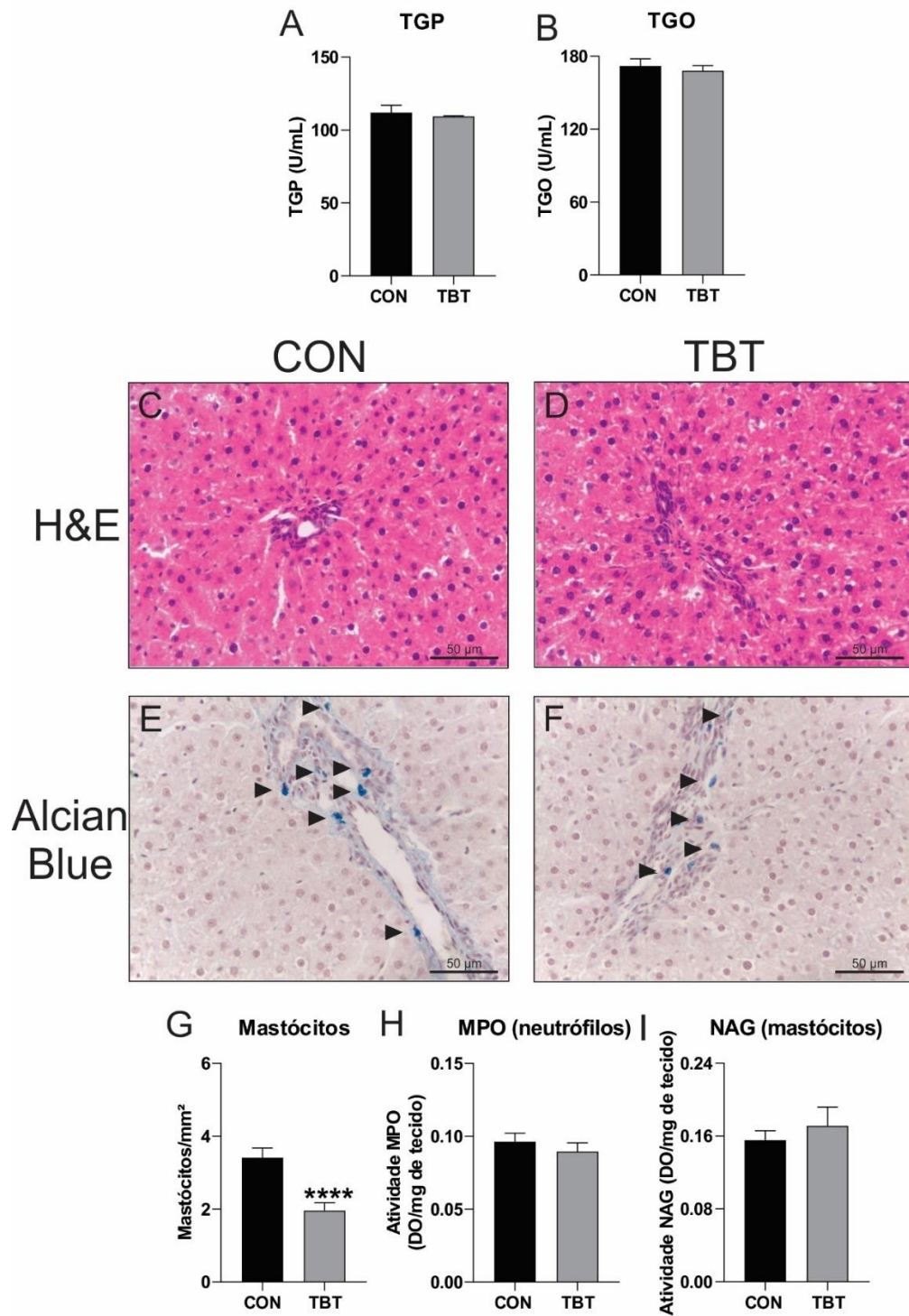
As atividades séricas da TGP e da TGO não mostraram alterações significativas entre os ratos CON e TBT ( $p > 0,05$ , Fig.8A e B, respectivamente). Além disso, o fígado corado com H&E de ratos CON e TBT mostrou poucas alterações morfológicas. Ambos os fígados apresentavam arquitetura hepática normal com parênquima composto por células poligonais unidas entre si em placas anastomosadas, com bordas voltadas para sinusóides ou hepatócitos adjacentes e espaço portal preservado (Fig.8C e D). No entanto, uma redução no número de mastócitos foi observada no fígado de ratos TBT em comparação com ratos CON ( $p < 0,05$ , Fig.8E, F e G). Não foram observadas alterações significativas na atividade hepática de MPO e NAG entre os dois grupos ( $p > 0,05$ , Fig.8H e I, respectivamente).





**Figura 10. Metabolismo da glicose e avaliação da morfologia do pâncreas em ratos machos.** (A) TTG, (B) TSI e (C) níveis séricos de insulina em ratos CON e TBT. Cortes representativos corado com H&E em ratos CON (D) e TBT (E). (F) Número da ilhotas pancreáticas. Cortes representativos corado com Alcian Blue do pâncreas de ratos CON (G) e TBT (H). (I) Número de mastócitos do pâncreas. (J) Atividade de MPO no pâncreas. (K) Atividade de NAG do pâncreas. Teste t de Student. Ponta de seta: Mastócitos; TTG: Teste de tolerância à glicose; TSI: Teste

de sensibilidade à insulina; MPO: Mieloperoxidase; NAG: N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase.

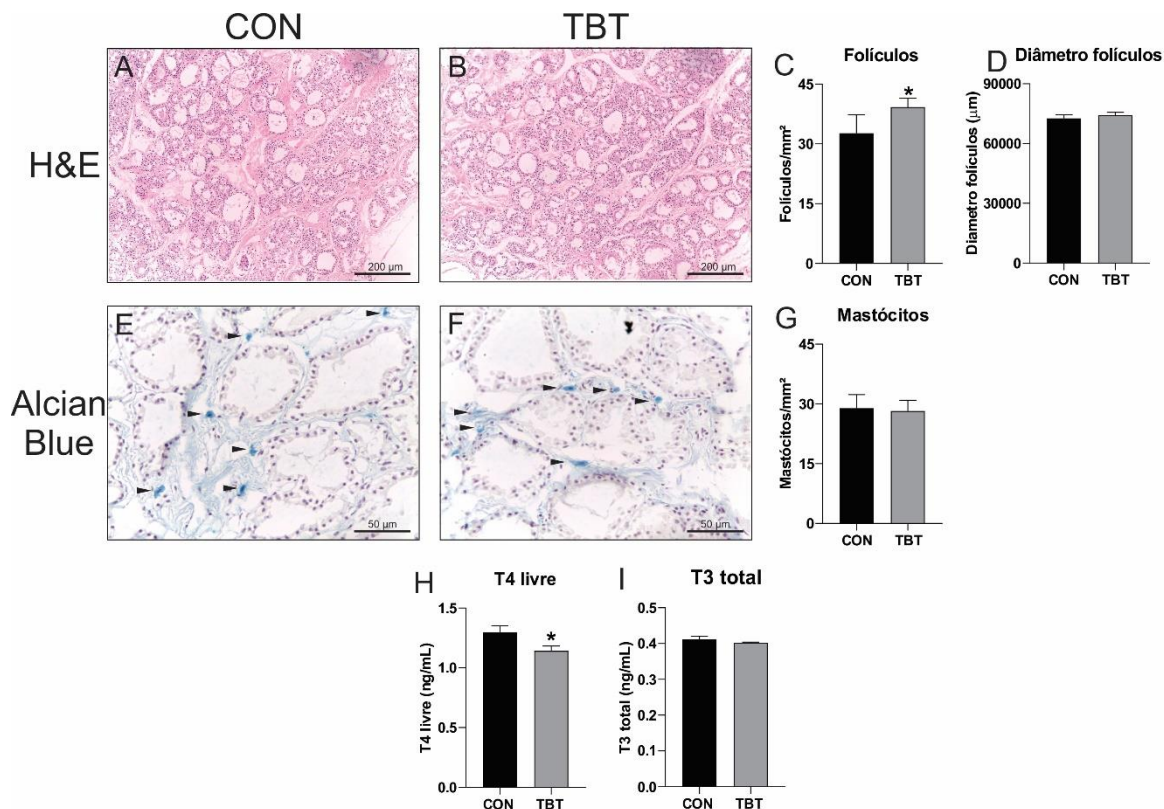


**Figura 11. Avaliação da função e morfologia hepática em ratos machos. (A)** Atividade sérica de TGP e **(B)** atividade sérica de TGO em ratos CON e TBT. H&E representativo do fígado de ratos CON **(C)** e TBT **(D)**. Corte representativo de fígado

corado com Alcian Blue de ratos CON (E) e TBT (F). (G) Número de mastócitos do fígado. (J) Atividade de MPO no fígado. (K) Atividade de NAG do fígado. \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs CON. Teste t de Student. Ponta de seta: Mastócitos; TGO: transaminase glutâmica oxaloacética; TGP: Glutamato Piruvato Transaminase; MPO: Mieloperoxidase; NAG: N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase.

### **Efeitos da exposição ao TBT na morfofisiologia da tireoide**

As tireoides coradas com H&E de ratos TBT mostraram poucas alterações morfológicas. As glândulas tireoides CON exibiram uma organização histológica característica, com folículos maiores na periferia da glândula e folículos de vários tamanhos na região central (Fig.9A). No entanto, um aumento nos folículos tireoidianos foi observado em ratos TBT em comparação com ratos CON ( $p < 0,05$ , Fig.9 B e C). Não foram observadas alterações significativas no diâmetro do folículo tireoidiano (Fig. 9D) e na presença de mastócitos (Fig.9E, F e G) entre os dois grupos. Os concentrações séricos de T4 livre foram reduzidos pela exposição a TBT ( $p < 0,05$ , Fig.9H); no entanto, os concentrações totais de T3 permaneceram semelhantes em ratos TBT em comparação com ratos CON ( $p > 0,05$ , Fig.9I).



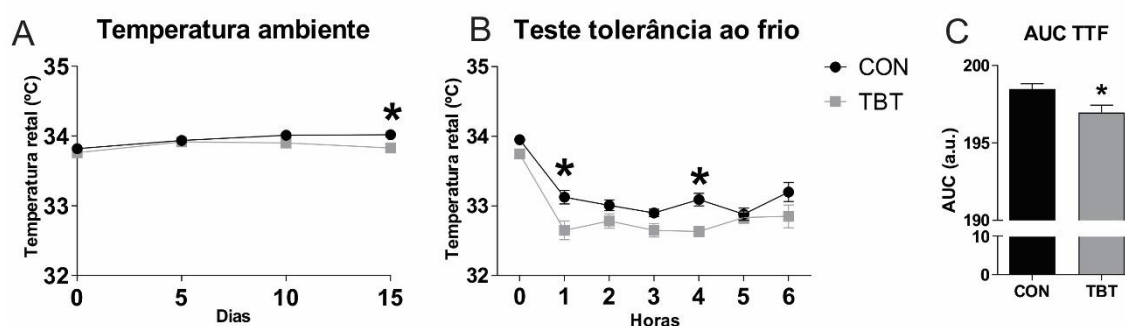
**Figura 12. Avaliação da função e morfologia da tireóide em ratos machos.** Corte representativo de tireóide corado com H&E de ratos CON (A) e TBT (B). (C) Diâmetro dos folículos tireoidianos e (D) número de folículos tireoidianos. Corte representativo de tireóide corado com Alcian Blude de ratos CON (E) e TBT (F). (G) Número de mastócitos na tireoide. (H) Níveis séricos de T4 livre. (I) Níveis séricos de T3 total. \* $p < 0,05$  vs CON. Teste t de Student. Ponta de seta: Mastócitos; T3: Triiodotironina; T4: Tiroxina.

### Efeitos da exposição ao TBT na temperatura corporal

Ratos TBT apresentaram redução da temperatura retal no dia 15 de tratamento em comparação com ratos CON em condição ambiente (Fig. 10A,  $p < 0,05$ ). Foram observadas em ratos TBT uma redução na temperatura retal nos tempos 1 e 4 horas e diminuição de 0,8% da área sob a curva (AUC) durante o teste

de tolerância ao frio em comparação com ratos CON (Fig. 10B e C, respectivamente,  $p < 0,05$ ).

Peso corporal, adiposidade e BAT, pesos de gordura epididimal, retroperitoneal, perirrenal e mesentérica foram semelhantes entre ratos CON e TBT na condição de frio (Tabela 3,  $p > 0,05$ ).



**Figura 13. Temperatura retal em ratos machos.** (A) Temperatura retal em temperatura ambiente. (B) Temperatura retal durante TTF em ratos machos CON e TBT. (C) Área abaixo da curva da temperatura retal do TTF. \* $p < 0,05$  vs CON. Teste t de Student usado na avaliação da AUC. ANOVA de duas vias (teste de comparação múltipla de Tukey). AUC: área sob a curva; TTF: teste de tolerância ao frio.

**Tabela 3. Avaliação do peso corporal, de órgãos e tecidos após TTF.**

Peso (mg/mm tibia)	CON	TBT
Peso corporal (g)	426,7 ± 11,0	440,9 ± 6,93
Tecido adiposo marrom	0,62 ± 0,05	0,64 ± 0,07
TAB epididimal	153,0 ± 10,0	149,0 ± 4,90
TAB retroperitoneal	144,8 ± 12,8	143,7 ± 6,67
TAB perirrenal	50,1 ± 6,41	45,5 ± 2,69
TAB mesentérico	116,3 ± 7,70	102,5 ± 8,00
Adiposidade	412,2 ± 29,6	439,4 ± 27,66

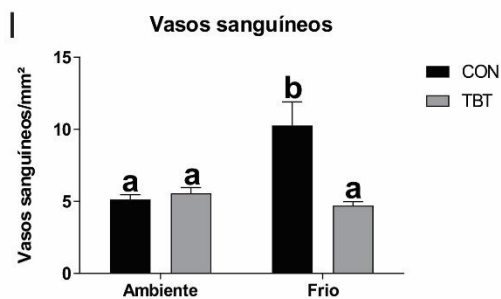
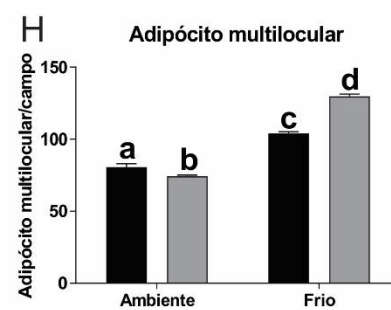
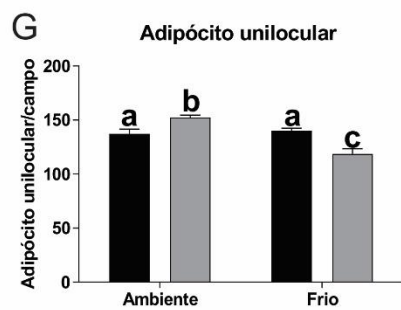
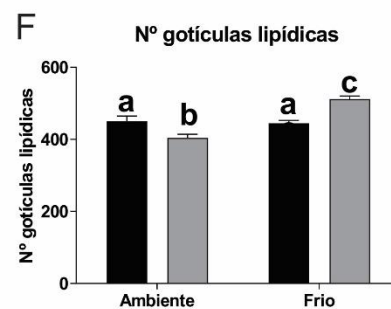
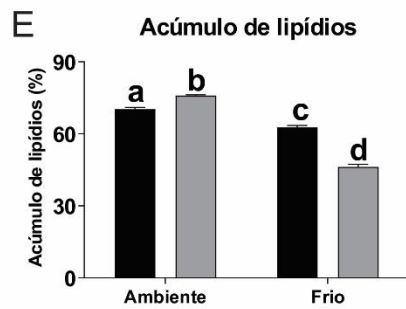
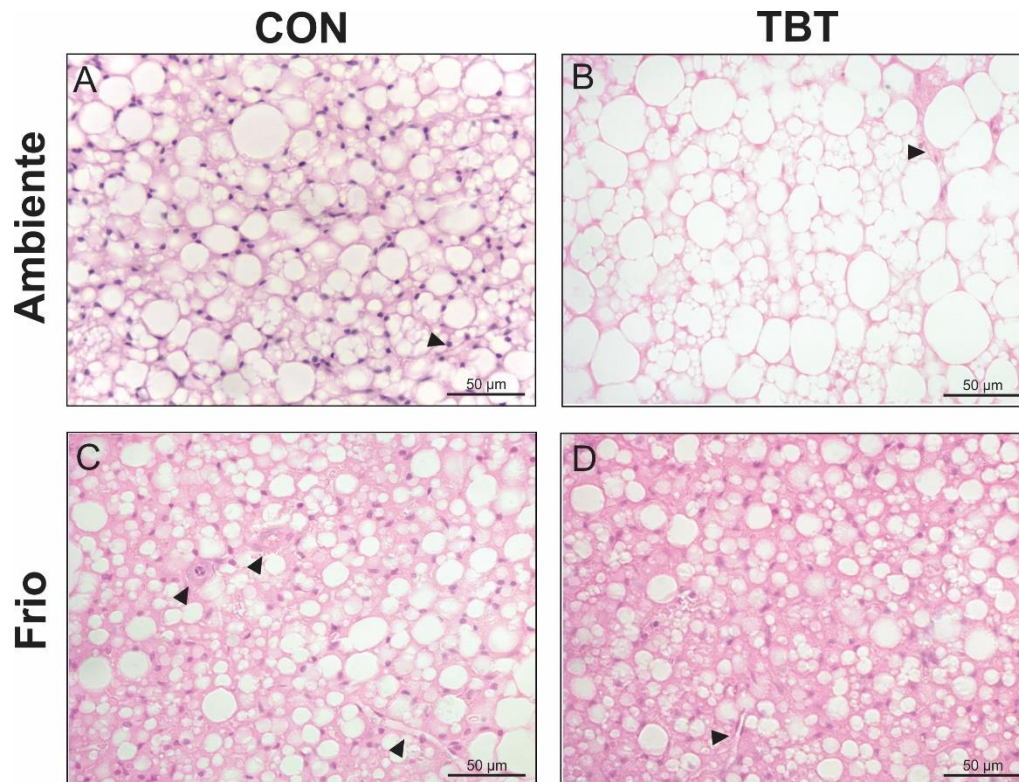
TAB: Tecido adiposo branco; TTF: Teste tolerância ao frio. Os valores são expressos como média ± EPM (n = 5). Teste t Student.

### **A exposição ao TBT induz alterações morfológicas no BAT**

As secções coradas com H&E de TAM de ratos CON continham morfologia regular, com adipócito multilocular e pequenas gotículas de lípido na condição ambiente (Fig. 11A). No entanto, o TAM de ratos TBT apresentou um pequeno aumento no número de adipócitos uniloculares (Fig. 11B) que contribuiu para um aumento no acúmulo de lipídios em relação aos ratos CON na condição ambiente (8%,  $p < 0,05$ , Fig. 11E). Ambos os ratos CON e TBT mostraram uma redução no acúmulo de lipídios no TAM em condição de frio em comparação com os respectivos ratos CON e TBT na condição ambiente (11% e 39%, respectivamente,  $p < 0,05$ , Fig. 11E). Ratos TBT apresentaram um número reduzido de espaços que representam a presença de gotículas lipídicas em comparação com ratos CON na condição ambiente (10%,  $p < 0,05$ , Fig. 11F). No entanto, os ratos TBT apresentaram um número maior desse espaço em comparação aos ratos CON em condição de frio (15%,  $p < 0,05$ , Fig. 11F). Ratos TBT apresentaram aumento no número de adipócitos uniloculares e redução de adipócitos multiloculares, comparados aos ratos CON na condição ambiente (11% e 8%, respectivamente,

$p < 0,05$ , Fig. 11G e H). No entanto, os ratos TBT apresentaram um número reduzido de adipócitos uniloculares e um aumento dos adipócitos multiloculares em relação aos ratos CON em condição de frio (15% e 28%, respectivamente,  $p < 0,05$ , Fig. 11G e H).





**Figura 14. Morfologia do TAM em ratos machos.** TAM CON (A) e TBT (B) corados por H&E em condição ambiente e CON (C) e TBT (D) em condição de frio após TTF. (E) Acúmulo de lipídios em TAM. (F) Número de gotículas lipídicas em TAM. (G) Número de adipócitos uniloculares em TAM. (H) Número de adipócitos multiloculares em TAM. (I) Número de vasos sanguíneos em TAM. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes umas das outras. ANOVA de duas vias (teste de comparação múltipla de Tukey). Ponta de seta: vasos sanguíneos. TAM: Tecido adiposo marrom.

### **Números de vasos sanguíneos no TAM após exposição ao TBT**

Ratos TBT não apresentaram alterações significativas no número de vasos sanguíneos TAM em comparação com ratos CON na condição ambiente ( $p > 0,05$ , Fig. 11I). Após a exposição ao frio, o número de vasos sanguíneos no TAM foi aumentado em ratos CON, enquanto o número de vasos sanguíneos no TAM em ratos TBT permaneceu o mesmo que na condição ambiente ( $p < 0,05$ , Fig. 11I).

### **Efeitos da exposição ao TBT no perfil lipídico, enzimas hepáticas e concentrações hormonais em condições de frio**

Os concentrações séricos de TG, CT, HDL e LDL não mostraram alterações significativas entre os ratos TBT e CON em condição de frio ( $p > 0,05$ , Tabela 4). Os concentrações séricos de GPT e GOT não mostraram alterações significativas entre ratos TBT e CON ( $p > 0,05$ , Tabela 4). Da mesma forma, não foram observadas alterações significativas nos concentrações séricos de insulina, adiponectina, leptina, T4 e T3 entre ratos TBT e CON na condição de frio ( $p > 0,05$ , Tabela 4).

**Tabela 4. Efeitos da exposição ao TBT sobre parâmetros séricos após TTF.**

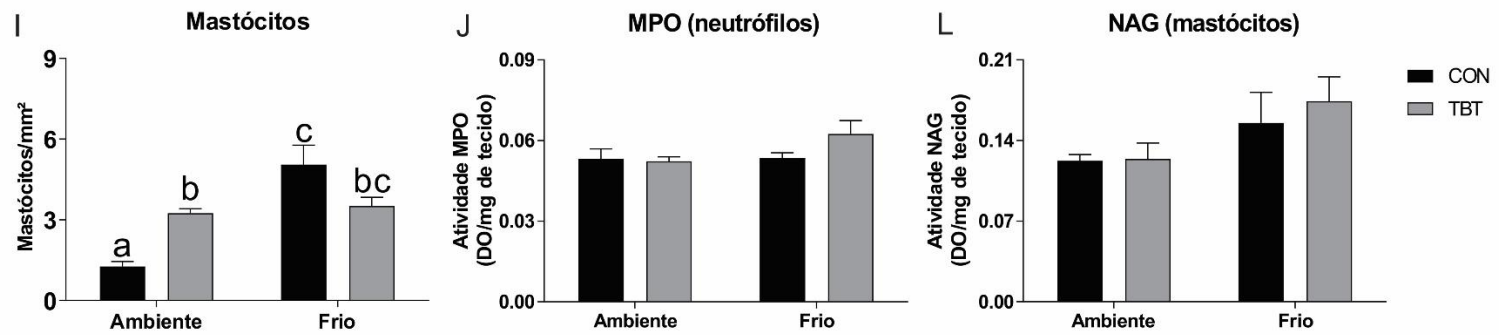
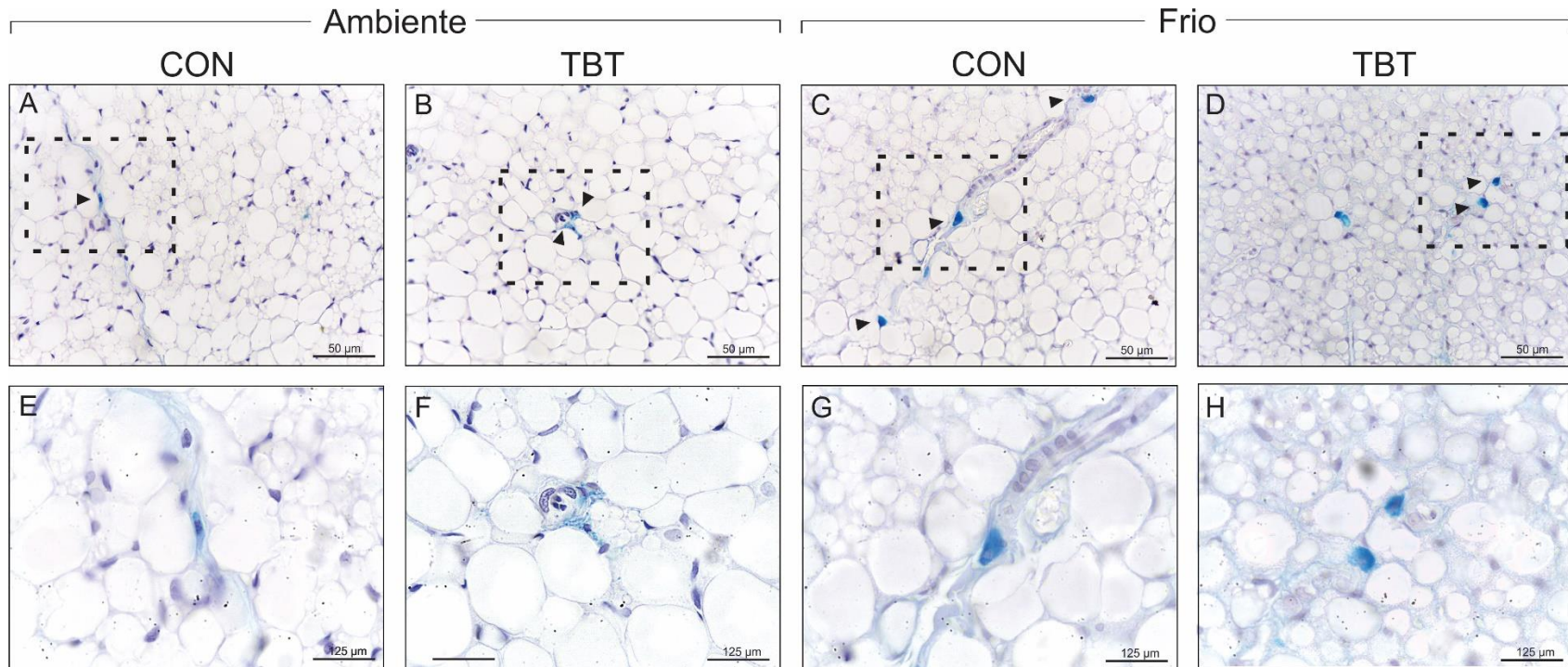
	CON	TBT
<i>Perfil Lipídico</i>		
<b>TG</b>	91,4 ± 8,81	75,2 ± 4,45
<b>CT</b>	78,9 ± 6,06	74,1 ± 3,86
<b>HDL</b>	32,9 ± 6,84	20,3 ± 8,45
<i>Enzimas Lipídicas</i>		
<b>TGP</b>	102,6 ± 1,80	101,0 ± 3,16
<b>TGO</b>	161,7 ± 13,9	162,6 ± 9,10
<i>Hormônios</i>		
<b>Insulina</b>	2,58 ± 0,53	2,54 ± 0,32
<b>Adiponectina</b>	1,00 ± 0,01	1,01 ± 0,01
<b>Leptina</b>	1515 ± 308	2027 ± 761

CT: Colesterol Total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; TBT: Tributilestanho; TG: Triglicerídeos; TGO: transaminase oxalacética; TGP: transaminase pirúvica. Média ± EPM. N = 4 (Teste t de Student).

### **A exposição ao TBT induz aumento da presença de mastócitos no TAM**

Um aumento no número de mastócitos no TAM foi observado nos ratos TBT em comparação com os ratos CON na condição ambiente (157%,  $p < 0,07$ , Fig. 12A, B, E, F, I). Não foram observadas alterações significativas no número de mastócitos no TAM entre ratos CON e TBT em condição de frio ( $p > 0,05$ , Fig. 12C, D, G, H e I). Além disso, os ratos CON mostraram um aumento no número de mastócitos no TAM em condição de frio em comparação com ratos CON na condição ambiente (300%,  $p < 0,05$ , Fig. 12I).

As atividades de MPO e NAG no TAM, que indicam a presença de neutrófilos e macrófagos, foram semelhantes entre ratos CON e TBT na condição ambiente e condição de frio ( $p > 0,05$ , Fig. 12J e L).



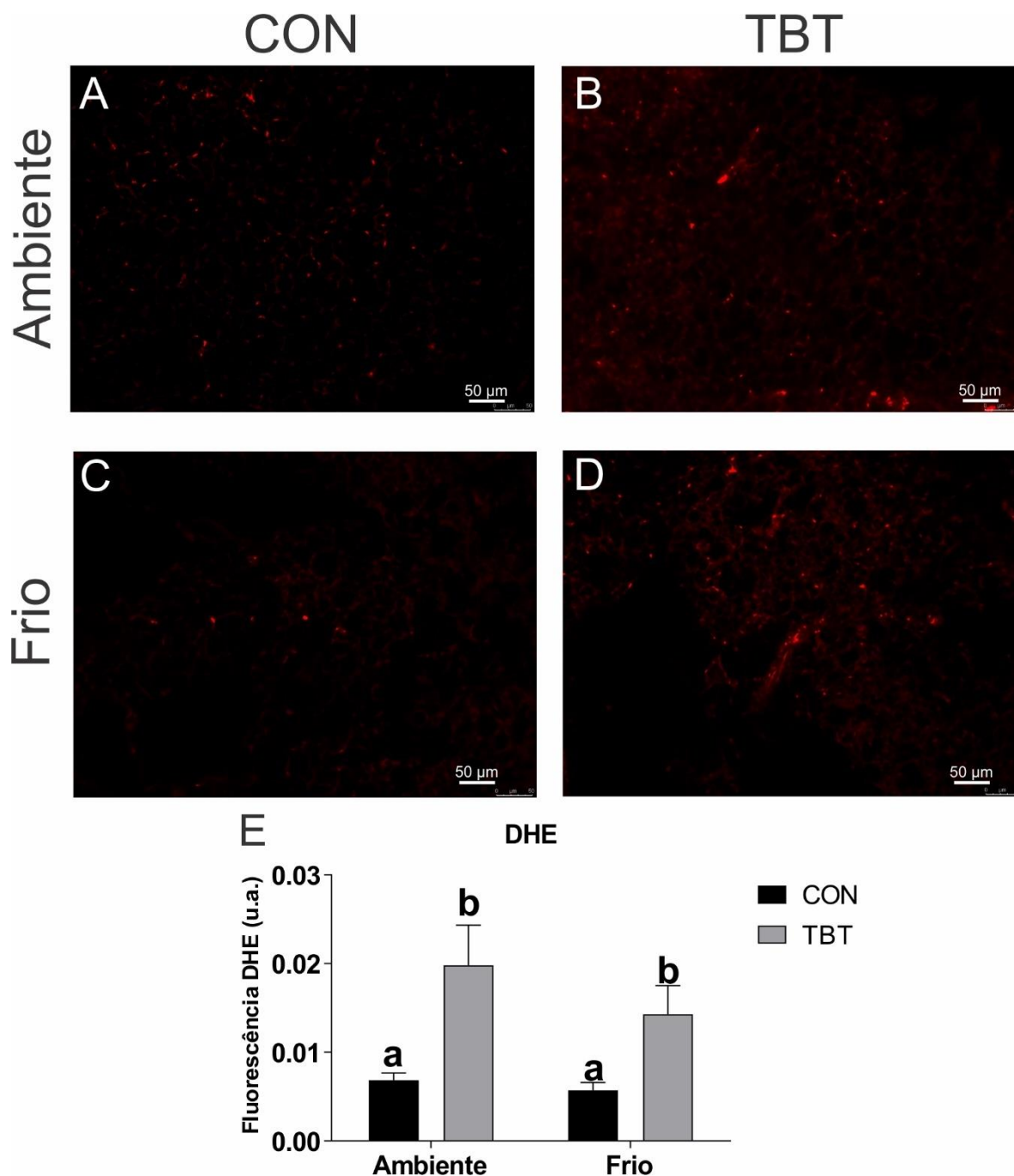
**Figura 15. Avaliação de células inflamatórias no TAM em ratos machos.** Cortes representativos de TAM corado com Alcian Blue de CON (A, E) e TBT (B, F) em condição ambiente, e CON (C, G) e TBT (D, H) em condição de frio. (I) número de mastócitos no TAM. (J) Atividade de MPO no TAM. (L) Atividade de NAG no TAM. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes umas das outras; a, b, c e d:  $p < 0,05$ . ANOVA de duas vias (teste de comparação múltipla de Tukey). Ponta de seta: mastócitos; TAM: tecido adiposo marrom; MPO: mieloperoxidase; NAG: n-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase.

### **A exposição ao TBT induz a produção de espécie reativa de oxigênio no TAM**

A produção de EROs no TAM foi avaliada usando o corante fluorescente DHE para avaliar os níveis de ânion superóxido. Um aumento nos níveis de ânion superóxido no TAM foi observado nos ratos TBT em comparação com os ratos CON na condição ambiente (17%,  $p < 0,05$ , Fig. 13A, B e E). Da mesma forma, um alto nível de ânion superóxido no TAM foi observado em ratos TBT em comparação com ratos CON em condição de frio (6%,  $p < 0,05$ , Fig. 13C, D e E). Não foram observadas diferenças significativas entre ratos do mesmo grupo de tratamento em ambas as condições de temperatura ( $p > 0,05$ , Fig. 13E).

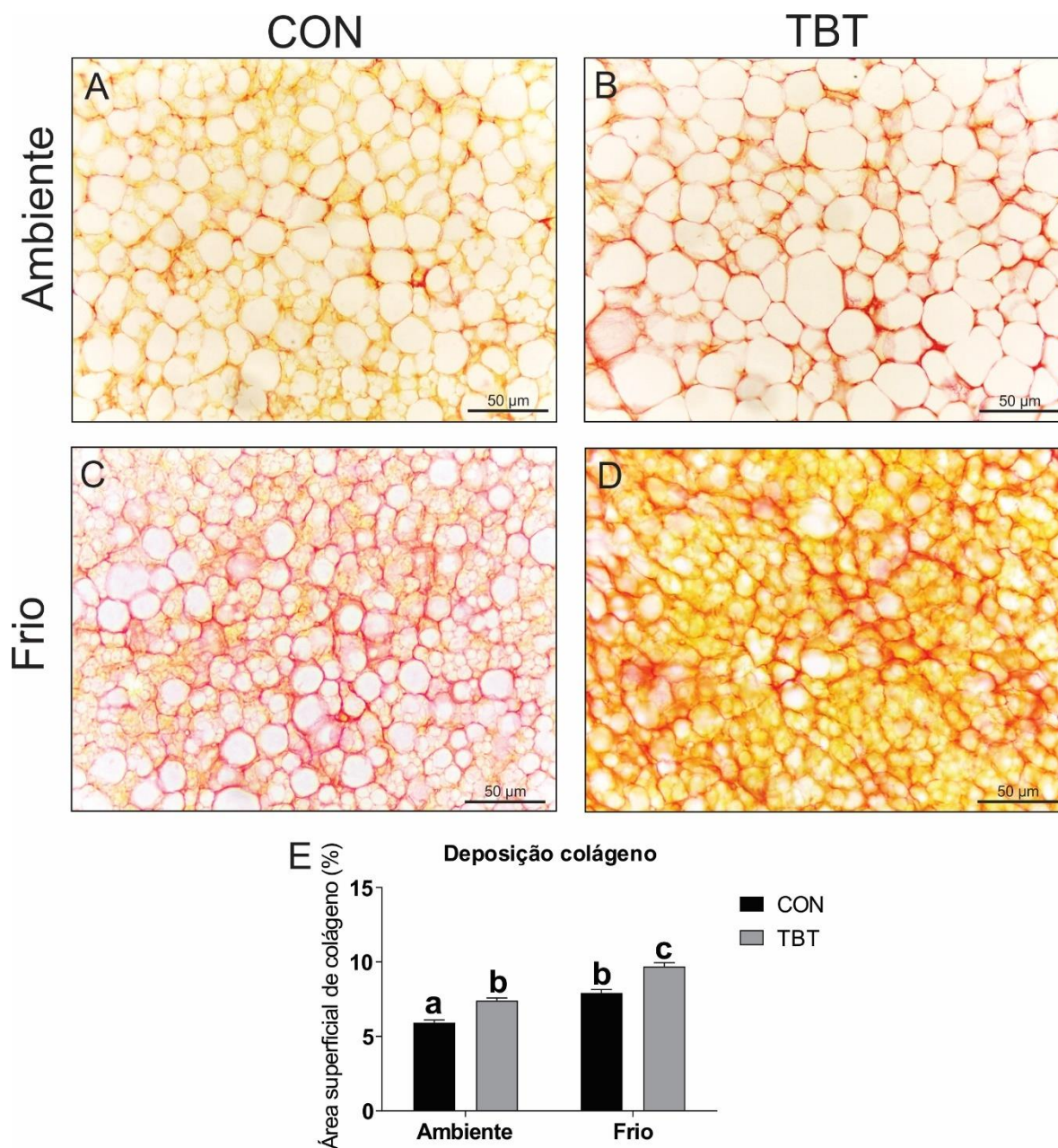
### **A exposição ao TBT induz a deposição de colágeno no TAM**

Um aumento na deposição de colágeno no TAM foi observado nos ratos TBT em comparação com os ratos CON na condição ambiente (25%,  $p < 0,05$ , Fig. 14A, B e E). Da mesma forma, alto acúmulo de colágeno no TAM foi observado em ratos TBT em comparação com ratos CON em condição de frio (22%,  $p < 0,05$ , Fig. 14C, D e E). Ambos os ratos CON e TBT mostraram aumento da deposição de colágeno no TAM em condição de frio em comparação com os respectivos ratos CON e TBT na condição ambiente ( $p < 0,05$ , Fig. 14A, C, B, D e E).



**Figura 16. Avaliação da produção de EROs no TAM em ratos machos.** Cortes representativos de TAM marcados DHE de ratos CON (A) e TBT (B) da condição ambiente e ratos CON (C) e TBT (D) da condição de frio. (E) Fluorescência DHE no BAT. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes umas das

outras; a e b:  $p < 0,05$ . ANOVA de duas vias (teste de comparação múltipla de Tukey).



**Figura 17. Avaliação da deposição de colágeno no TAM em ratos machos.** Coloração representativa de Picrosirius em TAM de ratos CON (A) e TBT (B) da condição ambiente e ratos CON (C) e TBT (D) da condição de frio. (E) Deposição

de colágeno no TAM. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes umas das outras; a, b e c:  $p < 0,05$ . ANOVA de duas vias (teste de comparação múltipla de Tukey).

### **Correlações entre temperatura corporal, concentrações de T4, parâmetros BAT (acúmulo de lipídios, adipócito unilocular e multilocular, número de mastócitos, produção de EROs)**

Para avaliar a relação entre a temperatura corporal (temperatura retal), parâmetros do TAM (ou seja, acúmulo de lipídios, números de adipócitos uniloculares e multiloculares, números de mastócitos e níveis de ânion superóxido) e concentrações séricas de T4 livre, foram realizadas análises de correlação aos pares e um ajuste linear foi plotado.

Vários marcadores do TAM foram correlacionados na condição ambiente e condição de frio. Observamos uma tendência de correlação linear negativa entre a temperatura corporal e o acúmulo de lipídios no TAM na condição ambiente (Fig. 15A,  $p = 0,0688$ ). No entanto, nenhuma correlação linear significativa foi observada entre a temperatura corporal e o acúmulo de lipídios no TAM em condição de frio (Fig. 15B,  $p = 0,3224$ ).

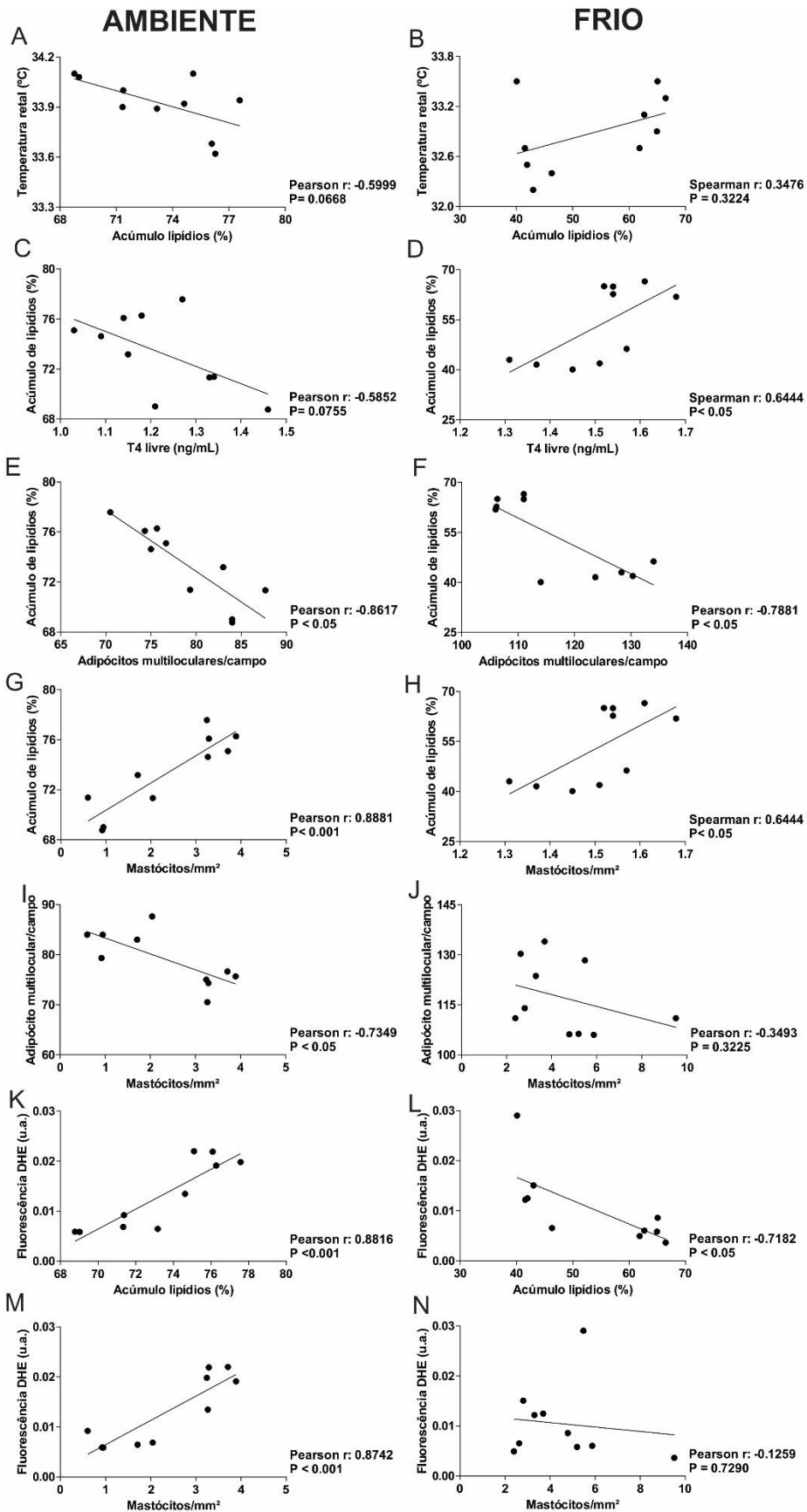
Uma tendência para uma correlação linear negativa foi observada entre o acúmulo de lipídios no TAM e os concentrações de T4 na condição ambiente (Fig. 15C,  $p = 0,0755$ ). Curiosamente, foi observada uma correlação linear positiva entre os concentrações de T4 e o acúmulo de lipídios no TAM em condição de frio (Fig 15D,  $p < 0,05$ ). O acúmulo de lipídios no TAM foi negativamente correlacionado com o número de adipócitos multiloculares no TAM em ambas condições de temperatura (Fig10E,  $p < 0,05$  e Fig 15F,  $p < 0,05$ ).

O acúmulo de lipídios no TAM foi positivamente correlacionado com o número de mastócitos no TAM em ambas condições de temperatura (Fig 15G,  $p < 0,001$  e Fig 15H,  $p < 0,05$ ). O número de adipócitos multiloculares no TAM foi negativamente correlacionado com o número de mastócitos em na condição ambiente (Fig 15I  $p <$



0,05). No entanto, não foi observada correlação significativa entre o número de adipócitos multiloculares no TAM e o número de mastócitos em condição de frio (Fig 15J,  $p = 0,3225$ ).

Os níveis de ânion superóxido no TAM foram positivamente correlacionados com o acúmulo de lipídios no TAM na condição ambiente (Fig 15K  $p < 0,001$ ). No entanto, os níveis de ânion superóxido no TAM foram negativamente correlacionados com o acúmulo de lipídios no TAM em condição de frio (Fig 15L,  $p < 0,05$ ). Uma correlação linear positiva foi observada entre os níveis de ânion superóxido no TAM e o número de mastócitos no TAM na condição ambiente (Fig 15M,  $p < 0,001$ ). Não foi observada correlação significativa entre níveis de ânion superóxido no TAM e número de mastócitos em condição de frio (Fig 15N,  $p = 0,7290$ ).



**Figura 18. Correlação entre temperatura retal, níveis séricos de T4 livre e parâmetros do TAM (acúmulo de lipídios, número de adipócitos multiloculares, número de mastócitos e produção de EROs).** Os valores da temperatura retal da condição ambiente (A) e da condição de frio (B), foram plotados com o acúmulo de lipídios no TAM. Os valores de acúmulo de lipídios no TAM na condição ambiente (C) e fria (D) foram plotados com os níveis séricos de T4 livre. Os valores de acúmulo de lipídios no TAM das condições ambiente (E) e fria (F) foram plotados com o número de adipócitos multiloculares no TAM. Os valores de acumulação de lipídios no TAM das condições ambiente (G) e fria (H) foram plotados com o número de mastócitos no TAM. Os valores do número de adipócitos multiloculares no TAM das condições ambiente (I) e fria (J) foram plotados com o número de mastócitos no TAM. Os valores de fluorescência de DHE (níveis de ânion superóxido) no TAM das condições ambiente (K, M) e fria (L, N) foram plotados com o acúmulo de lipídios no TAM e o número de mastócitos TAM, respectivamente. 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, fosse detectada.

## 9. DISCUSSÃO

Nosso estudo fornece evidências de que a exposição subaguda a baixa dose de TBT por 15 dias é responsável por alterações na morfofisiologia do TAM, incluindo aumento do acúmulo de lipídios, remodelação na morfologia dos adipócitos, inflamação, alteração da organização da matriz extracelular e estresse oxidativo. Essas anormalidades contribuíram para o prejuízo na função do TAM de realizar a termogênese em ratos machos. Especificamente, a exposição ao TBT resultou em baixa temperatura corporal em condições de temperatura ambiente e durante teste de tolerância ao frio. Aumento do acúmulo de lipídios no TAM, diminuição do número de gotículas lipídicas, aumento do número de adipócitos uniloculares e diminuição do número de adipócitos multiloculares foram observados em ratos TBT à temperatura ambiente em comparação com os controles. No entanto, os ratos TBT apresentaram respostas opostas em todos esses parâmetros em condição de frio em comparação com os controles.

Além disso, foi observado uma tendência de correlação negativa entre o acúmulo de lipídios no TAM e a temperatura corporal em condição ambiente, assim como foi observado correlação negativa entre o acúmulo de lipídios e o número de adipócitos multiloculares tanto em condição ambiente quanto em condição de frio, podendo ser resultado do efeito obesogênico do TBT na gordura marrom. Um aumento no número de vasos sanguíneos no TAM foi observado apenas em ratos controle após teste de tolerância ao frio, sugerindo supressão desta resposta em animais TBT. A presença de mastócitos aumentou no TAM de ratos TBT em condição ambiente. Além disso, uma importante correlação positiva foi observada entre o acúmulo de lipídios e o número de mastócitos em ambas as condições de temperatura, sugerindo associação entre o acúmulo de lipídios do TAM e a inflamação induzida pela exposição ao TBT. Aumento da produção ânion superóxido foi observado em ambas as condições de temperatura em ratos TBT comparado aos controles. Além disso, uma importante correlação positiva foi observada entre produção de ânion superóxido e acúmulo de lipídios e número de mastócitos na condição ambiente. Uma redução na concentração sérica de T4 foi observada em ratos TBT na condição ambiente. Correlações negativas e positivas

foram observadas entre as concentrações séricas de T4 e o acúmulo de lipídios na condição ambiente e frio, respectivamente. Aumento no acúmulo de colágeno no TAM foi observado na condição ambiente e exacerbado em condição de frio em ratos TBT em comparação com controles. Coletivamente, esses dados sugerem que a baixa dose de exposição ao TBT contribui para prejuízo da termogênese associada ao acúmulo de lipídios, redução do número de adipócitos multiloculares, inflamação, estresse oxidativo e alteração da matriz extracelular no TAM em ratos machos.

O TBT é um obesogênico que está associado a alterações metabólicas em animais adultos e que podem ser herdadas transgeracionalmente em ambos os sexos (BERTULOSO et al., 2015; CEOTTO FREITAS-LIMA et al., 2018; CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013). Em estudos anteriores realizados por nosso grupo foi demonstrando que a exposição a 100 ng/kg/dia de TBT por 15 dias em ratas é responsável pelo desenvolvimento de diversas alterações em diferentes órgãos e sistemas em roedores fêmeas (DA COSTA et al., 2019; MERLO et al., 2016; PODRATZ et al., 2012; RODRIGUES-PEREIRA et al., 2020). Nessa dose, as ratas apresentaram alterações na foliculogênese ovariana e no ciclo estral, além da redução da fertilidade (PODRATZ et al., 2012; SENA et al., 2017). Também foram relatadas alterações na glândula mamária e na tireoide (DA COSTA et al., 2019; RODRIGUES-PEREIRA et al., 2020, 2022). Assim, foi observado desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (MERLO et al., 2016). Associado a esses achados as ratas apresentaram resistência insulínica associada a alteração no pâncreas e fígado, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia, dislipidemia, aumento do peso e inflamação dos depósitos de tecido adiposo branco (BERTULOSO et al., 2015; CEOTTO FREITAS-LIMA et al., 2018). Todos esses resultados associados resultaram em um quadro semelhante à síndrome do ovário policístico nesses animais (MERLO et al., 2018). Contudo, neste estudo não foram observadas alterações no peso corporal, adiposidade, função hepática, função pancreática, sensibilidade à insulina, além de outros marcadores metabólicos em ratos expostos a 100 ng/kg/dia de TBT por 15 dias. Dessa maneira é observado um aparente

dimorfismo sexual na função metabólica frente à exposição subaguda de baixa dose de TBT em ratos Wistar.

Apesar de haver essa diferença na resposta ao TBT entre machos e fêmeas, nós observamos aumento nas concentrações séricas de LDL e do número de folículos tireoidianos e redução das concentrações séricas de T4 após exposição ao TBT. Resultados semelhantes foram relatados por Rodrigues-Pereira et al. 2020, 2022. Si et al. (2011) mostraram que 5 µg/kg de TBT por 45 dias causou ganho de peso corporal e aumento no depósito de gordura testicular em camundongos machos. Penza et al. (2011) mostraram que uma exposição de 60 dias ao TBT (0,5 µg/kg) causou um aumento na massa gorda em ambos os sexos dos camundongos, sugerindo que o TBT pode afetar a deposição de gordura de maneira dependente do sexo e do tempo em camundongos pré-púberes e sexualmente maduros. Portanto, a partir dos resultados encontrados por nosso grupo e outros, é possível sugerir que os machos apresentam uma resistência maior a alterações induzidas pela exposição ao TBT do que o encontrado em animais fêmeas, visto que alterações são observadas associadas com tempo e dose de exposição maiores.

Em pequenos roedores, como ratos e camundongos, o TAM é o principal órgão responsável pela termogênese. Essa função é essencial para manutenção da temperatura corporal e auxílio no gasto energético. Diante de tantas evidências da ação de compostos obesogênicos sobre o controle do gasto energético, o estudo dos efeitos da exposição a esses compostos sobre a função do TAM é pouco investigado. Chamorro-Garcia et al. (2013) observaram efeitos modestos sobre o tamanho do depósito, o tamanho dos adipócitos e o número de células em TAM em modelo de exposição transgeracional ao TBT. Em particular, observaram aumento da área das vesículas lipídicas, embora não em todos os grupos de exposição ao TBT, presença de grandes vesículas lipídicas e redução no número de adipócitos marrons em machos F1, F2 e F3, embora os efeitos tenham sido significativos apenas em F2. Em um estudo de exposição ao DDT em camundongos fêmeas, La Merrill et al. (2014) mostraram que 1,7 mg/kg do dia gestacional 11,5 até o dia pós-natal reduziu a temperatura corporal, que se tornou mais pronunciada com a idade,

e prejudicou a tolerância ao frio da prole feminina aos 6 meses de idade. Da mesma forma, vonderEmbse et al. (2021) mostraram uma redução na temperatura corporal em camundongos fêmeas aos 4 meses de idade após exposição perinatal a 1,7mg DDT/kg e 1,3 mg p, p'-DDE/kg sem anormalidades na morfologia TAM. Nossos resultados são consistentes com esses achados anteriores, pois observamos termogênese anormal, acúmulo aumentado de lipídios TAM e do número de adipócitos lipídicos uniloculares e redução no número de adipócitos multiloculares em ratos TBT. No entanto, os ratos TBT apresentaram respostas opostas em todos esses parâmetros em condições de frio, sugerindo uma intensa remodelação das gotículas lipídicas nos adipócitos TAM anormais. Além disso, correlações negativas foram observadas entre o acúmulo de lipídios no TAM e a temperatura corporal, assim como nos números de adipócitos multiloculares. Assim, nossos dados sugerem que a exposição ao TBT levou a anormalidades do TAM que contribuíram para a termogênese anormal.

Os hormônios tireoidianos (HT) são de grande importância para o controle do gasto energético (BIANCO; SILVA, 1987; OBREGON, 2014). Eles atuam estimulando a ativação do TAM e promovendo produção de calor por meio da conversão do T4 em T3 pela enzima deiodase 2 (DIO 2), o qual estimula a ativação de UCP1 e lipólise (DE JESUS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2022). Estudos mostraram que a redução da ação dos HT leva a acúmulo de lipídio no TAM e prejuízo na termogênese (SHU et al., 2017). A concentração de T4 livre reduziu nos animais expostos ao TBT na condição ambiente, porém não foi observado diferença entre os grupos após a exposição ao frio. A concentração de T4 livre apresentou uma tendência de correlação negativa com o acúmulo de lipídio no TAM, o que pode ajudar a explicar essa alteração nos animais TBT. Curiosamente, na condição de frio, a concentração de T4 livre apresentou uma correlação positiva com o acúmulo de lipídio no TAM. Esse resultado sugere que outros mecanismos de estimulação do TAM podem estar responsivos ao frio e, portanto, promovem o consumo de lipídios no TAM nos animais TBT.

A termogênese no TAM desempenha um papel crítico para a manutenção da temperatura corporal em circunstâncias regulares e frias em pequenos roedores (ENERBÄCK et al., 1997). Em condições de frio, os adipócitos marrons são ativados pelo sistema nervoso simpático, induzindo a lipólise (CANNON; NEDERGAARD, 2004; VAN DEN BERG et al., 2017). Os ácidos graxos ativam a UCP1 e são usados como substrato para a termogênese (KAJIMURA; SAITO, 2014). Tanto em humanos quanto em roedores, a exposição ao frio induz a proliferação de adipócitos marrons e células endoteliais vasculares, refletindo a angiogênese ativa que contribui para o aprimoramento da função TAM e da capacidade termogênica de todo o corpo (KLINGENSPOR, 2003; LEE et al., 2015; XUE et al., 2009). Nossos resultados são consistentes com esses achados anteriores no qual observamos um aumento no número de adipócitos multiloculares em ratos TBT em condições de frio, refletindo uma tentativa de manter a capacidade de temperatura corporal. No entanto, não encontramos aumento no número de vasos sanguíneos no TAM de ratos TBT em condições de frio, apenas em ratos CON, sugerindo um possível comprometimento do fluxo sanguíneo no TAM de ratos TBT. Uma importante correlação negativa foi observada entre o acúmulo de lipídios TAM e o número de adipócitos multiloculares tanto em temperatura ambiente quanto em condições de frio. Observa-se que mesmo com uma aparente ativação do TAM após o estímulo por frio a temperatura corporal continua reduzida em animais TBT, o que sugere prejuízo na produção do calor, mesmo com redução do acúmulo de lipídios, e/ou distribuição irregular do calor formado.

A alta vascularização do TAM é um aspecto de grande importância para sua função de manutenção da temperatura corporal (VAN DEN BERG et al., 2017; XUE et al., 2009). Os vasos sanguíneos são responsáveis por trazer oxigênio, assim como ácidos graxos e glicose que servem de combustíveis para a produção de calor, além de serem responsáveis pela distribuição do calor produzido para o restante do corpo (CANNON; NEDERGAARD, 2008; VAN DEN BERG et al., 2017). A baixa vascularização do TAM está associada a uma condição chamada de branqueamento, nessa condição o TAM adquire aspectos do TAB, como presença de adipócitos uniloculares, alto teor lipídico e baixa capacidade termogênica



(SHIMIZU; WALSH, 2015). Nossos resultados sugerem um possível processo de branqueamento do TAM devido ao aumento do acúmulo lipídico e de adipócitos uniloculares, redução da vascularização na condição de frio e prejuízo na termogênese observado pela redução da temperatura corporal.

A inflamação é uma característica comum no tecido adiposo anormal como resultado da exposição ao TBT ou modelos de obesidade (CEOTTO FREITAS-LIMA et al., 2018; MIRZAEI et al., 2013; RAVANAN et al., 2011). Anteriormente, relatamos que os mastócitos são células inflamatórias cruciais presentes no TAB após a exposição ao TBT e associadas a complicações metabólicas em ratas (BERTULOSO et al., 2015; CEOTTO FREITAS-LIMA et al., 2018; DA COSTA et al., 2019). Da mesma forma, Liu et al. (2009) relataram que a deficiência genética de mastócitos pode levar ao aumento do gasto energético e promover a expressão da proteína UCP-1 em TAM de camundongos obesos machos induzidos por dieta ocidental por 12 semanas. Observamos um aumento no número de mastócitos em TAM de ratos TBT. Além disso, uma correlação positiva foi observada entre o acúmulo de lipídios TAM e o número de mastócitos à temperatura ambiente, sugerindo um papel importante dos mastócitos na função anormal do TAM. No entanto, é importante notar que os mastócitos são sensores de frio, tornando-se degranulados quando expostos ao frio. Isso resulta na liberação de histamina que aumenta o fluxo sanguíneo no TAM, a qual é uma resposta fisiológica importante para manter a termogênese adequada (DESAUTELS et al., 1994; FINLIN et al., 2019; ROTHWELL; STOCK; WYLLIE, 1984; SHEN et al., 2008). Observamos um aumento no número de mastócitos que foi relacionado com o número elevado de vasos sanguíneos no TAM de ratos controle em condições de frio, sugerindo um possível aumento no fluxo sanguíneo no TAM de ratos controle. Além disso, correlação positiva foi observada entre o acúmulo de lipídios no TAM e o número de mastócitos em condições de frio.

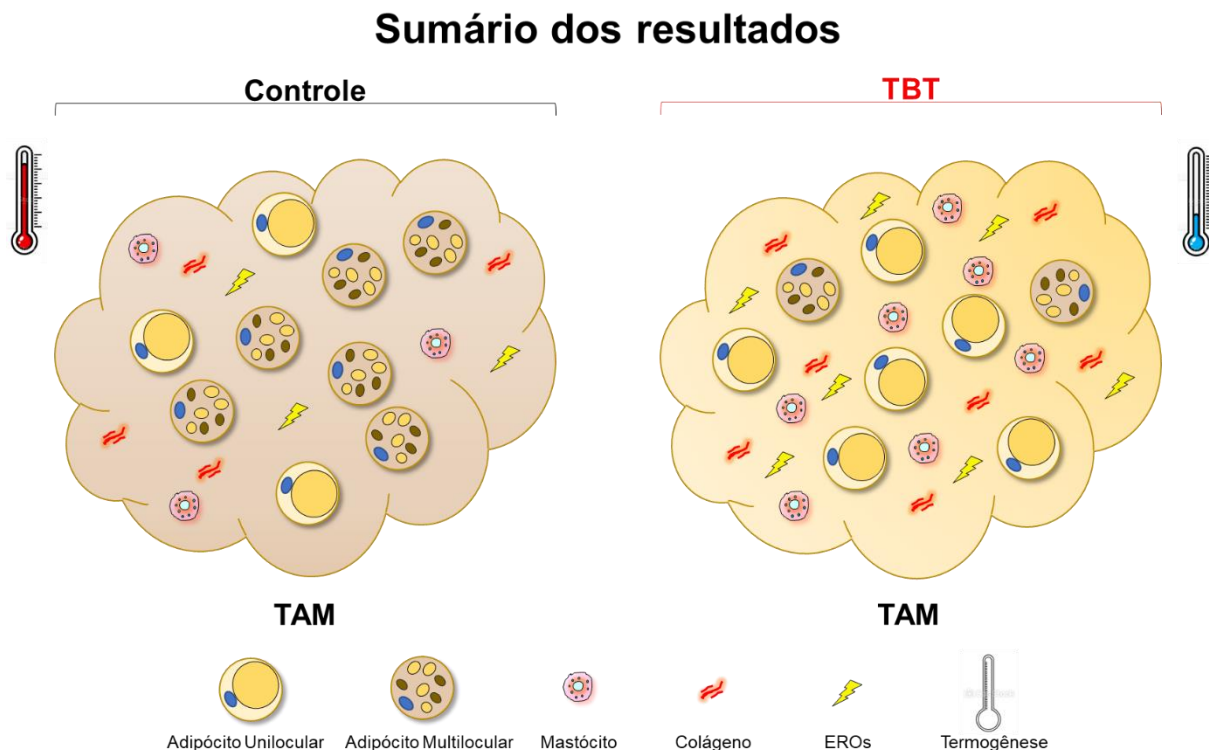
A geração de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo é um processo comum em tecidos com inflamação, assim como em tecidos com excesso de lipídios (HAUCK; BERNLOHR, 2016; PIZZINO et al., 2017). Além disso,

particularmente no TAM, foi observado dano induzido por espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias, após exposição ao frio, enquanto o estímulo por HT demonstrou ativação do TAM sem aumento espécies reativas de oxigênio (BARJA DE QUIROGA et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2022; PETROVIĆ et al., 2010; SANCHEZ-ALAVEZ et al., 2013). Os animais expostos ao TBT apresentaram aumento de ânion superóxido no TAM em ambas as condições de temperatura. Portanto, o estresse oxidativo observado no TAM dos animais TBT pode estar relacionado ao conjunto de fatores como redução do T4 livre, inflamação, acúmulo de lipídios e prejuízo na função termogênica do TAM.

Outras anormalidades do tecido adiposo foram observadas em modelos de TBT, incluindo estresse oxidativo do tecido adiposo e fibrose (CEOTTO FREITAS-LIMA et al., 2018; DA COSTA et al., 2019). Nossos resultados atuais são consistentes com esses achados anteriores, pois observamos um aumento na produção de EROs no TAM e colágeno em ambas as condições de temperatura. Importantes correlações positivas foram observadas entre os níveis de ânion superóxido no TAM e acúmulo de lipídios e número de mastócitos em temperatura ambiente. Além disso, tanto os níveis de ânion superóxido quanto a inflamação foram correlacionados negativamente com o número de adipócitos multiloculares. Esses dados sugerem que a exposição ao TBT pode levar a irregularidades do TAM, que pode ser substituído por tecido fibroso, levando à fibrose.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a exposição subaguda a baixa dose de TBT apresenta resultados diferentes em machos dos que já foram observados em estudos prévios com fêmeas, sugerindo assim que há um dimorfismo sexual da resposta da função metabólica à exposição a esse obesogênico. Além disso, o TBT induziu prejuízo da termogênese no TAM associada a alterações da sua morfologia, tais como acúmulo de lipídios, redução no número de adipócitos multiloculares, remodelação intensa de gotículas lipídicas, inflamação, estresse oxidativo e alteração da matriz extracelular em ratos machos. Esses achados sugerem que o TBT é capaz de promover processo de branqueamento do TAM independente de alterações do peso corporal e do tecido

adiposo branco (Fig. 16). Portanto, a monitoração e prevenção da exposição de indivíduos a esse composto é de grande importância para a saúde pública de forma a prevenir problemas metabólicos e/ou relacionados à obesidade na população.



**Figura 19. Modelo dos principais efeitos da exposição do TBT sobre o TAM.** TBT leva a anormalidades morfofisiológicas no TAM, tais como: TBT leva à aumento da presença de mastócitos. A maior presença de células inflamatórias, bem como a ação do TBT causam estresse oxidativo. O dano causado pelo TBT e estresse oxidativo alteram a organização da matriz extracelular. A ação obesogênica do TBT induz um clareamento do TAM, com aumento do número de adipócitos uniloculares em detrimento da redução do número de adipócitos multiloculares. A combinação dos efeitos tóxicos e obesogênicos do TBT resultam no prejuízo da termogênese e

consequente redução da temperatura corporal. EROs: Espécie reativa de oxigênio;  
TAM: Tecido adiposo marrom; TBT: Tributilestanho.

## 10. REFERÊNCIAS

ABREU, F. E. L. et al. Legacy and emerging antifouling biocide residues in a tropical estuarine system (Espírito Santo state, SE, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 166, p. 112255, maio 2021.

AHERNE, W.; HULL, D. THE SITE OF HEAT PRODUCTION IN THE NEWBORN INFANT. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 57, p. 1172–3, dez. 1964.

ALZIEU, C. Tributyltin. **Ocean & Coastal Management**, v. 40, n. 1, p. 23–36, jul. 1998.

ANANDACOOMARASAMY, A. et al. The impact of obesity on the musculoskeletal system. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 2, p. 211–222, 11 fev. 2008.

ANSTEY, K. J. et al. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 5, p. e426–e437, maio 2011.

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

ARAÚJO, F. A. et al. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, jan. 2010.

ATTINA, T. M. et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: a population-based disease burden and cost analysis. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 12, p. 996–1003, dez. 2016.

AZENHA, M.; VASCONCELOS, M. T. Butyltin Compounds in Portuguese Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2713–2716, 1 abr. 2002.

BAGCHI, D. P.; MACDOUGALD, O. A. Identification and Dissection of Diverse Mouse Adipose Depots. **Journal of Visualized Experiments**, n. 149, 11 jul. 2019.

BAILLIE-HAMILTON, P. F. Chemical Toxins: A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 8, n. 2, p. 185–192, abr. 2002.

BARBOSA, K. L. et al. Tributyltin and the Female Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Disruption. **Toxicological Sciences**, 29 nov. 2021.

BARCELOS, L. S. et al. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 2, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, ago. 2005.

BARGUT, T. C. L. et al. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 31, n. 1, 26 jul. 2017.

BARJA DE QUIROGA, G. et al. Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brown adipose tissue. **Biochemical Journal**, v. 277, n. 1, p. 289–292, 1 jul. 1991.

BATISTA-ANDRADE, J. A. et al. From TBT to booster biocides: Levels and impacts of antifouling along coastal areas of Panama. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 243–252, mar. 2018.

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, 19 maio 2015.

BETZ, M. J. et al. Presence of Brown Adipocytes in Retroperitoneal Fat From Patients With Benign Adrenal Tumors: Relationship With Outdoor Temperature. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 10, p. 4097–4104, out. 2013.

BHUPATHIRAJU, S. N.; HU, F. B. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1723–1735, 27 maio 2016.

BIANCO, A. C.; SILVA, J. E. Nuclear 3,5,3'-Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) in Brown Adipose Tissue: Receptor Occupancy and Sources of T<sub>3</sub> as Determined by *in Vivo* Techniques\*. **Endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 55–62, jan. 1987.

BLABER, S. J. M. THE OCCURRENCE OF A PENIS-LIKE OUTGROWTH BEHIND THE RIGHT TENTACLE IN SPENT FEMALES OF NUCELLA LAPILLUS (L.). **Journal of Molluscan Studies**, v. 39, n. 2–3, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, dez. 1970.

BOUILLAUD, F.; COMBES-GEORGE, M.; RICQUIER, D. Mitochondria of adult human brown adipose tissue contain a 32 000-Mr uncoupling protein. **Bioscience Reports**, v. 3, n. 8, p. 775–780, 1 ago. 1983.

BOYER, I. J. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. **Toxicology**, v. 55, n. 3, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, maio 1989.

BRONDANI, L. D. A. et al. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 56, n. 4, p. 215–25, jun. 2012.

BRYAN, G. W. et al. The Decline of the Gastropod Nucella Lapillus Around South-West England: Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 66, n. 3, p. 611–640, 11 ago. 1986.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 1 jan. 2004.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Studies of Thermogenesis and Mitochondrial Function in Adipose Tissues. In: [s.l: s.n.]. p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José.

CAO, D. et al. Organotin pollution in China: An overview of the current state and potential health risk. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. S16–S24, fev. 2009.

CARFI', M. et al. TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture. **Toxicology**, v. 249, n. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, jul. 2008.

CASTRO, Í. B. DE et al. Imposex in endemic volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, out. 2008.

CASTRO, Í. B. et al. TBT is still a matter of concern in Peru. **Chemosphere**, v. 205, p. 253–259, ago. 2018.

CEOTTO 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. **Toxicology Letters**, v. 299, 2018.

CEREIJO, R.; GIRALT, M.; VILLARROYA, F. Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. **Annals of Medicine**, v. 47, n. 2, p. 169–177, 17 fev. 2015.

CHAMORRO-GARCÍA, R. et al. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 3, p. 359–66, 15 mar. 2013.

CHAMP, M. A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 8, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, ago. 2003.



CHIEN, L.-C. et al. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. **Science of The Total Environment**, v. 285, n. 1–3, p. 177–185, fev. 2002.

CHONDRONIKOLA, M. et al. Brown Adipose Tissue Improves Whole-Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. **Diabetes**, v. 63, n. 12, p. 4089–4099, 1 dez. 2014.

CHONDRONIKOLA, M. et al. Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1200–1206, jun. 2016.

CHONDRONIKOLA, M.; SIDOSSIS, L. S. **Brown and beige fat: From molecules to physiology. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids** Elsevier B.V., , 1 jan. 2019.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 6–10, 1 mar. 2019.

CHRISTENSEN, C. R.; CLARK, P. B.; MORTON, K. A. Reversal of Hypermetabolic Brown Adipose Tissue in F-18 FDG PET Imaging. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 31, n. 4, p. 193–196, abr. 2006.

CINTI, S. Between brown and white: Novel aspects of adipocyte differentiation. **Annals of Medicine**, v. 43, n. 2, p. 104–115, 24 mar. 2011.

CINTI, S. Adipose Organ Development and Remodeling. In: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2018. p. 1357–1431.

COENEN, THEODORAM. M. et al. Subchronic toxicity and reproduction effects of tri-n-butyltin oxide in Japanese quail. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 23, n. 4, nov. 1992.

COHADE, C. et al. **Uptake in Supraclavicular Area Fat (“USA-Fat”): Description on 18 F-FDG PET/CTJ Nucl Med**. [s.l.: s.n.].

COHADE, C.; MOURTZIKOS, K. A.; WAHL, R. L. “**USA-Fat**”: **Prevalence Is Related to Ambient Outdoor Temperature-Evaluation with 18 F-FDG PET/CT**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.meto.umd.edu>>.

COOKE, G. M. et al. Organotin speciation and tissue distribution in rat dams, fetuses, and neonates following oral administration of tributyltin chloride. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 71, n. 6, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 2008.

COSTA, M. B. et al. *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda: Ranellidae): A New Bioindicator of Organotin Compounds Contamination? **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, n. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 2008.

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

COUTINHO, J. V. S. et al. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. **Toxicology Letters**, v. 260, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, out. 2016.

CRISTALE, J. et al. Tributyltin in crustacean tissues: analytical performance and validation of method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, jan. 2012.

CUNNINGHAM, D. J.; STOLWIJK, J. A.; WENGER, C. B. Comparative thermoregulatory responses of resting men and women. **Journal of Applied Physiology**, v. 45, n. 6, p. 908–915, 1 dez. 1978.

CYPESS, A. M. et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 9 abr. 2009.

CYPESS, A. M. et al. Activation of Human Brown Adipose Tissue by a  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Agonist. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 33–38, jan. 2015.

CZERNICHOW, S. et al. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk? Evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. **Obesity Reviews**, p. no-no, maio 2011.

DA COSTA, C. S. et al. The tributyltin leads to obesogenic mammary gland abnormalities in adult female rats. **Toxicology Letters**, v. 307, p. 59–71, jun. 2019.

DA COSTA, M. B. et al. A temporal and spatial monitoring of organotin pollution in a harborside region of Brazil by imposex and ecological quality ratio using *Leucozonia nassa*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 12, p. 650, 25 dez. 2017.

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

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

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 332–338, 20 maio 2012.

DE JESUS, L. A. et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 9, p. 1379–1385, 2001.

DE JONG, J. M. A. et al. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 308, n. 12, p. E1085–E1105, 2015.

DESAUTELS, M. et al. Role of mast cell histamine in brown adipose tissue thermogenic response to VMH stimulation. **American Journal of Physiology-**

**Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 3, p. R831–R837, 1 mar. 1994.

DI GREGORIO, I. et al. Environmental Pollutants Effect on Brown Adipose Tissue. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. January, p. 1–8, 2019.

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

DOS SANTOS, R. L. et al. Tributyltin Impairs the Coronary Vasodilation Induced by  $17\beta$ -Estradiol in Isolated Rat Heart. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 948–959, 15 ago. 2012.

ECHA. **Tributyltin oxide** IPCS Concise International Chemical Assessment Documents. [s.l.: s.n.].

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuffs. **EFSA Journal**, v. 2, n. 10, p. 102, out. 2004.

EMA, M. Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats. **Toxicology Letters**, v. 108, n. 1, p. 17–25, 30 jul. 1999.

EMMETT, M. J. et al. Histone deacetylase 3 prepares brown adipose tissue for acute thermogenic challenge. **Nature**, v. 546, n. 7659, p. 544–548, 14 jun. 2017.

ENERBÄCK, S. et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 90–94, maio 1997.

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

FAN, J. et al. Prenatal and lactation nicotine exposure affects morphology and function of brown adipose tissue in male rat offspring. **Ultrastructural Pathology**, v. 40, n. 5, p. 288–295, 2 set. 2016.

FERNANDEZ, M. A. et al. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, abr. 2002.

FERNANDEZ, M. A.; LIMAVERDE, A. M.; SCOFIELD, A. D. L. Preliminary Evaluation of Human Health Risks From Ingestion of. **Environmental Protection**, v. 53, p. 75–77, 2005.

FINLIN, B. S. et al. Adipose Tissue Mast Cells Promote Human Adipose Beiging in Response to Cold. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8658, 17 dez. 2019.

FLOYD, P.; GEORGE, C. **RISK ASSESSMENT STUDIES ON TARGETED CONSUMER APPLICATIONS OF CERTAIN ORGANOTIN COMPOUNDS RPA REPORT-ASSURED QUALITY**. [s.l: s.n.].

FRONTINI, A. et al. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 5, p. 950–959, maio 2013.

FURDEK, M. et al. Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 2, p. 189–199, fev. 2012.

GALARRAGA, M. et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 12, p. 2791–2796, dez. 2012.

GARG, A. et al. Distribution of butyltins in the waters and sediments along the coast of India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 423–431, fev. 2011.

GERNGROSS, C. et al. Active Brown Fat During <sup>18</sup>F-FDG PET/CT Imaging Defines a Patient Group with Characteristic Traits and an Increased Probability of Brown Fat Redetection. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 7, p. 1104–1110, jul. 2017.

GIRALT, M.; VILLARROYA, F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 2992–3000, 1 set. 2013.

GONZÁLEZ-CASANOVA, J. E. et al. **Adipogenesis Regulation and Endocrine Disruptors: Emerging Insights in Obesity**. **BioMed Research International**Hindawi Limited, , 2020.

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

GROTE, K. et al. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, n. 3, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 1 out. 2004.

GRÜN, F. et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 20, n. 9, p. 2141–55, set. 2006.

GUI-BIN, J.; QUN-FANG, Z.; BIN, H. Speciation of Organotin Compounds, Total Tin, and Major Trace Metal Elements in Poisoned Human Organs by Gas Chromatography-Flame Photometric Detector and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 13, p. 2697–2702, 1 jul. 2000.

HANSEN, M. J. W. et al. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 863–865, 6 ago. 2015.

HANSEN, M. J. W. et al. Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in Obese Humans. **Diabetes**, v. 65, n. 5, p. 1179–1189, 1 maio 2016.

HANY, T. F. et al. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 29, n. 10, p. 1393–1398, 8 out. 2002.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252–1263, 29 out. 2013.

HAUCK, A. K.; BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and lipotoxicity. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 11, p. 1976–1986, nov. 2016.

Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13–27, 6 jul. 2017.

HEATON, J. M. **The distribution of brown adipose tissue in the human**. **J. Anat.** [s.l: s.n.].

HEINDEL, J. J. et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. **Reproductive Toxicology**, v. 68, p. 3–33, mar. 2017.

HO, K. K. Y.; LEUNG, K. M. Y. Organotin contamination in seafood and its implication for human health risk in Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 2014.

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

HORIGUCHI, T. et al. Imposax and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 74, n. 3, p. 651–669, 11 ago. 1994.

HUTTUNEN, P.; HIRVONEN, J.; KINNULA, V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 46, n. 4, p. 339–345, jul. 1981.

HUTTUNEN, P.; KORTELAJAINEN, M.-L. Long-term alcohol consumption and brown adipose tissue in man. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 60, n. 6, p. 418–424, 1990.

IMO. Sistemas antiincrustantes: hacia una solución no tóxica. **La OMI al día**, v. 44, n. 0, 1999.

IMO. Status of multilateral Conventions and instruments in respect of which the International Maritime Organization or its Secretary - General performs depositary or other functions. n. May, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 2017.

JENKINS, S. et al. Oral Exposure to Bisphenol A Increases Dimethylbenzanthracene-Induced Mammary Cancer in Rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 6, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, jun. 2009.

JESPERSEN, N. Z. et al. A Classical Brown Adipose Tissue mRNA Signature Partly Overlaps with Brite in the Supraclavicular Region of Adult Humans. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 798–805, maio 2013.

JESPERSEN, N. Z. et al. Heterogeneity in the perirenal region of humans suggests presence of dormant brown adipose tissue that contains brown fat precursor cells. **Molecular Metabolism**, v. 24, p. 30–43, jun. 2019.

JIA, J. et al. The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1513–1522, 15 mar. 2010.

JORDÃO, R. et al. Obesogens beyond Vertebrates: Lipid Perturbation by Tributyltin in the Crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 8, p. 813–819, ago. 2015.

JUNG, S. M.; SANCHEZ-GURMACHES, J.; GUERTIN, D. A. Brown adipose tissue development and metabolism. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2019. v. 251p. 3–36.

KADOUH, H. C.; ACOSTA, A. Current paradigms in the etiology of obesity. **Techniques in Gastrointestinal Endoscopy**, v. 19, n. 1, p. 2–11, jan. 2017.



KAJIMURA, S.; SAITO, M. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. **Annual Review of Physiology**, v. 76, n. 1, p. 225–249, 10 fev. 2014.

KANNAN, K. et al. Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna, and shark collected from Italian coastal Waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 19–23, jul. 1996.

KEITHLY, J. C.; CARDWELL, R. D.; HENDERSON, D. G. Tributyltin in Seafood from Asia, Australia, Europe, and North America: Assessment of Human Health Risks. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 5, n. 2, p. 337–354, abr. 1999.

KELLER, M. P.; ATTIE, A. D. Physiological Insights Gained from Gene Expression Analysis in Obesity and Diabetes. **Annual Review of Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 341–364, 1 jul. 2010.

KIM, D. D.; BASU, A. Estimating the Medical Care Costs of Obesity in the United States: Systematic Review, Meta-Analysis, and Empirical Analysis. **Value in Health**, v. 19, n. 5, p. 602–613, jul. 2016.

KIM, S. et al. Temporal relation between temperature change and FDG uptake in brown adipose tissue. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 35, n. 5, p. 984–989, 22 maio 2008.

KIRCHNER, S. et al. Prenatal Exposure to the Environmental Obesogen Tributyltin Predisposes Multipotent Stem Cells to Become Adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 3, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, mar. 2010.

KLINGENSPOR, M. Cold-Induced Recruitment of Brown Adipose Tissue Thermogenesis. **Experimental Physiology**, v. 88, n. 1, p. 141–148, jan. 2003.

KURIYAMA, S. N. et al. Developmental exposure to low-dose PBDE-99: Tissue distribution and thyroid hormone levels. **Toxicology**, v. 242, n. 1–3, p. 80–90, dez. 2007.

LA MERRILL, M. et al. Perinatal Exposure of Mice to the Pesticide DDT Impairs Energy Expenditure and Metabolism in Adult Female Offspring. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103337, 30 jul. 2014.

LATINI, G. Monitoring phthalate exposure in humans. **Clinica Chimica Acta**, v. 361, n. 1–2, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, nov. 2005.

LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794–798, 25 ago. 2016.

LEAN, M. E. et al. Brown adipose tissue in patients with pheochromocytoma. **International journal of obesity**, v. 10, n. 3, p. 219—227, 1986a.

LEAN, M. E. J. et al. Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. **Clinical Science**, v. 71, n. 3, p. 291–297, 1 set. 1986b.

LEAN, M. E. J. Brown adipose tissue in humans. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 48, n. 2, p. 243–257, 28 jul. 1989.

LEE, D.-H. et al. Low Dose Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Predict Obesity, Dyslipidemia, and Insulin Resistance among People Free of Diabetes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e15977, 26 jan. 2011.

LEE, M.-W.; LEE, M.; OH, K.-J. Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 6, p. 854, 14 jun. 2019.

LEE, P. et al. Temperature-Acclimated Brown Adipose Tissue Modulates Insulin Sensitivity in Humans. **Diabetes**, v. 63, n. 11, p. 3686–3698, 1 nov. 2014.

LEE, Y. et al. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1, p. 286–299, 12 jan. 2015.

LIDELL, M. E. et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 631–634, 21 maio 2013.

LIDELL, M. E. Brown Adipose Tissue in Human Infants. In: [s.l: s.n.]. p. 107–123.

LIU, J. et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 940–945, 26 ago. 2009.

LIU, L. L. et al. Organotin concentrations in three intertidal neogastropods from the coastal waters of Taiwan. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 1997.

LO, S. et al. Dithioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 84, n. 5, p. 569–576, abr. 2003.

LORENZO, M. et al. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in myocytes and brown adipocytes<sup>12</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. suppl\_14, p. E94–E104, 1 abr. 2008.

LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 652–660, 6 abr. 2000.

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, mar. 2012.

MAFFETONE, P. B.; RIVERA-DOMINGUEZ, I.; LAURSEN, P. B. Overfat Adults and Children in Developed Countries: The Public Health Importance of Identifying Excess Body Fat. **Frontiers in public health**, v. 5, n. July, p. 190, 24 jul. 2017.

MAGUERESSE-BATTISTONI, B. LE et al. Endocrine disrupting chemicals in mixture and obesity, diabetes and related metabolic disorders. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 108, 2017.

MARCELIN, G.; CHUA JR, S. Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 588–593, out. 2010.

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

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P. E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, jan. 1998.

MCALLISTER, E. J. et al. Ten Putative Contributors to the Obesity Epidemic. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 10, p. 868–913, 10 dez. 2009.

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, 2016.

MERLO, E. et al. The obesogen tributyltin induces features of polycystic ovary syndrome (PCOS): a review. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 21, n. 3, 2018.

MERLO, E. et al. Mercury leads to features of polycystic ovary syndrome in rats. **Toxicology Letters**, v. 312, 2019.

MEYER, C. W.; OOTSUKA, Y.; ROMANOVSKY, A. A. Body Temperature Measurements for Metabolic Phenotyping in Mice. **Frontiers in physiology**, v. 8, n. July, p. 520, 31 jul. 2017.

MIRZAEI, K. et al. Crosstalk between circulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma, adipokines and metabolic syndrome in obese subjects. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 5, n. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 2013.

MORI, M. A. et al. Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 8, p. 3339–3351, 1 ago. 2014.

MUTCH, D. M.; CLÉMENT, K. Unraveling the Genetics of Human Obesity. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 12, p. e188, 2006.

NANDIPATI, K. C.; SUBRAMANIAN, S.; AGRAWAL, D. K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 426, n. 1–2, p. 27–45, 21 fev. 2017.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 2, p. 444–452, 2007.

NEWBOLD, R. R. et al. Effects of endocrine disruptors on obesity. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 201–208, abr. 2008.

NGUYEN, K. D. et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, v. 480, n. 7375, p. 104–108, 1 dez. 2011.

NIELSEN, J. B.; STRAND, J. Butyltin Compounds in Human Liver. **Environmental Research**, v. 88, n. 2, p. 129–133, fev. 2002.

NIETO-VAZQUEZ, I. et al. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 183–194, 10 jan. 2008.

OBREGON, M.-J. Adipose tissues and thyroid hormones. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 11 dez. 2014.

OLIVEIRA, F. C. B. et al. Liraglutide Activates Type 2 Deiodinase and Enhances  $\beta$ 3-Adrenergic-Induced Thermogenesis in Mouse Adipose Tissue. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 4 jan. 2022.

ORAVA, J. et al. Different Metabolic Responses of Human Brown Adipose Tissue to Activation by Cold and Insulin. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 272–279, ago. 2011.

PAZ-VILLARRAGA, C. A.; CASTRO, Í. B.; FILLMANN, G. Biocides in antifouling paint formulations currently registered for use. **Environmental Science and Pollution Research**, 8 jan. 2022.

PENZA, M. et al. The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, n. 1, p. 65–75, 15 ago. 2011.

PEREIRA, S. S.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. **Current Obesity Reports**, v. 3, n. 4, p. 422–431, 23 dez. 2014.

PETROVIC, N. et al. Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7153–7164, mar. 2010.

PETROVIĆ, V. et al. Antioxidative defense and mitochondrial thermogenic response in brown adipose tissue. **Genes & Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 225–235, 13 set. 2010.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

PODRATZ, P. L. et al. Tributyltin Impairs the Reproductive Cycle in Female Rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 1035–1046, 15 ago. 2012.

PODRATZ, P. L. et al. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 29–42, nov. 2015.

PODRATZ, P. L. et al. Disruption of fertility, placenta, pregnancy outcome, and multigenerational inheritance of hepatic steatosis by organotin exposure from contaminated seafood in rats. **Science of the Total Environment**, v. 723, 2020.

PRENTICE, A. M. Overeating: The Health Risks. **Obesity Research**, v. 9, n. S11, p. 234S-238S, 12 nov. 2001.

PRENTICE, A. M.; JEBB, S. A. Obesity in Britain: gluttony or sloth? **BMJ**, v. 311, n. 7002, p. 437–439, 12 ago. 1995.

PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 1, p. 78–90, 1 fev. 2003.

QIU, Y. et al. Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1292–1308, jun. 2014.

RANGEL-AZEVEDO, C. et al. Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 105, p. 109002, jul. 2022.

RANTAKOKKO, P. et al. Dietary intake of organotin compounds in Finland: A market-basket study. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 8, p. 749–756, ago. 2006.

RANTAKOKKO, P. et al. Association of placenta organotin concentrations with congenital cryptorchidism and reproductive hormone levels in 280 newborn boys from Denmark and Finland. **Human Reproduction**, v. 28, n. 6, p. 1647–1660, jun. 2013.

RANTAKOKKO, P. et al. Association of placenta organotin concentrations with growth and ponderal index in 110 newborn boys from Finland during the first 18 months of life: a cohort study. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, p. 45, 5 dez. 2014.

RAVANAN, P. et al. Exposure to an organometal compound stimulates adipokine and cytokine expression in white adipose tissue. **Cytokine**, v. 53, n. 3, p. 355–362, mar. 2011.

ROACH, A. C.; WILSON, S. P. Ecological impacts of tributyltin on estuarine communities in the Hastings River, NSW Australia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1780–1786, dez. 2009.

RODRIGUES-PEREIRA, P. et al. Relevant dose of the environmental contaminant, tributyltin, promotes histomorphological changes in the thyroid gland of male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 502, p. 110677, fev. 2020.

RODRIGUES-PEREIRA, P. et al. Subacute and low-dose tributyltin exposure disturbs the mammalian hypothalamus-pituitary-thyroid axis in a sex-dependent manner. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 254, p. 109279, abr. 2022.

ROSENBERG, E. Organotin compounds in foods. In: **Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 430–475.

ROSENWALD, M. et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 659–667, 28 jun. 2013.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature**, v. 281, n. 5726, p. 31–35, 1 set. 1979.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. REGULATION OF ENERGY BALANCE. **Annual Review of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 235–256, jul. 1981.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J.; WYLLIE, M. G. Effects of histamine antagonists on noradrenaline-stimulated blood flow and oxygen consumption of brown adipose tissue in the rat. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 402, n. 3, p. 325–329, nov. 1984.

RÜDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 180–189, set. 2003.



RUSCHKE, K. et al. Gene expression of PPAR $\gamma$  and PGC-1 $\alpha$  in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. **European Journal of Endocrinology**, v. 162, n. 3, p. 515–523, mar. 2010.

SAITO, M. et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1526–1531, 1 jul. 2009.

SAKAMOTO, T. et al. Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 310, n. 8, p. E676–E687, 15 abr. 2016.

SANCHEZ-ALAVEZ, M. et al. ROS and Sympathetically Mediated Mitochondria Activation in Brown Adipose Tissue Contribute to Methamphetamine-Induced Hyperthermia. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 2013.

SANCHEZ-GURMACHES, J. et al. Brown Fat AKT2 Is a Cold-Induced Kinase that Stimulates ChREBP-Mediated De Novo Lipogenesis to Optimize Fuel Storage and Thermogenesis. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 195- 209.e6, jan. 2018.

SANTOS, D. M. DOS et al. Contamination and Impact of Organotin Compounds on the Brazilian Coast. **Nova Science Publishers**, n. JANUARY, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 2011.

SCHEELE, C.; NIELSEN, S. Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. **Redox Biology**, v. 12, p. 770–775, ago. 2017.

SCHEELE, C.; WOLFRUM, C. Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 1, p. 53–65, 1 fev. 2020.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012.

SELLAYAH, D.; CAGAMPANG, F. R.; COX, R. D. On the Evolutionary Origins of Obesity: A New Hypothesis. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1573–1588, maio 2014.

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, 2017.

SHABALINA, I. G. et al. The Environmental Pollutants Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid Upregulate Uncoupling Protein 1 (UCP1) in Brown-Fat Mitochondria Through a UCP1-Dependent Reduction in Food Intake. **Toxicological Sciences**, v. 146, n. 2, p. 334–343, ago. 2015.

SHABALINA, I. G. et al. Metabolically inert perfluorinated fatty acids directly activate uncoupling protein 1 in brown-fat mitochondria. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 5, p. 1117–1128, 4 maio 2016.

SHAPIRA, S. N.; SEALE, P. Transcriptional Control of Brown and Beige Fat Development and Function. **Obesity**, v. 27, n. 1, p. 13–21, 20 jan. 2019.

SHEN, J. et al. Regulation of sympathetic nerve activity by l-carnosine in mammalian white adipose tissue. **Neuroscience Letters**, v. 441, n. 1, p. 100–104, ago. 2008.

SHI, H.; ZHU, P.; GUO, S. Effects of tributyltin on metamorphosis and gonadal differentiation of *Xenopus laevis* at environmentally relevant concentrations. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 4, p. 297–303, 17 maio 2014.

SHIMIZU, I. et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 2099–2112, 1 maio 2014.

SHIMIZU, I.; WALSH, K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. **Current Obesity Reports**, v. 4, n. 2, p. 224–229, 21 jun. 2015.

SHOUCRI, B. M. et al. Retinoid X receptor activation during adipogenesis of female mesenchymal stem cells programs a dysfunctional adipocyte. **Endocrinology**, v. 159, n. 8, p. 2863–2883, 2018.

SHU, L. et al. A-FABP mediates adaptive thermogenesis by promoting intracellular activation of thyroid hormones in brown adipocytes. **Nature Communications**, v. 8, 27 jan. 2017.

SI, J. et al. Peripubertal exposure to low doses of tributyltin chloride affects the homeostasis of serum T, E2, LH, and body weight of male mice. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 307–314, jun. 2011.

SILVA, P. V. et al. Toxicity of tributyltin (TBT) to terrestrial organisms and its species sensitivity distribution. **Science of The Total Environment**, v. 466–467, p. 1037–1046, jan. 2014.

SINGH, G. M. et al. The Age-Specific Quantitative Effects of Metabolic Risk Factors on Cardiovascular Diseases and Diabetes: A Pooled Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e65174, 30 jul. 2013.

SMITH, R. E. Thermoregulatory and Adaptive Behavior of Brown Adipose Tissue. **Science**, v. 146, n. 3652, p. 1686–1689, 25 dez. 1964.

SÖDERLUND, V.; LARSSON, S. A.; JACOBSSON, H. Reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 34, n. 7, p. 1018–1022, 16 jul. 2007.

SONAK, S. et al. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of environmental management**, v. 90 Suppl 1, n. SUPPL. 1, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, fev. 2009.

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

STURKENBOOM, M. G. G. et al. Physiological uptake of [18F]fluorodeoxyglucose in the neck and upper chest region: are there predictive characteristics? **Nuclear Medicine Communications**, v. 25, n. 11, p. 1109–1111, nov. 2004.

SWENNEN, C. et al. Imposex in Sublittoral and Littoral Gastropods from the Gulf of Thailand and Strait of Malacca in Relation to Shipping. **Environmental Technology**, v. 18, n. 12, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, dez. 1997.

SWINBURN, B. A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 804–814, ago. 2011.

TAKAHASHI, S. et al. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. **Environmental Pollution**, v. 106, n. 2, p. 213–218, ago. 1999.

TALLMON, D. A. Tributyltin Contamination and Imposex in Alaska Harbors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 245–249, 26 fev. 2012.

TATSUMI, M. et al. **Intense 18 F-FDG Uptake in Brown Fat Can Be Reduced Pharmacologically**. [s.l: s.n.].

TAYLOR, K. W. et al. Evaluation of the Association between Persistent Organic Pollutants (POPs) and Diabetes in Epidemiological Studies: A National Toxicology Program Workshop Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 7, p. 774–783, jul. 2013.

THAYER, K. A. et al. Role of Environmental Chemicals in Diabetes and Obesity: A National Toxicology Program Workshop Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 779–789, jun. 2012.

THURLBY, P. L.; TRAYHURN, P. The role of thermoregulatory thermogenesis in the development of obesity in genetically-obese ( *ob/ob* ) mice pair-fed with lean siblings. **British Journal of Nutrition**, v. 42, n. 3, p. 377–385, 9 nov. 1979.

TIMMONS, J. A. et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 11, p. 4401–4406, 13 mar. 2007.

TRASANDE, L. et al. Estimating Burden and Disease Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 4, p. 1245–1255, abr. 2015.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 329–339, 5 ago. 2001.

TRUONG, M. T. et al. Focal FDG Uptake in Mediastinal Brown Fat Mimicking Malignancy: A Potential Pitfall Resolved on PET/CT. **American Journal of Roentgenology**, v. 183, n. 4, p. 1127–1132, out. 2004.

TSUDA, T. et al. Daily intakes of tributyltin and triphenyltin compounds from meals. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 4, p. 941–943, 1995.

TURNER, A.; GLEGG, G. TBT-based antifouling paints remain on sale. **Marine pollution bulletin**, v. 88, n. 1–2, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 15 nov. 2014.

U DIN, M. et al. Postprandial Oxidative Metabolism of Human Brown Fat Indicates Thermogenesis. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 2, p. 207- 216.e3, ago. 2018.

UC-PERAZA, R. G.; CASTRO, Í. B.; FILLMANN, G. An absurd scenario in 2021: Banned TBT-based antifouling products still available on the market. **Science of The Total Environment**, v. 805, p. 150377, jan. 2022.

VALVERDE, A. M. et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Causes Insulin Receptor Substrate-2-Mediated Insulin Resistance and Inhibits Insulin-Induced Adipogenesis in Fetal Brown Adipocytes <sup>1</sup>. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1229–1238, mar. 1998.

VAN DEN BERG, S. M. et al. Immune Modulation of Brown(ing) Adipose Tissue in Obesity. **Endocrine Reviews**, v. 38, n. 1, p. 46–68, 1 fev. 2017.

VAN GESSELLEN, N.; BOUWMAN, H.; AVERBUJ, A. Imposex assessment and tributyltin levels in sediments along the Atlantic coast of South Africa. **Marine Environmental Research**, v. 142, p. 32–39, nov. 2018.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1500–1508, 9 abr. 2009.

VELICKOVIC, K. et al. Low temperature exposure induces browning of bone marrow stem cell derived adipocytes in vitro. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4974, 21 dez. 2018.

VELMURUGAN, G. et al. Gut Microbiota, Endocrine-Disrupting Chemicals, and the Diabetes Epidemic. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 8, p. 612–625, ago. 2017.

VERNOCHET, C. et al. Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 10, p. 4408–4419, 8 out. 2014.

VILLARROYA, F. et al. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 284, n. 5, p. 492–504, 1 nov. 2018.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1518–1525, 9 abr. 2009.

VON LENGERKE, T.; KRAUTH, C. Economic costs of adult obesity: A review of recent European studies with a focus on subgroup-specific costs. **Maturitas**, v. 69, n. 3, p. 220–229, jul. 2011.

VONDEREMBSE, A. N. et al. Developmental exposure to DDT or DDE alters sympathetic innervation of brown adipose in adult female mice. **Environmental Health**, v. 20, n. 1, p. 37, 1 dez. 2021.

VOS, J. G. et al. Immunotoxicity of Bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat: Effects on thymus-dependent immunity and on nonspecific resistance following long-term exposure in young versus aged rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 105, n. 1, p. 144–155, ago. 1990.

WANG, Q. A. et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1338–1344, 1 out. 2013.

WARWICK, P. M.; BUSBY, R. Influence of mild cold on 24 h energy expenditure in “normally” clothed adults. **The British journal of nutrition**, v. 63, n. 3, p. 481–8, maio 1990.

WHALEN, M. M.; LOGANATHAN, B. G.; KANNAN, K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. **Environmental research**, v. 81, n. 2, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, ago. 1999.

WHO. Obesity and Overweight. **Global Strateg on Diet, Physical Activity and Health**, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 2003.

WHO. **State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 ; edited by Ake Bergman, Jerrold J. Heindel, Susan Jobling, Karen A. Kidd and R. Thomas Zoeller.** [s.l: s.n.].

WICKSTEED, B.; DICKSON, L. M. PKA Differentially Regulates Adipose Depots to Control Energy Expenditure. **Endocrinology**, v. 158, n. 3, p. 464–466, 1 mar. 2017.

WILLIAMS, E. P. et al. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. **Current Obesity Reports**, v. 4, n. 3, p. 363–370, 28 set. 2015.

WONG, K. H.; DURRANI, T. S. Exposures to Endocrine Disrupting Chemicals in Consumer Products—A Guide for Pediatricians. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 47, n. 5, p. 107–118, maio 2017.

WU, J. et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366–376, jul. 2012.

XIMENES, C. F. et al. Tributyltin chloride disrupts aortic vascular reactivity and increases reactive oxygen species production in female rats. **Environmental**

**Science and Pollution Research**, v. 24, n. 31, p. Maciel, Daniele Claudino, Ítalo Braga Castro, José, 13 nov. 2017.

XU, X. et al. Effect of Early Particulate Air Pollution Exposure on Obesity in Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 12, p. 2518–2527, dez. 2010.

XU, X. et al. Long-term Exposure to Ambient Fine Particulate Pollution Induces Insulin Resistance and Mitochondrial Alteration in Adipose Tissue. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 1, p. 88–98, nov. 2011a.

XU, Z. et al. Ambient particulate air pollution induces oxidative stress and alterations of mitochondria and gene expression in brown and white adipose tissues. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 20, 11 dez. 2011b.

XUE, Y. et al. Hypoxia-Independent Angiogenesis in Adipose Tissues during Cold Acclimation. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 99–109, jan. 2009.

YAMABE, N.; KANG, K. S.; ZHU, B. T. Beneficial effect of 17 $\beta$ -estradiol on hyperglycemia and islet  $\beta$ -cell functions in a streptozotocin-induced diabetic rat model☆. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 249, n. 1, p. 76–85, 15 nov. 2010.

YANG, F. T.; STANFORD, K. I. Batokines: Mediators of Inter-Tissue Communication (a Mini-Review). **Current Obesity Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 7 mar. 2022.

YANG, R. et al. Butyltins compounds in molluscs from Chinese Bohai coastal waters. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 637–643, ago. 2006.

YONESHIRO, T. et al. Age-Related Decrease in Cold-Activated Brown Adipose Tissue and Accumulation of Body Fat in Healthy Humans. **Obesity**, v. 19, n. 9, p. 1755–1760, set. 2011.

YONESHIRO, T. et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3404–3408, 1 ago. 2013.



ZEIDAN, G. C.; BOEHS, G. Assessment of tributyltin contamination based on imposex in *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) along southern Bahia coast, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 185–190, 15 ago. 2016.

ZHANG, G.; SUN, Q.; LIU, C. Influencing factors of thermogenic adipose tissue activity. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–11, 2016.

ZHANG, J. et al. Tributyltin chloride results in dorsal curvature in embryo development of *Sebastiscus marmoratus* via apoptosis pathway. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 437–442, jan. 2011.

ZINGARETTI, M. C. et al. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 9, p. 3113–3120, 5 set. 2009.