

EXPOSIÇÃO AO CONTAMINANTE TRIBUTILESTANHO NO PERÍODO PRÉ-PÚBERE PROMOVE ALTERAÇÕES NO CICLO REPRODUTIVO E NOS NÍVEIS DE HORMÔNIOS ESTEROIDES SEXUAIS EM RATAS *WISTAR*

Kayke de Lima Barbosa¹

Rodrigo Alves do Carmo²

RESUMO

O tributilestanho (TBT) é um xenobiótico emergente amplamente utilizado como biocida em tintas anti-incrustantes para evitar a incrustação de organismos marinhos em cascos de embarcações, sendo este poluente caracterizado como um produto químico desregulador endócrino. Investigações têm associado a exposição ao TBT com perturbações no sistema endócrino, como obesidade, distúrbios metabólicos e reprodutivos. Neste estudo, objetivou-se analisar os principais efeitos causados pela exposição subcrônica ao TBT sobre aspectos morfométricos e reprodutivos em ratas no período pré-puberal. Para tanto, ratas Wistar pré-púberes foram tratadas, via gavagem, com duas concentrações de TBT (100 e 1000 ng/Kg) durante 30 dias. Ao longo do tratamento, foram analisados os efeitos do TBT sobre o crescimento corporal e caudal, ganho de peso, consumo hídrico e alimentar. Ainda, foram estudados os efeitos da exposição ao TBT sobre o perfil adipogênico, peso de órgãos, tempo de abertura vaginal, primeiro estro, ciclo reprodutivo e níveis de estrogênio e progesterona. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto ao peso corporal absoluto, ganho de peso e perfil adipogênico dos animais, além disso, os resultados não sugeriram alteração no padrão do consumo hídrico e alimentar, nem no crescimento corporal e caudal dos animais. Entretanto, disfunções reprodutivas, como diferença no peso uterino e ovariano, ciclicidade estral irregular e alteração no nível de progesterona foram evidenciadas no presente estudo. Portanto, estes achados sustentam a ideia da atividade moduladora e da toxicidade do TBT sobre o sistema reprodutivo de ratas.

Palavras-chave: Tributilestanho. Desregulador Endócrino. Disfunções morfométricas. Anormalidades reprodutivas.

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an emerging xenobiotic commonly used as a biocide in antifouling paints to prevent the fouling of marine organisms on boat hulls, this pollutant being used as an endocrine disrupting chemical. Investigations have associated exposure to TBT with disturbances in the endocrine system, such as obesity, metabolic and reproductive disorders. This study aimed to analyze the main effects caused by subchronic exposure to TBT on morphometric and reproductive aspects in female rats in the prepubertal period. For this purpose, prepubertal Wistar rats were treated, via gavage, with two concentrations of TBT (100 and 1000 ng/Kg) for 30 days. Throughout the treatment, the effects of TBT on body and tail growth, weight gain, water and food

¹ Graduando do curso de Farmácia do Centro Universitário Salesiano. E-mail: kaykedelima@outlook.com.

² Farmacêutico, mestre em Ciências Fisiológicas e docente do Centro Universitário Salesiano. E-mail: rcarmo@ucv.edu.br.

consumption were analyzed. Furthermore, the effects of exposure to TBT on adipogenic profile, organ weight, vaginal opening time, first estrus, reproductive cycle and estrogen and progesterone levels were studied. There were no statistically significant differences between groups regarding absolute body weight, weight gain and adipogenic profile of the animals. Furthermore, the results did not suggest changes in the pattern of water and food consumption, nor in the animals' body and tail growth. However, reproductive dysfunctions, such as differences in uterine and ovarian weight, irregular estrous cyclicity and changes in the level of progesterone were evidenced in the present study. Therefore, these findings support the idea of the modulatory activity and toxicity of TBT on the reproductive system of female rats.

Keywords: Tributyltin chloride. Endocrine disruptors. Morphometric dysfunctions. Reproductive changes.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento químico-industrial tem sido apontado como um dos principais responsáveis pela geração de compostos químicos nos últimos anos, mesmo que intuitivamente com o propósito de contribuir com o avanço e benefício urbano (KHETAN, 2014). Atualmente, estudos têm buscado investigar a origem e atividade desses produtos químicos sintéticos encontrados nos corpos hídricos, sejam eles de natureza desconhecida ou não, principalmente aqueles com capacidade de desregular o sistema endócrino (VOS et al., 2000; CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011). Os compostos químicos denominados desreguladores endócrinos (DE) são aqueles que interferem em uma ou mais etapas de regulação dos mecanismos de ação hormonal no sistema endócrino (MACON; FENTON, 2013), alterando a função deste sistema e causando efeitos adversos à saúde do organismo, de sua prole ou de subpopulações, até então intactos ou não percebidos (HEINDEL et al., 2012).

Dentre os DE, pode-se destacar o tributilestanho (TBT), um composto organoestânico (OT), que tem sido amplamente utilizado como biocida em tintas anti-incrustantes. Estas tintas são comumente aplicadas em cascos de embarcações para evitar a incrustação de organismos marinhos como algas, mexilhões, cracas e outro (GRACELI et al., 2013). Por muito tempo, acreditou-se que o TBT fosse o composto anti-incrustante ideal, principalmente pela sua capacidade em atuar sobre diferentes biotas, maior duração e fácil degradação. Entretanto, por volta da década de 1970, surgiram os primeiros relatos da toxicidade do TBT e seus efeitos deletérios sobre organismos considerados não-alvos em razão do seu alarmante uso em tintas anti-incrustantes (BLABER, 1970; ALZIEU, 1998; SOUSA et al., 2014).

Assim como outros compostos DE, o TBT é capaz de agir diretamente sobre os receptores hormonais, mimetizando hormônios ou antagonizando seus efeitos, independentemente de possuírem potência equivalente ou não. Pode também ter ação direta sobre os conjuntos proteicos responsáveis pelo transporte dos hormônios até seus alvos finais. Sua afinidade pode não ser específica, ou seja, pode ter capacidade de interagir com diferentes tipos de receptores, alterando desta forma vários eixos do organismo (HEINDEL et al., 2012). Blaber (1970) documentou um dos principais eventos ecotoxicológicos já observados: a alteração anatômica de gastrópodes *Nucella lapillus*, cujo o desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos em indivíduos fêmeas foi associado a contaminação por TBT e designado "imposex".

Devido ao poder bioacumulativo do TBT e os produtos da sua degradação, que acabam contaminando peixes, lulas, moluscos e até outros predadores, como focas, baleias, golfinhos e baleias (SONAK et al., 2009) e espécies de plantas e espécies marinhas, que fazem parte da dieta humana, como ostras, salmão de viveiro, mexilhões e algas marinhas (OLIVEIRA; SANTELLI, 2010), sendo essa a principal fonte de exposição em seres-humanos, o TBT tem sido considerado um xenobiótico emergente pelas agências de proteção ambiental e de saúde. Ainda, apesar da ingestão de frutos do mar contaminados ser a fonte mais importante de contaminação, existem outras 31 formas de exposição aos OTs, como ingestão de resíduos do solo/sedimentos contaminados, absorção dérmica e inalação (ESFA, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), doses consideradas aceitáveis de TBT estavam em torno de 300 ng/kg. No entanto, anos depois, a *European Food Safety Authority* (ESFA) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA-USA, 1997), relataram que níveis “seguros” de consumo diário de OTs, a *Tolerable Daily Intake* (TDI), equivalem a 250 ng/Kg de peso corporal (RANTAKOKKO et al., 2013). Entretanto, estudos prévios demonstram que concentrações menores que esses valores podem ser suficientes para causar complicações à reprodução e ao metabolismo de mamíferos, como processos inflamatórios, remodelamento tecidual, perturbações hormonais e metabólicas, entre outras (PODRATZ et al., 2012; BERTULOSO et al., 2015; COSTA et al., 2019).

Um dos principais sistemas biológicos que sofre influência pela exposição ao TBT é o sistema reprodutor feminino. Esse sistema, essencial para o processo reprodutivo e perpetuação das espécies de mamíferos, encontra-se harmonicamente conectado aos outros sistemas por meio de complexas vias de sinalização endócrina, envolvendo hormônios como os esteroides estrogênio e progesterona (YOUNG et al., 2017). Investigações têm demonstrado a alta toxicidade do TBT sobre este sistema, causando irregularidades na função de hormônios sexuais e na fertilidade, além de prejuízos na função ovariana (PODRATZ et al., 2012; DE ARAÚJO et al., 2018b).

A grande influência do sistema reprodutor feminino em ser modulado por compostos exógenos torna este sistema um interessante alvo de estudos para caracterizar as possíveis modificações causadas por compostos DE, como o TBT. No entanto, pouco se sabe sobre as ações dos DE sobre o sistema reprodutivo feminino em animais no período pré-púbere, sendo a grande parcela dos estudos registrados na literatura, realizados em modelos de exposição adulta e, portanto, já com a puberdade atingida.

Portanto, este trabalho buscou investigar os efeitos nocivos desencadeados pela exposição subaguda ao TBT, investigando sua capacidade deletéria sobre aspectos morfométricos, como perfil adipogênico, crescimento corporal, ingestão hídrica e alimentar, bem como sua influência sobre o sistema reprodutivo feminino, avaliando sua atividade sobre o ciclo reprodutivo e perfil hormonal de ratas *Wistar* no período pré-púbere.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SISTEMA REPRODUTIVO FEMININO

O sistema reprodutor feminino é anatomicamente composto pela genitália externa feminina, sendo esta, a vulva, e por órgãos internos, como a vagina, cérvix, útero,

tubas uterinas e os ovários (KUMAR et al., 2013). Esse conjunto é essencial para o processo reprodutivo e perpetuação das espécies de mamíferos, provendo ambiente favorável à fertilização dos oócitos, implantação e desenvolvimento embrionário (KOBAYASHI; BEHRINGER, 2003). Existem, ainda, as glândulas mamárias, que morfológicamente são um tipo de glândulas cutâneas, mas fisiologicamente, elas podem ser classificadas como glândulas acessórias do sistema reprodutivo feminino (TALANTI; HOPUSU, 1961).

Este sistema inclui duas gônadas, os ovários, os quais apresentam papel importante na maturação e liberação do gameta feminino (oócito) por meio da ovulação. Nas tubas uterinas o gameta poderá ser fertilizado e levado até o útero, órgão onde ocorre a nidação e o desenvolvimento do embrião (HANNON; FLAWS, 2015). Os ovários são fundamentais para a reprodução e manutenção do embrião no útero, além disso, atuam em outros locais como no cérebro, hipófises, tubas uterinas, cérvix, vagina e glândulas mamárias (HANNON; FLAWS, 2015).

Uma das principais características do sistema reprodutivo feminino é o seu caráter dinâmico, onde a cada ciclo reprodutivo o miométrio uterino passa por remodelamento (hipertrofia e involução), o ovário sofre reparo tecidual após a ovulação e o trato como um todo ganha e perde a capacidade de receber ou não um novo embrião (EDDIE et al., 2014). Este sistema atua harmonicamente pois há a participação de complexas vias de sinalização endócrina, envolvendo hormônios como os esteroides estrogênio e progesterona (YOUNG et al., 2017). Além destes, os hormônios não esteroides, como o hormônio folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), também contribuem para a formação de um eixo de comunicação que tem por função coordenar as modificações do trato reprodutivo como um todo, preparando-o para a reprodução. Essa complexa rede de sinalização e regulação é designada eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) (ASIMAKOPOULOS, 2012).

De maneira concisa, o eixo HHG é o principal responsável por regular os eventos e as modificações que acontecem no trato reprodutivo ao longo dos ciclos, durante a fase reprodutiva dos mamíferos (ASIMAKOPOULOS, 2012). Quando estimulados, os neurônios secretores de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretam este hormônio, que apresenta um papel fundamental na modulação da cascata de eventos hormonais, estimulando as células gonadotróficas na hipófise anterior a produzirem e secretarem, na circulação sanguínea, os hormônios gonadotróficos FSH e LH, responsáveis pela regulação funcional das gônadas em ambos os sexos (MOORE; PRESCOTT; CAMPBELL, 2013).

Como relatado anteriormente, as gônadas, além de estarem envolvidas na produção, desenvolvimento e liberação dos gametas, também possuem a função de produzirem hormônios, dentre eles estão o estradiol e a progesterona, além de inibinas e activinas que acabam por desempenhar uma sinalização de *feedback* para os neurônios secretores de GnRH, direcionando assim a liberação pulsátil do peptídeo do mesmo nome (GnRH). No entanto, especialmente o estrogênio possui um importante papel na regulação do eixo HHG, sendo um dos principais reguladores desses neurônios ao longo dos ciclos reprodutivos pelos mecanismos de *feedback* (ASIMAKOPOULOS, 2012; MOORE; PRESCOTT; CAMPBELL, 2013).

Os hormônios LH e FSH agem sob seus respectivos receptores, realizando um papel central em todas as fases do ciclo reprodutivo. Durante o ciclo, importantes eventos ocorrem para garantir a reprodução normal, como a produção dos hormônios esteroides, o crescimento dos folículos ovarianos, além da indução da ovulação e o processo de formação do corpo lúteo, sendo todos estes fenômenos modulados por

LH e FSH (LEGAN; KARSCH 1975; RICHARDS et al., 1980; FILICORI et al., 1986; MAGIAKOU et al., 1997).

No presente trabalho, o modelo experimental utilizado trata-se de um modelo de roedor, portanto, torna-se importante compreender resumidamente a dinâmica de seu ciclo reprodutivo. O ciclo reprodutivo dos roedores é designado ciclo estral, sendo caracterizado principalmente pelas modificações morfológicas que ocorrem no trato reprodutivo das fêmeas, com um tempo de duração menor que os 28 dias observados em humanos saudáveis, durando normalmente entre 4 e 5 dias (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005).

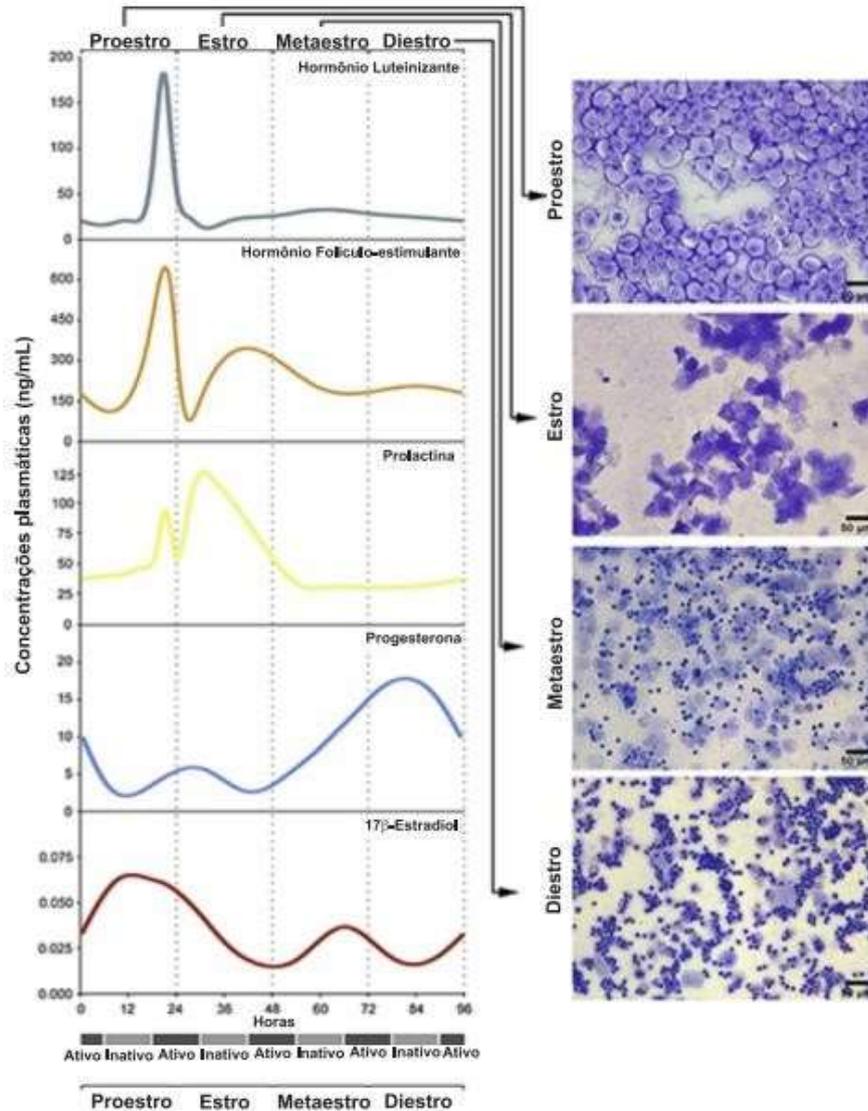
As fêmeas de roedores são poliestricas, e possuem um ciclo estral sucessivo e regular, sendo este, dividido em quatro fases: **proestro (P)**, **estro (E)**, **metaestro (M)** e **diestro (D)**, as quais normalmente podem ser identificadas via análise do esfregaço vaginal (WESTWOOD, 2008). As modificações estruturais no epitélio vaginal durante o ciclo são induzidas pela ação do estrogênio e da progesterona, assim sendo, a vagina pode ser comparada com um “espelho” da função ovariana, refletindo desta forma, a atividade dos hormônios sexuais liberados pela gônada feminina. Portanto, as características qualitativas e quantitativas das células presentes no esfregaço vaginal, são sugestivas da fase do ciclo em que animal em estudo se encontra (PACCOLA et al., 2013).

A fase de P (duração de 12-14 horas) corresponde à fase folicular do ciclo menstrual humano, a fase pré-ovulatória, com altos níveis circulantes de 17- β -estradiol e uma pequena elevação da prolactina. Nesta etapa do ciclo, o epitélio vaginal compreende de 9-12 camadas de células, tendo as mais maduras na superfície e sendo caracterizado por esfregaço vaginal com a predominância de células arredondadas e nucleadas. O aumento de 17- β -estradiol estimula a liberação de GnRH e consequentemente a liberação de FSH e LH na circulação, estimulando a ovulação na fase de estro (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005; MCLEAN et al., 2012).

Na próxima fase, a E (25-27 horas), há a queda nos níveis de 17- β -estradiol circulante e a prolactina por sua vez, é elevada. Seu esfregaço distingue-se pela presença de células irregulares e anucleadas cornificadas. Já a entrada da fase de M (6-8 horas), coincide com uma contínua elevação da progesterona e corresponde ao início da fase lútea. A progesterona sérica começa a aumentar e há uma discreta elevação do 17- β -estradiol em resposta à ativação do corpo lúteo. Nessa fase, a parede vaginal apresenta infiltrado de leucócitos na camada epitelial que já se encontra mais delgada, devido a uma queda nos níveis de estradiol.

Por fim, na D (55-57 horas), o corpo lúteo começa a reduzir a liberação de progesterona, o epitélio vaginal se apresenta na sua forma mais delgada e a partir deste ponto, a degeneração epitelial cessa, e o epitélio recomeça a crescer graças à mitose de suas células. Leucócitos predominam no esfregaço vaginal (Figura 1) (HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON, 2005; MCLEAN et al., 2012).

Figura 1 – Representação da variação hormonal ao longo do ciclo estral e a celularidade do esfregaço vaginal de roedor.



Fonte: Adaptado de MCLEAN e colaboradores (2012).

Para além do exposto, o controle e desenvolvimento do ciclo reprodutivo é conduzido principalmente pelos hormônios esteroides estrogênio e progesterona, sobretudo pelo estímulo de receptores hormonais específicos. O estrogênio é um hormônio produzido nas células da granulosa ovariana e possui suas atividades mediadas por receptores nucleares de estrogênio (ERs), como o ER α (alfa) e ER β (beta). Estes receptores possuem distribuições e funções que sofrem variações nos tecidos, principalmente por serem codificados a partir de genes diferentes (*ESR1* e *ESR2*) (KUIPER et al., 1996; COUSE et al., 1997; HALL; COUSE; KORACH, 2001; GUSTAFSSON, 2003).

Os ER α encontram-se predominantemente expressos nas regiões do hipotálamo, hipófise e no útero (KUIPER et al., 1996), por outro lado, a expressão de ER β faz-se preeminente no hipotálamo, ovário e pulmão (TREMBLAY et al., 1997). Já a progesterona, possui suas atividades mediadas pelo estímulo dos receptores nucleares de progesterona-A (PR-A) e progesterona-B (PR-B), que estão distribuídos abrangentemente nos órgãos dos indivíduos. Isto posto, por meio de estímulos hipofisários, ocorre a secreção do LH, que leva ao rompimento do folículo ovariano e

induz o desenvolvimento do corpo lúteo. Esse, por sua vez, é responsável pela produção da progesterona, que irá auxiliar na manutenção do tecido endometrial ao longo do ciclo menstrual. No entanto, a elevada concentração desse hormônio na circulação sanguínea promove efeito de inibição do GnRH no hipotálamo – *feedback negativo*, cessando a produção de LH pela hipófise (KUIPER et al., 1996).

Sabe-se que o controle do eixo HHG ocorre por meio de um complexo balanço dinâmico mediado por sinais excitatórios e inibitórios. Contudo, este balanço e, conseqüentemente, suas funções, podem ser comprometidos por fatores endógenos, como o estado metabólico, e por fatores exógenos, como a poluição ambiental e, consecutivamente, a exposição a xenobióticos (PENZA et al., 2011; WALKER et al., 2013; TOPPER; WALKER; GORE, 2015; SKINNER et al., 2016). Ainda, dentre os principais xenobióticos capazes de induzir complicações no sistema reprodutivo de animais, destaca-se aqueles com capacidade de atuar sob receptores hormonais, tanto como agonistas quanto antagonistas, sendo esses conhecidos como DE (DAVIS; FENTON, 2013b).

2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os DE são compostos capazes de interferir de alguma forma nas etapas dos mecanismos de ação hormonal no sistema endócrino (MACON; FENTON, 2013) e compreendem um grande grupo de drogas sintéticas, com um perfil de alta heterogeneidade, sendo utilizados na produção industrial, em pesticidas, subprodutos, além de em compostos naturais como fitoestrogênios, entre outros. Estes compostos são conhecidos pela capacidade de induzir alterações morfofisiológicas no sistema biológico de um organismo, de sua prole ou de subpopulações, principalmente pelos efeitos adversos causados mediante a exposição a eles (MANSERVISI et al., 2015).

Sabe-se que os principais prejuízos causados pela contaminação por esses compostos estão associados com os seus mecanismos de ação sobre receptores hormonais, onde podem atuar mimetizando a ação de hormônios e/ou atuando como antagonistas de seus efeitos no organismo, indiferentemente se a potência de ligação a esses receptores são ou não equivalentes (HEINDEL et al., 2012).

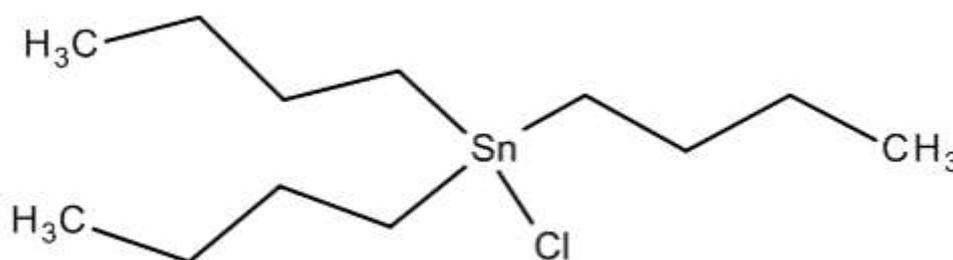
Os DE também podem atuar diretamente sobre grupamentos proteicos responsáveis pelo transporte de hormônios até o seu sítio de ligação, sendo capazes de causar alteração em vários eixos fisiológicos do organismo devido à ausência de especificidade na interação com os receptores, por exemplo, os receptores nucleares e/ou não nucleares de esteroides, como o ER, e também de neurotransmissores, como os receptores de serotonina e noradrenérgicos (DE COSTER; VAN LABEREKE, 2012).

Uma classe que tem sido identificada como um importante grupo de micropoluentes DE são os OTs, que têm sido utilizados em larga escala na indústria, principalmente na produção de pesticidas, plásticos, tintas e estabilizadores de cloreto de polivinila (PVC), com capacidade de desregular diversos eixos hormonais, como o eixo reprodutivo, tanto em espécies invertebradas quanto em vertebradas (COSTA et al., 2017; DE ARAÚJO et al., 2018a).

2.2.1 Compostos Organoestânicos

Os OTs foram estudados inicialmente pelo cientista e químico *Sir Edward Frankland*, o qual foi responsável pela síntese dos compostos diiodeto de dietilestanho e tetraetilestanho nos anos 1853 e 1859, respectivamente. A partir daí, até os anos 2000, ao menos 800 tipos de OTs já eram conhecidos, sendo a maioria oriunda de processos antropogênicos, com exceção dos metilestanhos (HOCH, 2001), que são capazes de serem gerados de maneira orgânica por ação de bactérias em um processo conhecido como biometilação (HALLAS; MEANS; COONEY, 1982). Estes compostos podem ser caracterizados pela presença de pelo menos uma ligação entre o átomo de estanho ao átomo de carbono (Sn-C), sendo o segundo elemento, pertencente a um grupo orgânico (Figura 2) (NICHOLSON, 1989).

Figura 2 – Fórmula estrutural química do TBT contendo o cloro como espécie aniônica, ou seja, o composto é o cloreto de tributilestanho (TBTCl).



Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Cloreto-de-tributiltina>. Acesso realizado em 14 de Outubro de 2021.

O uso de compostos OTs, nas mais diferentes áreas de atividade humana, tem crescido com grande proporção, principalmente na produção de estabilizantes de PVC, agentes preservativos de madeiras, pesticidas e fungicidas agrícolas, catalisadores na produção de polímeros, detectores de cintilação de raios γ e raios X, desinfetantes de superfície (inclusive, aqueles utilizados em práticas hospitalares e veterinárias), higienizadores de roupas, ionóforos em eletrodos seletivos de íons de membrana líquida e fármacos, como por exemplo, anti-inflamatórios e drogas para o tratamento de câncer (ROSENBERG, 2013; SOUSA et al., 2014).

Compostos mono e diorganoestânicos tinham seu uso direcionado a estabilização de PVC, revestimentos de vidros e catalisação de reações químicas. Os compostos triorganoestânicos foram largamente utilizados na composição de biocidas e pesticidas, e por final os tetraorganoestânicos foram usados como intermediários na indústria química (APPEL, 2004). Sua produção chegou a alcançar 60.000 toneladas anuais, suprimindo a demanda de suas aplicações na agricultura, indústria e biomedicinais, chegando a ser, alguns de seus compostos, candidatos a quimioterápicos (NATH, 2008).

No entanto, uma forma de utilização que ganhou grande notoriedade a partir da década de 1950, foi a aplicação desses produtos como biocidas em tintas anti-

incrustantes. Estas tintas são comumente aplicadas em cascos de navios para evitar que algas, mexilhões e outros organismos possam incrustar nas embarcações (BRYAN et al., 1986; GRACELI et al., 2013). Os primeiros compostos utilizados regularmente em tintas anti-incrustantes, no início do século XX, foram os óxidos de zinco e de cobre, conhecidas como tintas de primeira geração. Entretanto, em razão da rápida perda de eficiências dessas tintas, principalmente pela curta durabilidade, desenvolveu-se, em 1961, a primeira tinta anti-incrustante à base de um OT (GODOI et al., 2003; FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007).

Em 1950, cientistas holandeses determinaram a atividade biocida dos compostos triorganoestânicos. A partir daí, notou-se que diferentes compostos triorganoestânicos afetavam diferentes organismos e, dentre estes compostos, destacou-se o TBT. Este químico foi um dos compostos mais utilizados na fabricação de componentes anti-incrustantes nas últimas décadas, distinguindo-se entre os OTs por sua maior toxicidade, o que justifica a efetividade de sua atividade biocida, visto que ele é capaz de atuar sobre diferentes microrganismos, como bactérias e fungos, e organismos que sobrevivem no meio aquático (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

Por muito tempo, acreditou-se que o TBT fosse o composto anti-incrustante ideal para o uso em embarcações, particularmente pela sua capacidade de atuar sobre diferentes biotas e por sua longa duração (SOUSA et al., 2014). Financeiramente, o grande aumento de sua utilização impactou significativamente nas finanças das indústrias de anti-incrustantes, gerando uma renda na ordem de bilhões anualmente, principalmente pela prevenção de manutenções de alto custo e no tempo de docagem das embarcações (SOUSA et al., 2014). No entanto, somente durante a década de 1970 ergueram-se as primeiras observações acerca da toxicidade causada pelo uso de TBT em tintas anti-incrustantes, principalmente sobre organismos considerados não alvos (ALZIEU, 1998).

Na França, entre os anos de 1975 e 1982, foi observado um prejuízo significativo na reprodução de ostras devido a anomalias envolvendo processos de calcificação nelas, o que causou grande perda econômica, sendo essa uma das primeiras evidências de danos ambientais causados pela liberação de OTs provenientes de tintas anti-incrustantes (SONAK, 2009). Outros eventos congêneres foram sendo observados ao longo do tempo, tornando-se alvos de estudos por pesquisadores que passaram a reproduzir esses eventos em laboratórios, conseqüentemente, encontrando significativa redução na taxa de moluscos (BEAUMONT; BUDD, 1984; GIBBS; BRYAN, 1986), crustáceos (MEADOR, 1986), de microalgas (BEAUMONT; NEWMAN, 1986), e deficiência no crescimento de mexilhões (SALAZAR; SALAZAR, 1991).

Estes estudos foram importantes para evidenciar a toxicidade dos OTs sobre diferentes populações, levando-os a serem classificados como o terceiro poluente ambiental mais importante, aumentando assim a preocupação com sua bioacumulação no ecossistema e conseqüentemente no seu papel de contaminante na cadeia trófica, podendo atingir a espécie humana (NATH, 2008). Na atualidade, o uso de TBT é banido por vários órgãos sanitários na maior parte do mundo. Entretanto, estudos têm demonstrado altas concentrações deste composto em sedimentos de pequenos portos e na água de lavagem dos cascos em países como a Suécia e Finlândia, sendo as embarcações de lazer uma das principais fontes de liberação no

meio ambiente (EKLUND et al., 2009; EKLUND; ELFSTROM; BORG, 2008; LARFESTRÖM et al., 2017).

No Brasil, é possível ter livre acesso ao TBT, como observado na Figura 3, onde encontra-se presente até mesmo a indicação de seu uso para a confecção de tintas anti-incrustantes, mas nada notificando o seu impacto à saúde humana e ao meio ambiente (CESBRA QUÍMICA, 2018). Esse tipo de comércio permite, por exemplo, que indivíduos amadores tenham acesso a esse produto e utilizem de maneira indiscriminada, como alguns pescadores e proprietários de estaleiros menores e de marinas particulares, acarretando num maior despejo dessa substância nos corpos hídricos (BUZELLI; CUNHA-SANTINO, 2013).

Figura 3 –Captura de tela mostrando anúncio de venda de TBTCl no site CESBRA.



Disponível em: <https://2122-br.all.biz/o-cloreto-de-tri-butil-estanho-tbtcl-cesbra-g3678>. Acesso realizado em 09 de Abril de 2021.

Ao longo do litoral brasileiro, importantes investigações demonstraram elevadas taxas de contaminação por OTs, como na baía de Guanabara, localizada no Rio de Janeiro, onde constatou-se a ocorrência de imposex em gastrópodes, sendo este evento um importante bioindicador utilizado para avaliar a contaminação por OTs (LIMAVERDE et al., 2007); na baía de Todos os Santos, localizada no Estado da Bahia, onde foram detectadas grandes concentrações de TBT no sedimento e em mexilhões (BORGES et al., 2013) e no Espírito Santo, onde altos níveis de OTs na baía de Vitória foram observados em estudos (COSTA et al., 2008, 2014, 2017).

Durante seus estudos na Inglaterra, Blaber (1970) percebeu que a contaminação por TBT em gastrópodes da espécie *Nucella lapillus* causava indução irregular de características masculinas, tal qual o desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos, como pênis e canal deferente, em indivíduos fêmeas, sendo este fenômeno, denominado imposex, um dos mais importantes já documentados na área da ecotoxicologia. Atualmente, este efeito tem sido utilizado como um importante indicador de contaminação por OTs em diversos países, inclusive no Brasil, onde tem

sido evidenciado um avanço no perfil de contaminação por TBT ao longo da costa do país (FERNANDEZ et al., 2002; LIMAVERDE et al., 2007; DE CASTRO; PERINA; FILLMANN, 2012).

No Estado do Espírito Santo, recentes investigações evidenciaram a ocorrência de imposex em moluscos de diferentes espécies, como *Thais deltoidea*, *Leucozonia nassa* e *Leucozonia ocellata*, sendo notado também alterações anatômicas no aparelho reprodutor masculino em organismos das duas últimas espécies, tornando perceptível o alto nível de contaminação por OTs no litoral capixaba (COSTA et al., 2008, 2013, 2017).

Uma das principais características do TBT e dos produtos gerados pela sua degradação no ambiente, é o seu poder bioacumulativo. Esta propriedade tem sido responsável pela contaminação de vários organismos ao longo da cadeia trófica, como peixes, ostras, moluscos, baleias e até mesmo pássaros, além de diferentes espécies de plantas, como as algas marinhas. É importante ressaltar que essas espécies estão comumente inseridas na dieta humana, tornando-se a fonte mais importante de contaminação em seres humanos (SONAK et al., 2009; OLIVEIRA; SANTELLI, 2010).

Conforme preconizado pela EPA-USA (1997) e pela ESFA, a dose de exposição ao TBT considerada “segura” ou tolerável para humanos é em torno de 250-300 ng/Kg de peso corporal por dia (RANTAKOKKO et al., 2013). Esses valores de referência são obtidos a partir de testes de toxicidade do composto e através da caracterização pelo qual o indivíduo é submetido a exposição. Contudo, países europeus, como Itália e Portugal, e asiáticos, como a Coreia, têm mostrado que a exposição ao TBT extrapola a TDI (KEITHLY; CARDWELL; HENDERSON, 1999).

Apesar de a ingestão de frutos do mar contaminados ser a fonte mais importante de contaminação, existem outras 31 formas de exposição aos OTs, como ingestão de resíduos do solo/sedimentos contaminados, absorção dérmica e inalação (ESFA, 2004). No Japão, uma importante análise reportou que o consumo diário de TBT no país, no ano de 1995, estava entre 2,2 a 6,9 µg, e o valor estimado de consumo por humanos via ingestão de alimentos de origem marinha no mundo estava entre 0.18 a 2.6 µg/dia/pessoa (KOTAKE, 2012).

Podratz e colaboradores (2012) constataram a ocorrência de alterações no ciclo reprodutivo de ratas da linhagem *Wistar* que foram tratadas com 100 ng/Kg de TBT no período de 15 dias, também, observou-se perturbações hormonais, como nos níveis de E2 e P4. Em estudo semelhante, utilizando a mesma dosagem, o TBT foi capaz de causar maior ganho de peso, inflamação do tecido adiposo, além de alterações no controle metabólico envolvendo órgãos endócrinos de animais tratados com este composto (BERTULOSO et al., 2015). Estudos também reportaram mudanças no eixo HHG de animais tratados com 100 ng/Kg de TBT por 15 dias, associando esses prejuízos à desregulação da sinalização de kisspeptina, à diminuição da expressão de *GnRH* e também às mudanças nos níveis de LH (SENA et al., 2017).

Para além do exposto, outros prejuízos provocados pela contaminação por OTs, como depósito de lipídios e alteração na função dos ovários, principalmente pela desregulação de diferentes vias bioquímicas, como a de proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR γ), proteínas de ligação potenciadoras de CCAAT (C/EBP β) e Lipina-1, também já foram relatados na literatura (DE ARAÚJO et al., 2018). A exposição ao TBT foi passível de mudar a ação de enzimas que atuam na esteroidogênese dos órgãos ovarianos, sobretudo pela sua capacidade de atuar

inibindo competitivamente a enzima aromatase, que está envolvida na conversão de testosterona em estradiol, acarretando na diminuição da conversão de andrógenos em estrógenos (OMURA et al., 2001; DELGADO FILHO et al., 2011), causando significativo aumento na desregulação dos níveis de testosterona e tornando-se prejudicial ao desenvolvimento sexual de animais (GROTE et al., 2004).

Pereira-Fernandes e outros (2013) evidenciaram a capacidade do TBT em induzir a obesidade em linhagem de células 3T3-L1, relatando o mesmo como um composto químico obesogênico, sendo explicado pelos mecanismos intracelulares envolvidos no estímulo causado por este composto. Em síntese, demonstra-se ainda, em outros trabalhos, que o TBT pode interferir no metabolismo dos lipídios e induzir a diferenciação e proliferação de adipócitos, além de revalidar o seu poder bioacumulativo, visto que é capaz de encontrar este composto depositado em diferentes tecidos (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013; JORDAO et al., 2015; LYSSIMACHOU et al., 2015).

Em consonância com os dados expostos, e tendo em vista que o TBT é um xenobiótico emergente, principalmente pelo seu alto potencial modulador sobre o sistema endócrino, causando complicações morfofisiológicas em diferentes sistemas biológicos, como o reprodutivo, o presente estudo buscou investigar e comparar as alterações reprodutivas e morfométricas causadas pela contaminação pelo TBT em ratas *Wistar* pré-púberes expostas a duas diferentes doses durante o período pré-puberal. Para isso, foram analisados: consumo hídrico e alimentar, adiposidade, peso uterino e ovariano, ciclo reprodutivo e primeiro estro, além de dosagens hormonais dos esteroides estradiol e progesterona.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas *Wistar* pré-púberes (*Rattus norvegicus albinus*; n=10/grupo), fornecidas pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e mantidas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da mesma instituição, alojadas em gaiolas adequadas com umidade entre 40-60 % (BRASIL, 2013) e luminosidade controladas, sob um ciclo de claro/escuro 12/12h com acesso à dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com as diretrizes do *NIH Guide* para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES, sendo a proposta registrada sob o nº 08/2020.

3.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Ratas com 25 dias pós-natal (*postnatal day* - *PND*) foram expostas aos tratamentos: **(a)** Controle (Grupo **CON**, tratamento via gavagem com solução veículo de etanol a 0,4 %, durante 30 dias); **(b)** TBT 100 (Grupo **TBT 100**, tratamento via gavagem com solução de TBT 100 ng/Kg, Sigma St. Louis, MO, em solução etanólica 0,4 %, durante 30 dias) e **(c)** TBT 1000 (Grupo **TBT 1000**, tratamento via gavagem com solução de TBT 1000 ng/Kg/dia, Sigma St. Louis, MO, em solução etanólica 0,4 %, durante 30

dias). Ainda, ratas com PND 25 também foram utilizadas como controle (Grupo **PND 25**, estas foram eutanasiadas sem exposição a nada, aos 25 dias de vida).

Segundo a EPA-USA (1997) e a WHO (1990), a dose considerada aceitável ou "segura" para humanos expostos ao TBT é em torno de 300 ng/Kg por dia. Para essa conclusão é feita a caracterização do risco, avaliando a toxicidade do composto em relação à exposição à qual o indivíduo está submetido. Neste estudo, a dose selecionada para o tratamento dos animais foi de 100 ng/Kg, sendo três vezes menor do que a considerada segura para a ingestão diária, e 1000 ng/Kg, dose acima do limite preconizado pela EPA-USA (1997) e WHO (1990) mas, ainda assim, muito menor do que as utilizadas em outros estudos (ADEEKO et al., 2003; TSUKAMOTO et al., 2004; WANG et al., 2006. LEE et al., 2012). Além disso, optou-se pelo tratamento subagudo a fim de se obter informações sobre a atividade moduladora do TBT, após exposições repetidas, sobre o sistema reprodutor das ratas, podendo ser encontrado dados importantes para futuros modelos de exposições subcrônicos e crônicos.

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina antes da eutanásia. As doses dos anestésicos foram estipuladas a partir do peso de cada animal, os quais foram pesados no momento da eutanásia. Os cadáveres foram descartados em sacolas plásticas e congeladas para posterior incineração. A eutanásia foi realizada na fase de E, fase esta que a maioria das ratas se encontravam ao fim do tratamento, padronizando desta forma, uma única fase do ciclo estral, evitando o viés da diferença de níveis hormonais (caso eutanasiados em diferentes fases) entre os animais o que poderia implicar na morfologia e outros parâmetros que foram analisados no estudo, e evitando também que os animais ficassem muito tempo sem a exposição contínua ao TBT.

3.8 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E ADIPOSIDADE

O peso corporal dos animais foi medido após 72 horas do tratamento, durante 30 dias. Após o tratamento, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina e decapitados por uma pessoa treinada para este procedimento. Seus órgãos foram retirados, isolados e utilizados para a análise do peso absoluto relativo (razão entre o peso absoluto e o peso corporal). Todo procedimento de pesagem foi realizado pelo mesmo indivíduo em balança analítica previamente calibrada e tarada. Para a avaliação da adiposidade de cada animal, foram retirados os tecidos adiposos brancos (TABs): parametrial (TABPA), perivesical (TABPV), retroperitoneal (TABRP), perirrenal (TABPR) e mesentérico (TABM), os quais foram pesados em balança de alta precisão. Realizou-se a soma do peso de todos os TABs relacionando-a pelo tamanho da tíbia (DE ARAÚJO, J. F. P. et al., 2018).

3.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR

Foi avaliado o consumo de água dos grupos ao longo do tratamento. Para isso, previamente, 700 ml de água filtrada foram disponibilizadas em bebedouros apropriados com escala graduada. A cada 72 horas ao longo do tratamento, o consumo foi avaliado pela quantidade total de água inserida subtraída pela quantidade restante no frasco. Foi avaliado, ainda, o consumo de ração dos animais ao longo do

tratamento. Para tal, foram pesadas 400 gramas de ração em balança digital calibrada e, a cada 72 horas, o consumo alimentar foi avaliado pela quantidade total de ração disponibilizada subtraída pela quantidade de ração restante nas gaiolas.

3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CORPORAL E CAUDAL DOS ANIMAIS

É sabido que alguns químicos são capazes de afetar o crescimento e o desenvolvimento de seres humanos e demais animais (VOS et al., 2000; MAKITA et al., 2005). Para avaliar se a exposição pré-púbere ao TBT é passível de alterar e/ou retardar o processo de crescimento corporal, foram avaliados os comprimentos dos corpos e das caudas dos animais. Assim, após 72 horas da exposição, os animais foram alocados sob superfície plana e medidos, com o auxílio de uma régua, desde a extremidade do nariz até a ponta da cauda. Ainda, o comprimento da cauda também foi avaliado: em superfície plana foi medido o início (ligada à extremidade inferior da coluna vertebral dos animais) até a ponta da cauda.

3.6 ABERTURA VAGINAL E AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL DAS RATAS

Foi avaliada a idade da abertura do canal vaginal para o acompanhamento do início da puberdade dos animais. A partir daí, iniciou-se a análise do ciclo estral para se determinar o primeiro estro dos animais. Para avaliar o ciclo reprodutivo (estral), a secreção vaginal dos animais foi coletada diariamente entre 8:00 e 9:00 h, sendo obtida após lavado intravaginal de 15 μ L de solução salina. O ciclo reprodutivo foi monitorado por análise do esfregaço vaginal diário após a abertura vaginal das ratas (DA COSTA et al., 2019).

As fases do ciclo foram determinadas por citologia (Figura 4) e pela consistência do muco vaginal, e de acordo com essas características as fases foram classificadas como: P, E e M-D (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). A frequência total de cada fase observada neste período, para cada animal, foi utilizada para a duração das fases (em dias), bem como a duração total do ciclo estral. Todas as quantificações foram realizadas por um único observador (PODRATZ et al., 2015).

3.7 DOSAGEM HORMONAL DE ESTRADIOL E PROGESTERONA

Amostras de soro foram obtidas para determinar os níveis de estrogênio e progesterona. A dosagem hormonal dos esteroides ovarianos foi realizada usando os kits ELISA (EIA-2693 e EIA-1561, respectivamente, DRG Instruments GmbH, Alemanha) em um Leitor de Microplacas de Absorbância ELx808™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA (SENA et al., 2017)). O limite de detecção para estrogênio era de 9.714 pg/mL. O coeficiente de variação inter-ensaio para cada ensaio foi entre 6,7 % e 9,4 %, e o coeficiente de variação entre ensaios para cada ensaio foi entre 2,7 % e 6,8 %. Já o limite de detecção para progesterona era de 0.045 ng/mL. Ainda, o coeficiente de variação inter-ensaio para cada ensaio foi entre 4,3 % e 10 %, e o coeficiente de variação entre ensaios para cada ensaio foi entre 5,4 % e 7,0 %.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram expressos como a média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M). O teste de normalidade usado para avaliar os dados foi o D'Agostino e Pearson omnibus. Comparações entre grupos foram realizadas usando ANOVA de uma e duas vias para dados Gausianos (teste de comparação múltipla Tukey). Para dados não Gausianos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Dunn. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A avaliação foi feita através do Programa GraphPad Prism® versão 8.

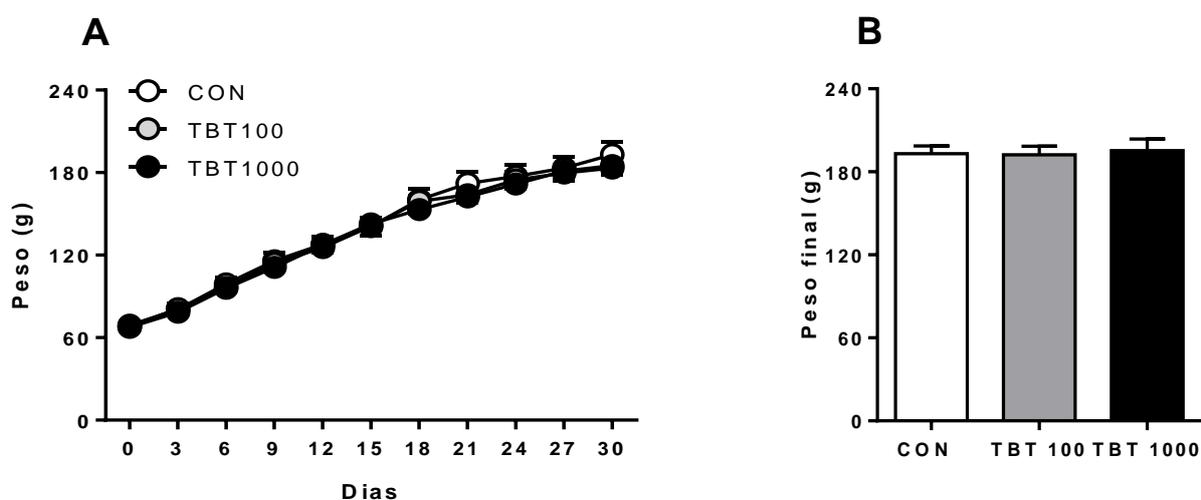
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

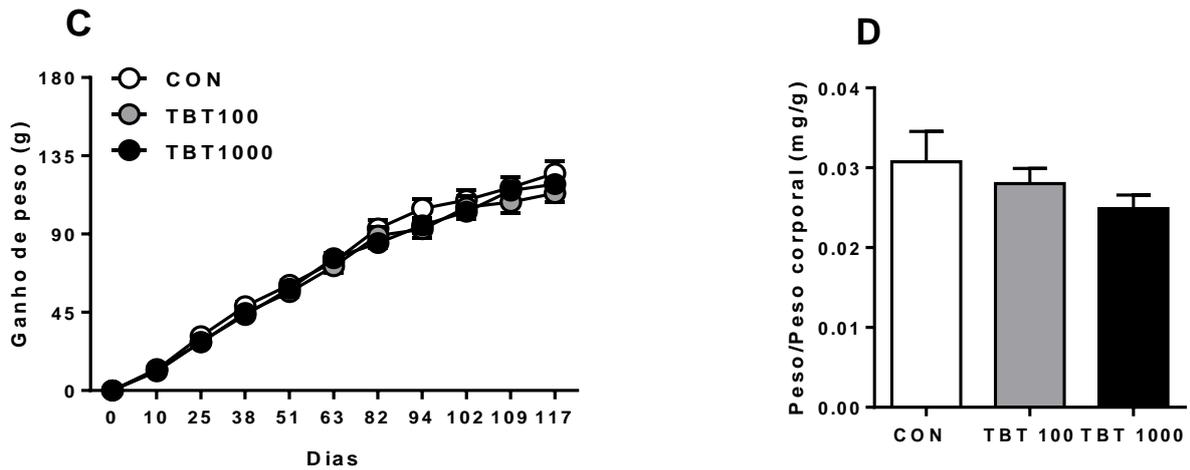
4.1 RESULTADOS

4.1.1 Avaliação do peso corporal absoluto, ganho de peso e adiposidade

Em relação ao peso absoluto, não foram notadas diferenças entre os grupos ao final do tratamento (Fig. 5A e 5B, $p > 0,05$). Em consonância, na análise de ganho de peso acumulado também não foram encontradas diferenças entre os grupos (Fig. 5C, $p > 0,05$). Como relatado anteriormente, o TBT foi capaz de induzir a obesidade em modelos experimentais prévios, dessa forma, o presente estudo também avaliou o perfil adipogênico dos animais. Em relação a este parâmetro, não foi notada diferença nos resultados obtidos entre os grupos (Fig. 5C e 5D, $p > 0,05$).

Figura 5 – Peso corporal, ganho de peso e adiposidade de ratas.



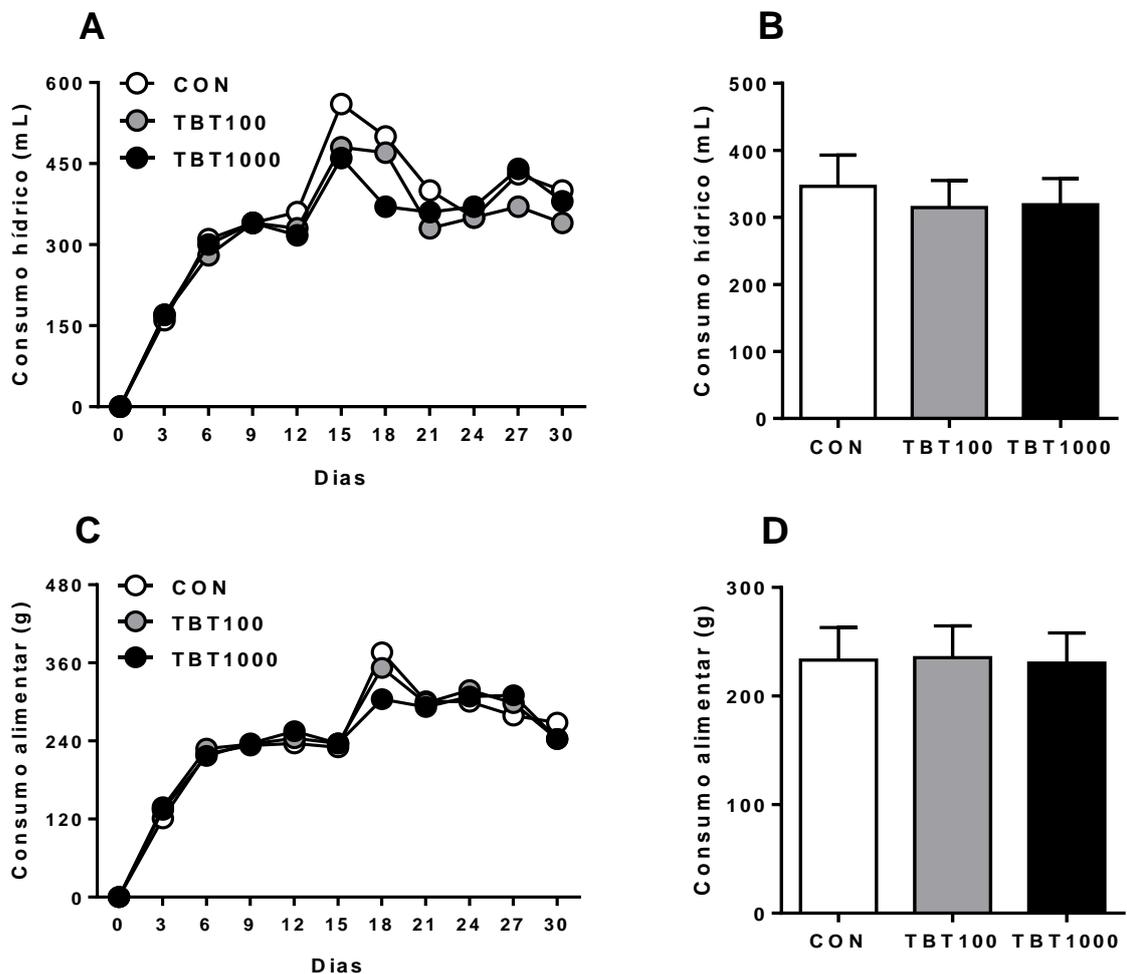


Legenda: Comparação do (A) peso absoluto, (B) peso ao fim do tratamento, (C) ganho de peso acumulado e (D) adiposidade obtida com a soma dos tecidos adiposos TABPA, TABM, TABRA, TABRP e TABPR entre os grupos. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M (n=10).

4.1.2 Avaliação do consumo hídrico e alimentar das ratas

Não foram evidenciadas diferenças na ingestão hídrica (Fig. 6A e 6B, $p > 0,05$) e alimentar (Fig. 6C e 6D, $p > 0,05$) das ratas entre todos os grupos.

Figura 6 – Consumo hídrico e alimentar de ratas.

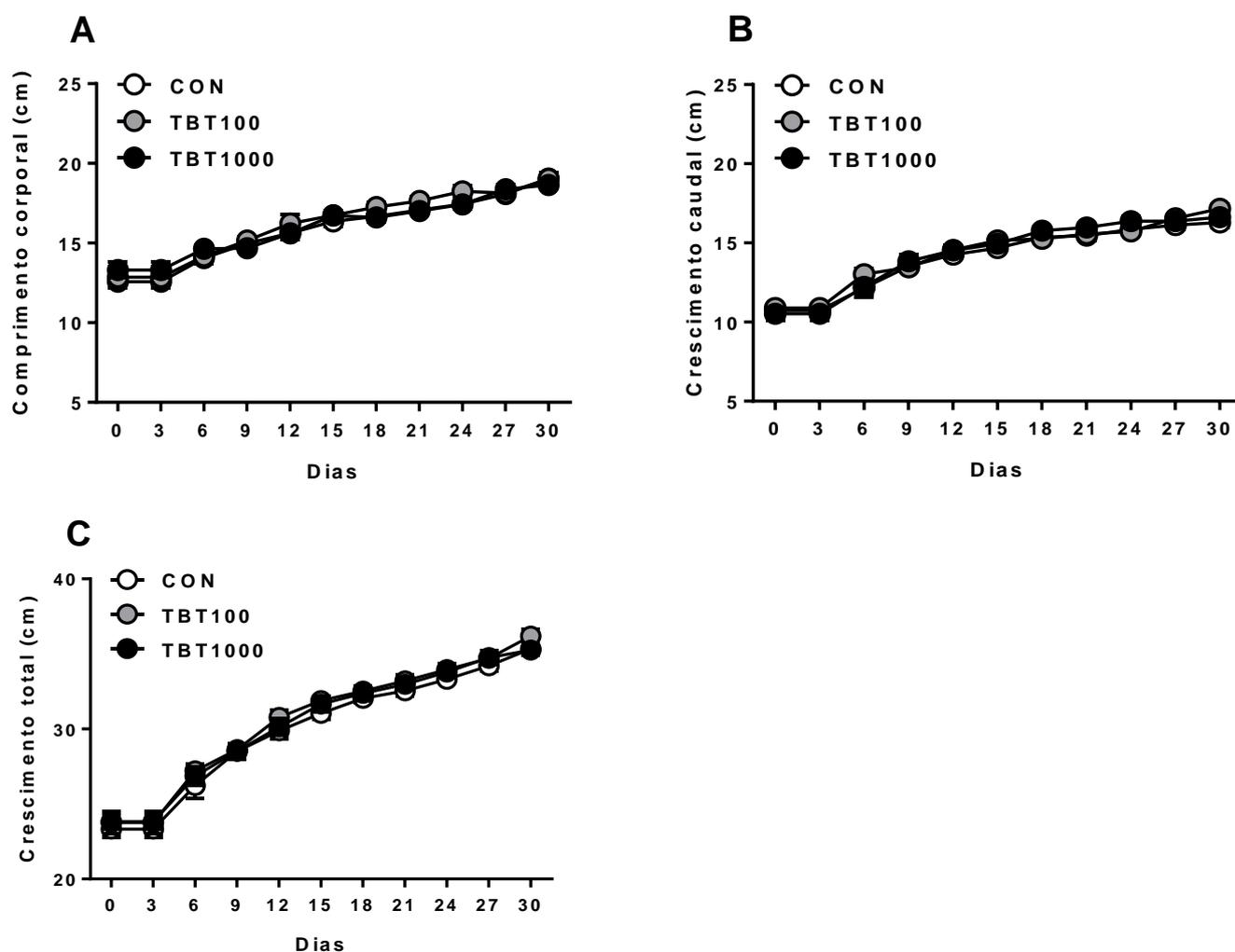


Legenda: (A) Comparação do consumo hídrico, ao longo do tratamento. (B) Média da ingestão hídrica ao final do tratamento. (C) Comparação do consumo alimentar, ao longo do tratamento. (D) Média da ingestão alimentar ao final do tratamento. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M (n=10).

4.1.3 Avaliação do crescimento corporal, da cauda e crescimento total

A fim de compreender se a exposição ao TBT era passível de afetar o crescimento corporal dos animais, avaliou-se o crescimento corporal (apenas o corpo, sem considerar a região caudal), da cauda e o crescimento total (comprimento crânio-caudal). Isto posto, os resultados não sugeriram diferença no crescimento corporal dos animais entre os grupos (Fig. 7A, $p>0,05$). Também não foram notadas diferenças significativas no crescimento das caudas dos animais (Fig. 7B, $p>0,05$) e no crescimento total entre os grupos (Fig. 7C, $p>0,05$).

Figura 7 – Crescimento corporal, caudal e crescimento total de ratas.

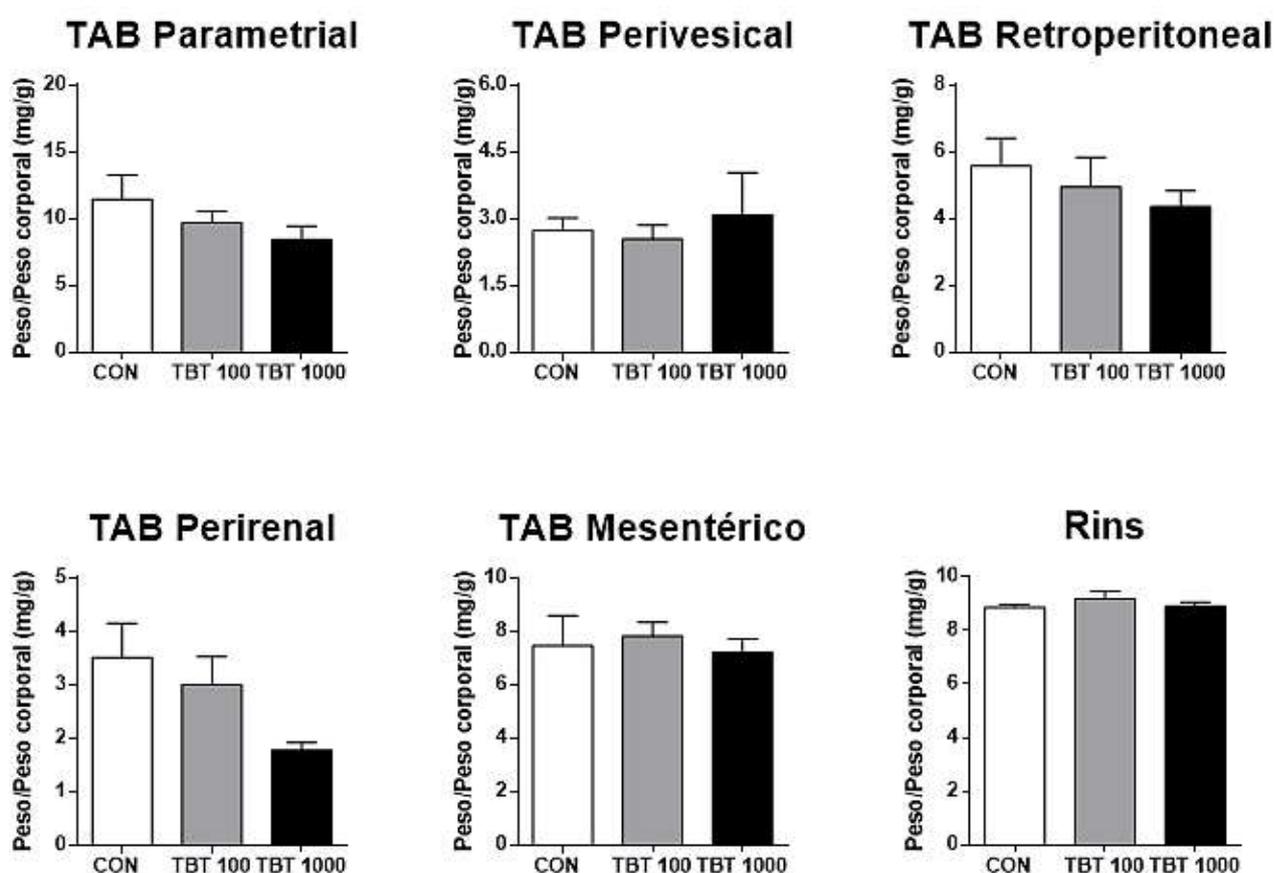


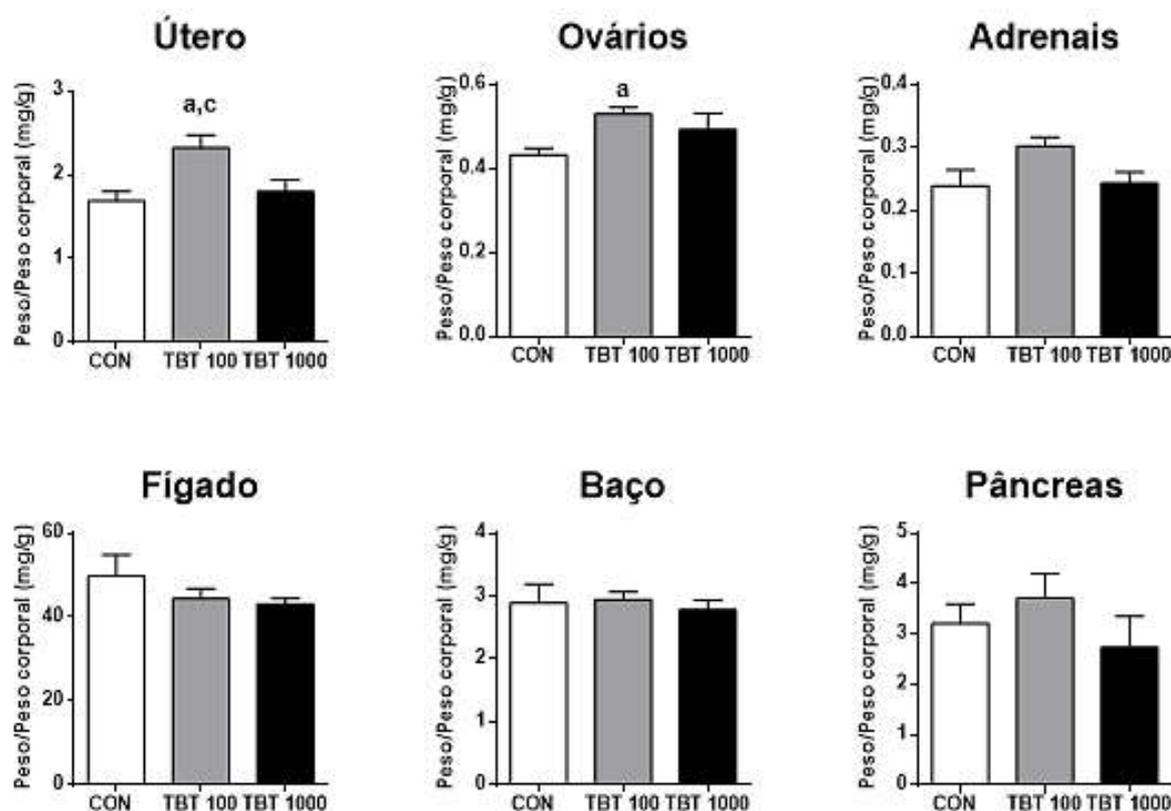
Legenda: (A) Análise do crescimento corporal dos animais durante os 30 dias de tratamento. (B) Análise do crescimento das caudas dos animais durante os 30 dias de tratamento. (C) Comparação do crescimento total (crânio-cauda) entre os grupos durante o tratamento. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M (n=10).

4.1.4 Avaliação do peso de órgãos dos animais

Outro parâmetro analisado neste estudo foi o peso de órgãos dos animais. Isto posto, o peso do útero de animais TBT100 mostrou-se maior em relação aos animais dos grupos CON e TBT1000 (Fig. 8, $p=0,0178$ e $p=0,0457$, respectivamente). Da mesma forma, foi notada diferença entre o peso do ovário de animais do grupo TBT100 quando comparado ao grupo CON (Fig. 8, $p=0,0489$). Não houve diferença significativa no peso dos órgãos: TABPA, TABPV, TABRP, TABPR, TABM, rins, adrenais, fígado, baço e pâncreas (Fig. 8A, $p>0,005$).

Figura 8 – Peso de diferentes órgãos de ratas.





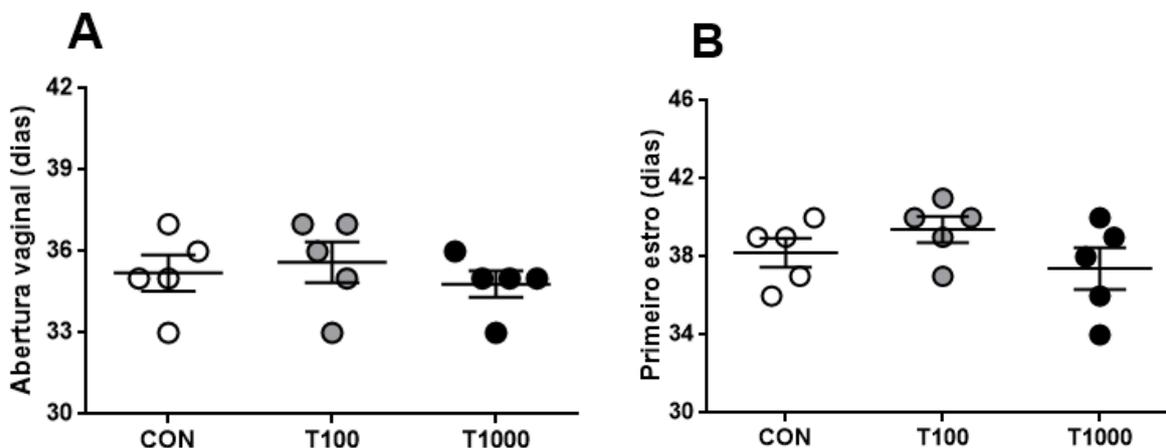
Legenda: (A) Comparação do peso de diferentes órgãos entre os grupos CON, TBT100 e TBT1000. a= $p < 0,05$ comparado ao grupo CON. c= $p < 0,05$ comparado ao grupo TBT1000. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M (n=10).

Como relatado anteriormente, um dos principais eixos do estudo é analisar as complicações causadas pela exposição ao TBT sobre o trato reprodutivo de ratas. Dessa forma, para além dos aspectos morfométricos, foram analisados o tempo de abertura vaginal e primeiro estro de ratas, além do ciclo reprodutivo (estral) e os níveis dos hormônios esteroides E2 e P4.

4.1.2 Avaliação do tempo de abertura vaginal e primeiro estro

Para o acompanhamento do início da puberdade dos animais, foi avaliada a idade da abertura do canal vaginal. Além disso, avaliou-se também o período até o primeiro estro das ratas. Quanto a estas variáveis, não foram notadas diferenças significativas entre os grupos (Fig. 9A e 9B, $p > 0,05$).

Figura 9 – Idade da abertura vaginal e 1º estro das ratas.

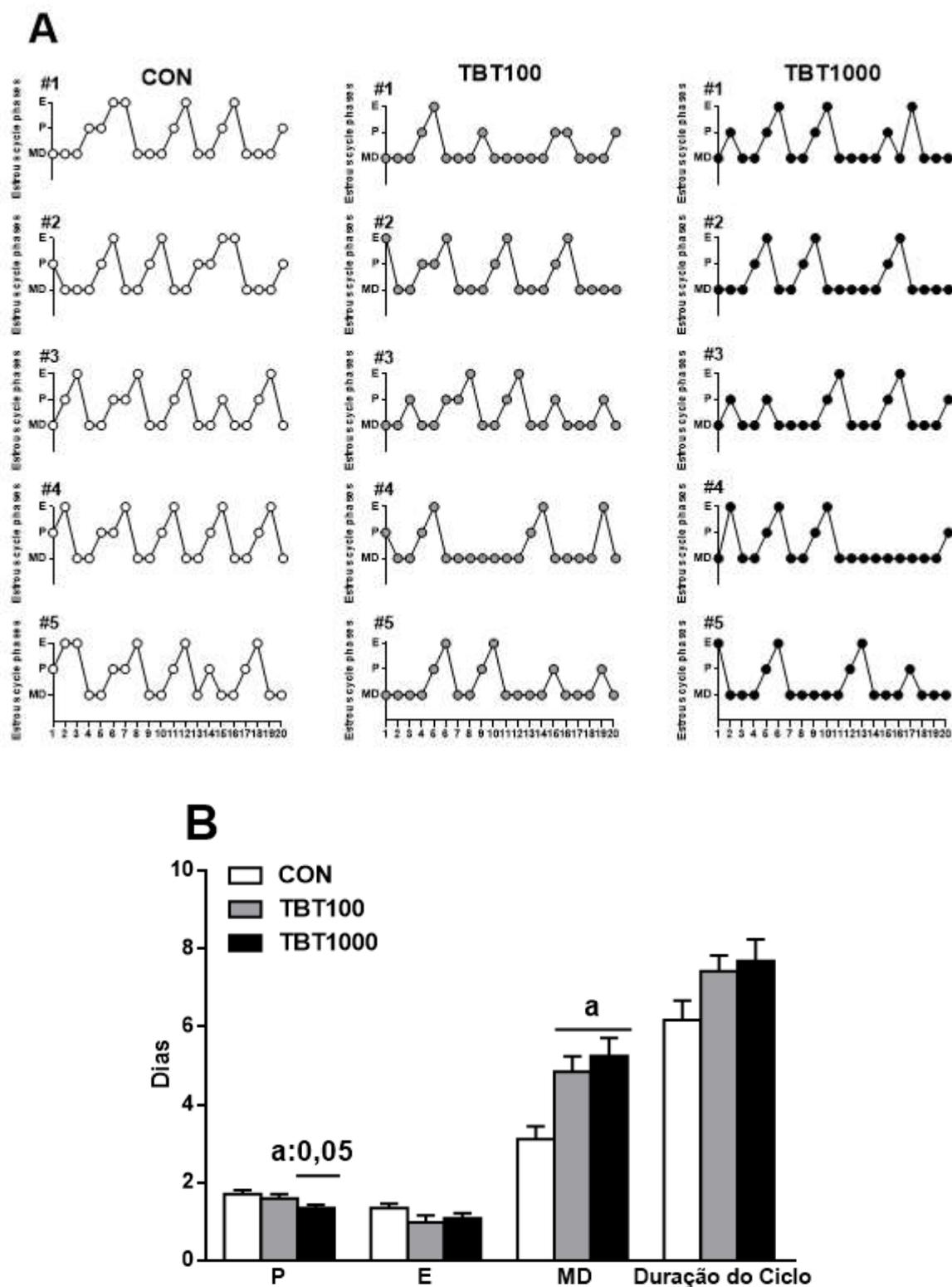


Legenda: Idade da (A) abertura vaginal e (B) primeiro estro dos animais, respectivamente, dos grupos CON, TBT100 e TBT1000. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=10).

4.1.3 Avaliação do ciclo reprodutivo

Foi realizada a coleta diária pela manhã e análise do ciclo estral das ratas para avaliação inicial da função reprodutiva. Ratas expostas ao TBT ao longo de 30 dias apresentaram anormalidades no padrão do ciclo estral, quando comparadas ao grupo controle (Fig. 10A). Foi observado prolongamento na fase de MD nos animais dos grupos TBT100 e TBT1000 comparados ao grupo CON (Fig.10B, $p=0.02$ e $p=0.007$, respectivamente). Não obstante, notou-se uma tendência do aumento da duração da fase de P no grupo TBT1000 comparado ao grupo controle (Fig. 10B, $p=0,05$). Diferenças não foram notadas na fase E, nem na duração do ciclo estral dos grupos (Fig. 10B, $p>0,05$).

Figura 10 – Avaliação do ciclo estral de ratas.

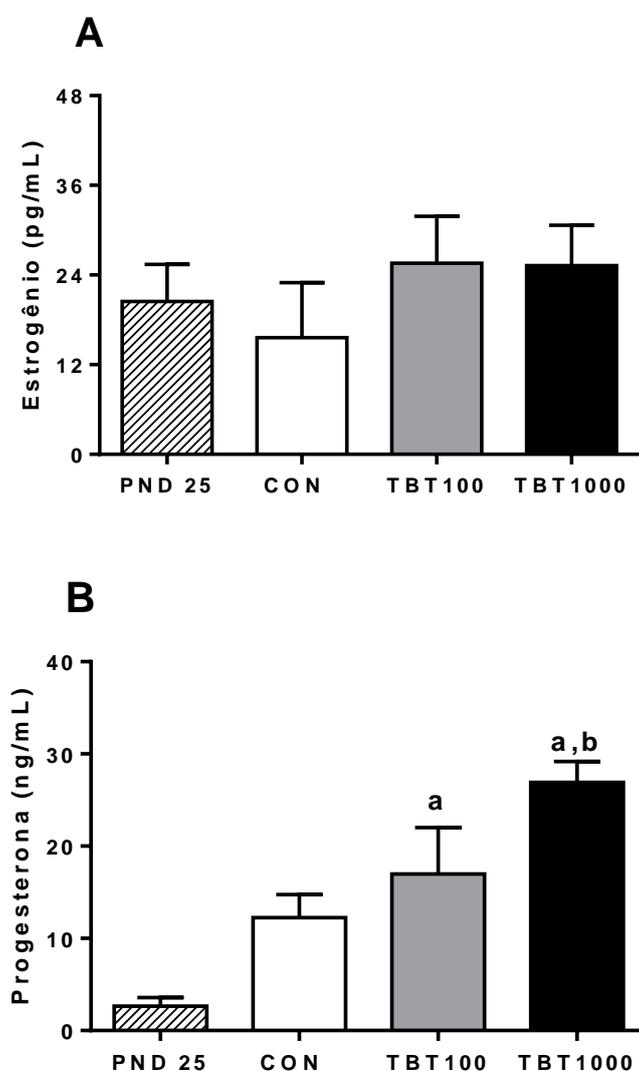


Legenda: (A) Ciclo individual ao longo dos 30 dias de exposição ao veículo e ao TBT. (B) Duração das fases do ciclo estral e sua duração total. Valores expressos como média \pm EPM ($n=5$). $a= p<0,05$ e/ou $p=0,05$ comparado ao grupo CON.

4.1.4 Avaliação dos níveis séricos dos hormônios esteroides estrogênio e progesterona

A partir do soro coletado, foi possível realizar a dosagem de hormônios esteroides, podendo assim, caracterizar as alterações causadas pelo TBT nos níveis hormonais de estrogênio e progesterona nos animais. Após exposição ao TBT, não foi notada diferença na dosagem de estrogênio entre os grupos (Fig. 7A, $p > 0,05$, $n = 5$). Em contrapartida, a dosagem de progesterona mostrou um aumento expressivo em ratas TBT100 em comparação ao grupo PND25 (Fig. 7B, $p = 0,0283$, $n = 5$). Em animais do grupo TBT1000, foi observado aumento nos níveis de progesterona em comparação ao grupos PND25 e controle (Fig. 7B, $p = 0,0385$, $n = 5$).

Figura 7 – Dosagem dos hormônios esteroides estrogênio e progesterona



Legenda: (A) Estrogênio. (B) Progesterona. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M ($n = 5$). $a = p < 0,05$ comparado ao grupo PND25. $b = p < 0,05$ comparado com o grupo CON.

4.2 DISCUSSÃO

Embora o uso de TBT em tintas anti-incrustantes esteja banido em diversos países, a exposição a esse químico ainda é uma realidade. As concentrações cada vez maiores destes produtos químicos em ambientes aquáticos, agrotóxicos, plásticos e outros produtos, impactaram não somente o espaço ecológico, mas se tornaram uma ameaça à saúde humana e de outros seres-vivos. No presente trabalho, um modelo pré-púbere de exposição subaguda ao TBT foi utilizado para analisar os efeitos tóxicos causados pela contaminação a esse poluente, sobretudo em parâmetros morfométricos e reprodutivos em ratas *Wistar*. Em resumo, os animais expostos ao TBT ao longo de trinta dias apresentaram diferenças no peso dos ovários e útero, prolongamento na fase de MD nos animais e tendência ao aumento da fase de P, além de diferenças nos níveis hormonais de P4.

Estudos prévios relatam a capacidade do TBT em induzir a obesidade, sendo, portanto, designado como um composto químico “obesogênico”, o qual é capaz de aumentar o risco de obesidade e complicações metabólicas por ativação anormal dos heterodímeros *retinoide x receptor* (RXR) e PPAR γ e por modulação anormal de outras vias de sinalização (DE ARAÚJO et al., 2018b; FREITAS-LIMA et al., 2018; GRÜN et al., 2006). O aumento na deposição adiposa é uma característica comum após a exposição ao TBT em diferentes modelos (BERTULOSO et al., 2015; GRÜN et al., 2006; PENZA et al., 2011). Por exemplo, após a exposição ao TBT na concentração de 100 ng/Kg/dia (por 15 dias), ratas tiveram aumento da massa adiposa (COUTINHO et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018b; MERLO et al., 2016).

Contudo, os resultados encontrados neste trabalho não evidenciam diferença estatisticamente significativa no peso absoluto, peso final e na massa adiposa de animais tratados com veículo e TBT. Pode-se cogitar, no entanto, que a idade e maturidade sexual dos animais utilizados neste estudo possam ter sido fatores determinantes para a diferença dos pesos dos animais em comparação a estudos prévios. Por exemplo, Coutinho et al (2016) e Sena et al (2017) demonstraram que ratas tratadas com 500 ng/Kg e 100 ng/Kg de TBT, respectivamente, apresentaram maior ganho de peso corporal em comparação ao grupo controle. Semelhantemente, Merlo e outros (2016) demonstraram que ratas expostas a 100 ng/Kg de TBT durante 15 dias também apresentaram aumento expressivo no peso corporal. Porém, estes estudos demonstram a nocividade do TBT apenas em animais adultos (12 semanas de vida) e com maturidade sexual já atingida. Infelizmente, modelos de exposição pré-púberes aos OTs, bem como a outros DE, são inusuais na literatura, sendo os poucos estudos realizados em animais adultos, inviabilizando o confronto entre os resultados.

Sem embargo, um estudo realizado por He, Zhang e Chen (2014) demonstrou que ratas fêmeas e machos adultos da linhagem Sprague-Dawley, tratados com 0,5 μ g/Kg de TBT durante 54 dias, apresentaram aumentos significativos no colesterol total hepático e na concentração de triglicérides. Curiosamente, os aumentos no peso corporal e na massa adiposa só foram encontrados em ratos machos tratados com TBT. No presente estudo, apenas ratas fêmeas pré-púberes foram utilizadas para avaliar a capacidade obesogênica do TBT, sendo assim, futuros estudos usando ratos machos pré-púberes como modelo de exposição podem ser considerados para a comparação destes dados, e avaliar se o sexo, no período da pré-puberdade, é determinante na variação do peso corporal em animais expostos ao TBT.

Cabe ainda relatar que outros trabalhos mostraram que os animais expostos ao TBT também não ganharam peso suficiente (PODRATZ et al., 2012) para evidenciar

diferença entre os grupos, sendo reportado, no entanto, o aumento da adiposidade corporal quando comparados aos controles, ou seja, não impreterivelmente será observado o aumento na massa total corporal, mas tende a ser observado aumento da massa adiposa (GRÜN et al., 2006; PENZA et al., 2011).

Neste estudo, animais tratados com doses de 100 ng/Kg de TBT apresentaram maior peso ovariano e uterino. Semelhantemente, De Araújo et al (2018) demonstraram que ratas adultas expostas a 100 ng/Kg de TBT durante 30 dias, também apresentaram aumento no peso dos ovários e do útero sem causar manutenção do peso de outros órgãos. De acordo com a EPA-USA (1997), essas alterações no peso ovariano e uterino podem estar associadas à presença de cistos, depleções de folículos ovarianos ou ainda, modificações na modulação do hipotálamo e/ou hipófise. Estes achados sugerem, assim como em trabalhos anteriores, que a exposição ao TBT dose-dependente é capaz de influenciar o peso de órgãos reprodutivos (WESTER et al., 1990; GROTE et al., 2009; LEE et al., 2012; SENA et al., 2017).

Para além do exposto, este estudo buscou identificar se o TBT é capaz de alterar o padrão normal de crescimento corporal. No entanto, os resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos. É importante ressaltar que a influência do TBT sobre o crescimento corporal de animais ainda não é totalmente elucidada, além disso, são poucos os estudos que avaliam a toxicidade dos OTs sobre a estatura corporal em modelos roedores, sendo a grande parcela desses trabalhos realizados com animais puberais ou modelos diferentes que o utilizado neste estudo. Por exemplo, Makita et al (2005) relataram que a exposição simultânea de TBT e diclorodifenildicloroetileno (DDE) promoveu crescimento de ratos puberais machos, enquanto o próprio DDE não afetou o crescimento, mas inibiu o aumento do crescimento pelo TBT, indicando que alguns contaminantes ambientais têm ações opostas ou antagônicas como o TBT e DDE.

Diferentemente, em modelo experimental de misídeos juvenis, a exposição aguda (96 horas) a doses de 5 e 10 ng/L de TBT foi capaz de afetar o crescimento corporal dos mesmos, de forma que esses apresentaram comprimentos menores, relacionando estes fatos à redução significativa na taxa de crescimento ao interferir nas concentrações do hormônio ecdisterona (KIM et al., 2018). Não obstante, o metabolismo energético está fortemente associado à regulação hormonal em espécies de crustáceos (WEBSTER et al., 2012). Dessa forma, o potencial mecanismo de inibição do crescimento desencadeado pelo TBT pode ser explicado por estudos anteriores partir da flutuação do balanço energético e dos níveis hormonais desregulados observados em misídeos (LEBLANC, 2007; HIRANO et al., 2009).

No que diz respeito à relação entre as complicações reprodutivas de ratas expostas ao TBT, como o comprometimento do ciclo reprodutivo, os resultados encontrados neste trabalho encontram-se em harmonia com a literatura. Foi identificada uma tendência de aumento no estágio P e um aumento significativo na fase de MD, sem provocar um aumento geral na duração total do ciclo. Estudos prévios reportaram resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho, relacionando este acontecimento com a redução dos níveis basais e de pico de LH, além da baixa expressão de mRNA do *GnRH* hipotalâmico, possivelmente por uma modulação anormal do hormônio GnRH e prejuízos na função gonadotrófica (SENA et al., 2017; UENOYAMA et al., 2015).

É sabido que o TBT possui papel fundamental no funcionamento irregular dos órgãos reprodutivos, como os ovários (KISHTA et al., 2007; SI et al., 2012; LEE et al., 2012).

Estes são responsáveis pela produção de gametas e hormônios esteroides, como E2 e P4, ambos afetados pela exposição ao TBT (SAITOH et al., 2001; KISHTA et al., 2007). Neste trabalho, níveis aumentados de P4 foram identificados em animais expostos ao TBT, em ambas as doses, enquanto níveis séricos de E2 não apontaram diferenças significativas. Sabe-se que, no ciclo de ratas, o pico de P4 ocorre no final da fase do P e início do E, retornando a valores basais durante a MD (GOLDMAN et al., 2007). Tal evento poderia sugerir que a ação da P4 se estenda na fase MD, mantendo o nível de células cornificadas elevadas após o tratamento com TBT.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como demonstrado, a exposição subaguda ao TBT foi responsável por promover alterações morfofisiológicas no trato reprodutivo de ratas pré-púberes. Esta modulação levou a importantes eventos deletérios, como desbalanço nos níveis do hormônio esteroide sexual P4, alteração no peso dos ovários e útero, e padrão irregular no ciclo reprodutivo dos animais, com aumento na fase de MD e tendência ao aumento na fase de P. Portanto, este trabalho sustenta a ideia do potencial toxicológico do TBT na gênese de anormalidades reprodutivas, onde é demonstrado mais uma vez sua influência sobre este sistema.

É importante, no entanto, que outros protocolos experimentais sejam realizados para uma melhor compreensão dos efeitos nocivos do TBT sobre o trato reprodutivo feminino de animais pré-púberes. Isto inclui a realização de novas dosagens hormonais para hormônios proteicos (GnRH, LH, FSH) e análises histológicas para avaliações histopatológicas (Hematoxilina e Eosina) e de demais processos fisiopatológicos, como inflamação (Alcian Blue) e remodelamento tecidual (Picro-sirius Red) nos órgãos reprodutivos. Além disso, a realização de testes bioquímicos para a avaliação de marcadores de estresse oxidativo, inflamação, adiposidade e carcinogênese, e protocolos para a análise de expressão proteica por meio da técnica de *Western Blot*, corroborarão no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares pelos quais o TBT é capaz de modular negativamente e causar perturbações no sistema reprodutor feminino.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 6, p. 346–353, 2011.
- ALZIEU, C. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & Coastal Management**, v. 40, n. 1, p. 23–36, 1998.
- ANDRADE, M. N. et al. The environmental contaminant tributyltin leads to abnormalities in different levels of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in female rats. **Environ Pollut**, v. 241, p. 636-645, 2018.
- ANDRES, A. C.; STRANGE, R. Apoptosis in the Estrous and Menstrual Cycles. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, n. 2, p. 221–228, 1999.
- ASIMAKOPOULOS, B. Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis: It is Time for Revision. **Human Genetics & Embryology**, v. 02, n. 01, p. 1, 2012.
- BERTULOSO, B. D. et al. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**, v. 235, n. 1, p. 45–59, 2015.
- BLABER, S. J. M. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). **Journal of Molluscan Studies**, v. 39, n. 2–3, p. 231–233, dez. 1970.
- BRASIL. RN no15/2013 - Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. **Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal**, Brasil, 2013. p. 20.
- BRISKEN, C.; ATACA, D. Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 4, n. 3, p. 181–195, 2015.
- BRYAN, G. W. et al. The Decline of the Gastropod *Nucella Lapillus* Around South West England: Evidence for the Effect of Tributyltin from Antifouling Paints. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 66, n. 3, p. 611, 11 ago. 1986.
- BUZELLI, G. M.; CUNHA-SANTINO, M. B. Análise e diagnóstico da qualidade da água e estado trófico do reservatório de Barra Bonita (SP). **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 8, n.1, p. 186-205, 2013. Disponível em <<https://www.scielo.br/pdf/ambiagua/v8n1/14.pdf>>. Acesso em 18 de Março de 2021.
- CANESSO, M C. C. Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas em animais isentos de microbiota comensal. 2014. 102f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

CARTON, J. **Oxford Handbook of Clinical Pathology**. Oxford University Press, v. 1, 2012.

CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual Review of Physiology**, v. 73, p. 135-162. 2011.

CASTRO, Í. B.; RODRIGUES-QUEIROZ, L.; ROCHA-BARREIRA, C. D. A.; Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha - uma revisão. **Arq. Ciên. Mar.** Fortaleza, v. 40, n. 1, pág. 96-112, abr. 2007. Disponível em <http://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/3181/acm_2007_40_1_13.pdf?sequence=1>. Acesso em 29 de Março de 2021.

CESBRA QUÍMICA. Cloreto de Tri-butil Estanho (TBTCl). 2021. Disponível em: <<https://2122-br.all.biz/o-cloreto-de-tri-butil-estanho-tbtcl-cesbra-g3678>>. Acesso em: 24 de Março de 2021.

CHAMARD-JOVENIN, C. et al. Low-dose alkylphenol exposure promotes mammary epithelium alterations and transgenerational developmental defects, but does not enhance tumorigenic behavior of breast cancer cells. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2017.

CHAMORRO-GARCÍA, R. et al. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 3, p. 359–366, 2013. a.

CHESNEL, A. et al. Mammary epithelial cell phenotype disruption in vitro and in vivo through ERalpha36 overexpression. **PLoS ONE**, p. 1–18, 2017.

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. 1, p. 1–8, 2013.

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

COSTA, M. 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, 2017.

COUSSENS, L. M.; POLLARD, J. W. Leukocytes in Mammary Development and Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 3, p. a003285–a003285, 2011.

COUTINHO, J. V. S. et al. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. **Toxicology Letters**, v. 260, p. 52–69, 2016.

COWIN, P.; WYSOLMERSKI, J. Molecular Mechanisms Guiding Embryonic Mammary Gland Development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 6, p. a003251–a003251, 2010.

DA COSTA, C. S. et al. The tributyltin leads to obesogenic mammary gland abnormalities in adult female rats. **Toxicology Letters**. v. 307, n. 1, 59–71, 2019.

DAVIS, B.; FENTON, S. **Mammary Gland**. In: **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. 3. ed. Boston. p. 2665–2694, 2013. b.

DAVIS, B.; FENTON, S. **Toxicologic Pathology - Mammary Gland**. 3. ed. Porto Alegre: Elsevier, 2013. a.

DE ARAÚJO, J. F. P. et al. **Organotin exposure and vertebrate reproduction: A review**, Frontiers Media SA, 2018. a.

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

DE ASSIS, S. et al. Changes in Mammary Gland Morphology and Breast Cancer Risk in Rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 21, n. 44, p. 2–4, 2010.

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 COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2012, 2012.

DELGADO FILHO, V. S. et al. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 958–965, 2011.

EDDIE, S. L. et al. Microphysiological modeling of the reproductive tract: A fertile endeavor. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 9, p. 1192–1202, 2014.

EKLUND, B. et al. Biological and chemical characterization of harbour sediments from the Stockholm area. **Journal of Soils and Sediments**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 127–141, 2009.

EKLUND, B.; ELFSTROM, M.; BORG, H. Tributyltin Originates from Pleasure Boats in Sweden in Spite of Firm Restrictions. **Open Environmental Sciences**, v. 2, n. 1, p. 124–132, 2008.

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**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 463–476, abr. 2002. Disponível em <<https://www.scielo.br/pdf/csp/v18n2/8275.pdf>>. Acesso realizado em 01 de Abril de 2021.

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

GROTE, K. et al. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p.145–158, 2004.

HALLAS, L. E.; MEANS, J. C.; COONEY, J. J. Methylation of Tin by Estuarine Microorganisms. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1505–1507, 1982.

HANNON, P. R.; FLAWS, J. A. The effects of phthalates on the ovary. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. FEB, p. 1–19, 2015.

HEINDEL, J. J. et al. **Endocrine Disrupting Chemicals - 2012**. Geneva: World Health Organization, 2012.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Signaling pathways in mammary gland development. **Developmental Cell**, v. 1, n. 1534–5807 (Print), p. 467–475, 2001.

HINDMAN, A. R. et al. Varying susceptibility of the female mammary gland to in utero windows of bpa exposure. **Endocrinology**, v. 158, n. 10, p. 3435–3447, 2017.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment: a review. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 5, p. 719–743, 2001.

INMAN, J. L. et al. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development**, v. 142, n. 6, p. 1028–1042, 2015.

JORDAO, R. et al. Obesogens beyond vertebrates: lipid perturbation by tributyltin in the crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, 813–819, 2015.

KHETAN, S. K. Environmental Endocrine Disruptors. In: **Endocrine Disruptors in the Environment**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 1 - 26.

KHOKHA, R.; WERB, Z. Mammary Gland Reprogramming: Metalloproteinases Couple Form with Function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a004333–a004333, 2011.

KOBAYASHI, A.; BEHRINGER, R. R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 12, p. 969–980, 2003.

KOTAKE, Y. Molecular Mechanisms of Environmental Organotin Toxicity in Mammals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 11, p. 1892–1897, 2012.

KUMAR, V. et al. **Robbins basic pathology**: Elsevier/Saunders, 2013.

LIMA, L. C. F. et al. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 96, 2012.

LIMAVERDE, A. M. et al. *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. **Marine Environmental Research**, v. 64, n. 3, p. 384–398, 2007.

LITHGOW, D. Chronic Inflammation and Breast Pathology: A Theoretical Model. **Biological Research For Nursing**, v. 7, n. 2, p. 118–129, 2005.

LUND, L. R.; et al. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. **Development (Cambridge, England)**, v. 122, n. 1, p. 181–93, 1996.

LYSSIMACHOU, A. et al. The mammalian “obesogen” tributyltin targets hepatic triglyceride accumulation and the transcriptional regulation of lipid metabolism in the liver and brain of zebrafish. **PLoS One**, v. 10, n. e0143911, 2015.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p. 533–557, 2012.

MACON, M. B.; FENTON, S. E. Endocrine Disruptors and the Breast: Early Life Effects and Later Life Disease. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, n. 1, p. 43-61, 2013.

MACON, M. B.; FENTON, S. E. Endocrine Disruptors and the Breast: Early Life Effects and Later Life Disease. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, n. 1, p. 43-61, 2013.

MANSERVISI, F. et al. Effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on reproduction and mammary gland development in female Sprague-Dawley rats. **Reproductive Toxicology**, v. 54, n. 18, p. 110–119, 2015.

MERLO, E. et al. The environmental pollutant tributyltin chloride disrupts the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at different levels in female rats. **Endocrinology**, v. 157, n. 8, p. 2978–2995, 2016.

NATH, M. Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: A review. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 598–612, 2008.

NEED, E. F. et al. Hormonal regulation of the immune microenvironment in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 19, n. 2, p. 229–239, 2014.

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

OMURA, M. et al. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 64, p. 224–232, 2001.

- OSBORNE, G.; RUDEL, R.; SCHWARZMAN, M. Evaluating chemical effects on mammary gland development: A critical need in disease prevention. **Reproductive Toxicology**, v. 54, p. 148–155, 2015.
- PAINE, I. S.; LEWIS, M. T. The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 22, n. 2, p. 93–108, 2017.
- PEREIRA-FERNANDES, A. et al. Unraveling the mode of action of an obesogen: mechanistic analysis of the model obesogen tributyltin in the 3T3-L1 cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 370, n. 1, 52–64. 2013.
- PLANTE, I.; STEWART, M. K. G.; LAIRD, D. W. Evaluation of Mammary Gland Development and Function in Mouse Models. **Journal of Visualized Experiments**, n. 53, p. 2–6, 2011.
- PODRATZ, P. L. et al. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 75, n. 16–17, p. 1035–1046, 2012.
- 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, 2013.
- ROSENBERG, E. Organotin compounds in foods. In: **Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods**. Elsevier, 2013. p. 430–475.
- SAPOUCKEY, S. A. et al. Prenatal Exposure to Unconventional Oil and Gas Operation Chemical Mixtures Altered Mammary Gland Development in Adult Female Mice. **Endocrinology**, v. 159, n. 3, p. 1277–1289, 2018.
- SENA, G. C. et al. Environmental obesogen tributyltin chloride leads to abnormal hypothalamic-pituitary-gonadal axis function by disruption in kisspeptin/leptin signaling in female rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 319, p. 22–38, 2017.
- SONAK, S. et al. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 1, p. 96–108, fev. 2009.
- SOUSA, A. C. A. et al. History on organotin compounds, from snails to humans. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 117–137, mar. 2014.
- STRANGE, R. et al. Proliferation and apoptosis in mammary epithelium during the rat oestrous cycle. **Acta Physiologica**, v. 190, n. 2, p. 137–149, 2007.
- VOS, J. G. et al. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000.

WADA, O. et al. Recent progress in the study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. **Sangyo Igaku**, v. 24, p. 24-54, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf>. Acesso em 27 de Junho de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tributyltin compounds** (WHO, Ed.) **Environmental Health Criteria**. Geneva: WHO, 1990.

YOUNG, A. N. et al. Microphysiologic systems in female reproductive biology. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 17, p. 1690–1700, 2017.

YU, Q. C.; VERHEYEN, E. M.; ZENG, Y. A. Mammary development and breast cancer: A Wnt perspective. **Cancers**, v. 8, n. 7, p. 1–26, 2016.

ASIMAKOPOULOS, B. Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis: It is Time for Revision. **Human Genetics & Embryology**, v. 02, n. 01, p. 1, 2012.

MOORE, A. M.; PRESCOTT, M.; CAMPBELL, R. E. Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic ovarian syndrome. **Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 796–806, 2013.

MOORE, A. M.; PRESCOTT, M.; CAMPBELL, R. E. Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic ovarian syndrome. **Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 796–806, 2013.

RICHARDS, J. S.; JONASSEN, J. A.; KERSEY, K. Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. **Endocrinology**, v. 107, p. 641–648. 1980.

FILICORI, M. et al. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 62, p. 1136–44, 1986.

MAGIAKOU, M. A. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 17, p. 42–56, 1997

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 80, n. 2, p. 79–87, 2005.

WESTWOOD, F. R. **The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging**, 2008.

PACCOLA, C. C. et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 677–683, 2013.

MCLEAN, A. C. et al. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. **Journal of Visualized Experiments**, n. 67, p. 4–9, 2012.

KUIPER, G. G. et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5430–5925, 1996.

COUSE, J. F. et al. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wildtype and ER α knockout mouse. **Endocrinology**, v. 138, p. 4613–4621, 1997.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36869–36872, 2001.

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

TREMBLAY, G. B. et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 353–365, 1997.

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

WALKER, D. M. et al. Disruption of reproductive aging in female and male rats by gestational exposure to estrogenic endocrine disruptors. **Endocrinology**, v. 154, p. 2129–2143, 2013.

TOPPER, V. Y.; WALKER, D. M.; GORE, A. C. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine disrupting chemicals on microRNA expression in the developing rat hypothalamus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 414, p. 42–52, 2015.

SKINNER, M. K. Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 68-70, 2016.

FREITAS-LIMA, L. C. 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, p. 21–31, 2018.

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

MAKITA, Y. et al. Effects of concurrent exposure to tributyltin and 1,1-dichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethylene (p,p'-DDE) on immature male Wistar rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 97, n. 6, p. 364-8, 2005.

HE, K.; ZHANG, J.; CHEN, Z. Effect of tributyltin on the food intake and brain neuropeptide expression in rats. **Endokrynol Pol**, v. 65, n. 6, p. 485-90, 2014.

NUÑEZ, P.; ARGUELLES, J.; PERILLAN, C. Short-term exposure to bisphenol A affects water and salt intakes differently in male and ovariectomised female rats. **Appetite**, v. 120, n. 1, p. 709-715, 2018.

KIM, B-O.; et al. Exposure to sublethal concentrations of tributyltin reduced survival, growth, and 20-hydroxyecdysone levels in a marine mysid. **Mar Environ Res**, v. 140, p. 96-103, 2018.