



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Daniel Galinis Vieira Lima**

**Exposição de ratas *Wistar* ao tributilestanho durante a gestação e a lactação: efeitos sobre a prole recém-desmamada e adolescente de ambos os sexos**

Rio de Janeiro

2021

Daniel Galinis Vieira Lima

**Exposição de ratas *Wistar* ao tributilestanho durante a gestação e a lactação: efeitos sobre a prole recém-desmamada e adolescente de ambos os sexos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosiane Aparecida Miranda

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

L732 Lima, Daniel Galinis Vieira.  
Exposição de ratas *Wistar* ao tribuilestano durante a gestação e a lactação: efeitos sobre a prole recém-desmamada e adolescente de ambos os sexos / Daniel Galinis Vieira Lima – 2021.  
88f.

Orientadora: Patrícia Cristina Lisbôa da Silva.  
Coorientadora: Rosiane Aparecida Miranda.  
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Clínica e Experimental.

1. Compostos organoestranhos – Fisiopatologia – Teses. 2. Gravidez – Metabolismo – Teses. 3. Lactação – Metabolismo – Teses. 4. Exposição ambiental – Teses. 5. Ratos como animais de laboratório – Teses. I. Silva, Patrícia Cristina Lisbôa da. II. Miranda, Rosiane Aparecida. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 618.2:614.87

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Daniel Galinis Vieira Lima

**Exposição de ratas Wistar ao tributilestanho durante a gestação e a lactação: efeitos sobre a prole recém-desmamada e adolescente de ambos os sexos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de julho de 2021.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosiane Aparecida Miranda  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Luana Lopes de Souza  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cherley Borba Vieira de Andrade  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira  
Universidade Federal de Mato Grosso

Rio de Janeiro

2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, principalmente, minha mãe e meus tios que sempre me deram o máximo deles em toda a minha vida em prol do meu sucesso e felicidade, também às amigadas mais próximas, dentre elas Luis e Gabrielly, pessoas que sempre me auxiliaram ao máximo em todas as possíveis situações que eu necessitasse de forma intelectual ou mesmo simplesmente de forma a estimular a continuar em aspectos difíceis da vida como um todo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família por todo o apoio que me foi dado nesses anos de estudo e trabalho, aos amigos que sempre se prontificaram a me auxiliar em todas as possíveis formas que poderiam.

Agradeço também à todas as integrantes do LFE, que me auxiliaram nessa jornada de conhecimento, trabalho e companheirismo, aquelas que estão presentes agora ou que passaram pela minha formação. Agradeço à Lilian Meyer quem esteve comigo em praticamente todos os momentos sempre me ajudando enormemente em todos os trabalhos feitos. Agradeço à Profa. Dra. Rosiane Miranda que sempre se dispôs a me auxiliar em todos os momentos possíveis da melhor forma possível e me forneceu um salto em questão de técnicas e conhecimento, à Profa. Dra. Patrícia Lisboa por ter me recebido me orientado e me instigado a sempre dar o meu melhor e as duas pela paciência e compreensão.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

LIMA, Daniel Galinis Vieira. **Exposição de ratas *Wistar* ao tributilestanho durante a gestação e a lactação**: efeitos sobre a prole recém-desmamada e adolescente de ambos os sexos. 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O composto organoestânico tributilestanho (TBT), amplamente utilizado como biocida em tintas de embarcações, vem sendo evidenciado como um importante desregulador endócrino. A lixiviação desse composto é um fator de contaminação de água e alimentos, em especial, pescados marinhos. Estudos já demonstraram que a exposição ao TBT, mesmo que em baixas doses, pode induzir obesidade, infertilidade e disfunções metabólicas. No entanto, a relação entre a exposição ao TBT durante gestação e lactação, consideradas janelas críticas para a programação metabólica, e disfunções a curto e longo prazos ainda não são elucidadas. Nossa hipótese é que a prole de mães expostas ao TBT durante fases críticas do desenvolvimento pode apresentar disfunções endócrino-metabólicas em fases iniciais de seu desenvolvimento, como efeito de curto prazo. Em nosso estudo objetivamos avaliar o efeito da exposição materna ao TBT, durante gestação e lactação, sobre parâmetros biométricos, endócrinos e metabólicos em ratos recém desmamados e adolescentes, em ambos os sexos. Para tal, utilizamos ratas *Wistar* prenhas randomicamente divididas em grupos: Controle, que recebeu solução veículo (etanol 0,01%); TBT 100ng, que recebeu TBT na dose de 100ng/kg pc/dia; e TBT 1000ng, que recebeu TBT na dose de 1000ng/kg pc/dia. As respectivas soluções foram administradas por gavagem intragástrica do 7<sup>o</sup> dia de gestação ao 21<sup>o</sup> dia de lactação. Parâmetros biométricos e bioquímicos das mães foram avaliados no fim da lactação. A prole de ambos os sexos foi avaliada no nascimento, ao desmame (21 dias de vida), e na adolescência (45 dias de vida). A exposição ao TBT não promove alterações no peso corporal, no consumo alimentar, no perfil glicêmico e lipídico das mães. Porém, promove alterações específicas e de forma dose-dependente, tais como aumento da massa de gordura total das mães no dia do parto (TBT 100ng), redução de gorduras gonadal e mesentérica no dia do desmame da prole (TBT 1000ng) e alterações na composição do leite, como aumento de proteínas e colesterol total, e redução no conteúdo de lactose (TBT 100ng). Na prole, o TBT promove baixo peso ao nascimento (TBT 100ng), redução de comprimento naso-anal e aumento da glicemia (TBT 1000ng) nas fêmeas, sem alterações nos machos. Ao desmame, a prole fêmea (TBT 1000ng) apresenta redução dos depósitos de gordura retroperitoneal, do peso do útero e dos níveis séricos de leptina (ambas as doses). Na adolescência, a prole macho apresenta redução da massa magra (TBT 1000ng) e aumento do peso da próstata (TBT 100ng), sem alterações nas fêmeas. Em resumo, a exposição materna ao TBT em baixas doses induz alterações dose, sexo, idade e tecido-específicas e parecem prejudicar de forma mais intensa a prole fêmea. Essas alterações podem ser um indício de que esses animais apresentarão, na vida adulta, maior risco de desenvolver obesidade e doenças associadas.

Palavras-chave: Gestação. Lactação. Tributilestanho. Programação metabólica.

## ABSTRACT

LIMA, Daniel Galinis Vieira. **Exposure of Wistar rats to tributyltin during pregnancy and lactation**: effects on weaned and adolescent offspring of both sexes. 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Tributyltin (TBT), an organotin compound, widely used as a biocide in boat paints, has been highlighted as an important endocrine disruptor. The leaching of this substance increases water and food contamination, especially marine fish. Studies have shown that exposure to TBT, even at low doses, can induce obesity, infertility and metabolic dysfunctions. However, the relationship between exposure to TBT during pregnancy and lactation, considered critical windows for metabolic programming, as well as the short- and long-term effects are not yet elucidated. Our hypothesis is that the offspring of mothers exposed to TBT during critical stages of development may present endocrine-metabolic dysfunctions in the early stages of their development, as a short-term effect. For this purpose, we used pregnant Wistar rats randomly divided into the following groups: Control, which received a vehicle solution (ethanol 0.01%); TBT 100ng, which received TBT at a dose of 100ng/kg bw/day; and TBT 1000ng, which received TBT at a dose of 1000ng/kg bw/day. The respective solution were administered by intragastric gavage from the gestational day 7 (GD7) to lactational day 21 (LD21). Biometric and biochemical parameters of the mothers were evaluated at the end of lactation. Offspring of both sexes were evaluated at birth, weaning (21 days old) and adolescence (45 days old). Exposure to TBT does not program changes in body weight, food consumption, glycemic and lipid profile of mothers. However, it promotes specific and dose-dependent changes in mothers, such as increased total fat mass at delivery (TBT 100ng), reduction in gonadal and mesenteric fat depots at the end of lactation (TBT 1000ng) and changes in milk composition, such as increased protein and total cholesterol content, with reduction in lactose (TBT 100ng). In female offspring, TBT promotes low birth weight (TBT 100ng), a reduction in naso-anal length and an increase in blood glucose (TBT 1000ng), with no changes in males. At weaning, female offspring (TBT 1000ng) has reduced retroperitoneal fat depots, uterine weight and serum leptin levels (both doses). In adolescence, male offspring shows reduced lean mass (TBT 1000ng) and increased prostate weight (TBT 100ng), with no changes in females. In summary, maternal exposure to TBT at low doses induces dose, sex, age and tissue-specific alterations and seems to be more harmful to female offspring. These changes suggest that these animals should exhibit, in adulthood, a higher risk of developing obesity and associated diseases.

Keywords: Pregnancy. Lactation. Tributyltin. Metabolic programming.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro –	Algumas substâncias descritas como desreguladores endócrinos e suas Procedências.....	16
Figura 1 –	Estrutura dos principais COEs presentes em ambientes marinhos.....	20
Figura 2 –	Distribuição do percentual de gastrópodes fêmeas afetados por imposex.....	23
Figura 3 –	A produção de produtos químicos orgânicos sintéticos em relação a porcentagem de adultos com sobrepeso nos Estados Unidos durante o século XX.....	28
Figura 4 –	Efeitos da administração de TBT, a partir do dia gestacional 7, na evolução ponderal e consumo das mães durante a gestação e a lactação.....	38
Figura 5 –	Efeitos da administração de TBT na massa magra e massa gorda das mães, avaliadas por RMN, no dia do parto.....	39
Figura 6 –	Efeitos da administração de TBT na massa gorda e magra das mães, avaliadas por RMN, no dia do desmame da prole e peso corporal ao final da lactação.....	40
Figura 7 –	Efeitos da administração de TBT no peso relativo dos órgãos e depósitos de gorduras das mães no final da lactação.....	41
Figura 8 –	Efeitos da administração materna de TBT no peso corporal e CNA no dia do nascimento da prole de ambos os sexos.....	44
Figura 9 –	Efeitos da administração materna de TBT na glicemia no dia do nascimento da prole de ambos os sexos.....	45
Figura 10 –	Efeitos da administração materna de TBT na evolução ponderal da prole macho do nascimento ao desmame.....	47
Figura 11 –	Efeitos da administração materna de TBT, na evolução ponderal da prole fêmea do nascimento ao desmame.....	48
Figura 12 –	Efeitos da administração materna de TBT no peso corporal, CNA e índice de Lee da prole de ambos os sexos no dia do desmame.....	49
Figura 13 –	Efeitos da administração materna de TBT, na massa magra e gorda prole macho no dia do desmame.....	50

Figura 14 – Efeitos da administração materna de TBT na massa magra e gorda da prole fêmea no dia do desmame.....	51
Figura 15 – Efeitos da administração materna de TBT no peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole macho no dia do desmame.....	52
Figura 16 – Efeitos da administração materna de TBT no peso dos depósitos de gordura e nos órgãos da prole fêmea no dia do desmame.....	54
Figura 17 – Efeitos da administração materna de TBT na evolução ponderal da prole macho do dia do desmame aos 45 dias de vida.....	55
Figura 18 – Efeitos da administração materna de TBT na evolução ponderal da prole fêmea do dia do desmame ao dia 45.....	56
Figura 19 – Efeitos da administração materna de TBT, no consumo alimentar da prole macho do dia do desmame aos 45 dias de vida.....	57
Figura 20 – Efeitos da administração materna de TBT no consumo alimentar da prole fêmea do dia do desmame aos 45 dias de vida.....	58
Figura 21 – Efeitos da administração materna de TBT, no peso aos 45 dias, CNA e índice de Lee da prole de ambos os sexos aos 45 dias.....	59
Figura 22 – Efeitos da administração materna de TBT na massa magra e massa gorda da prole macho aos 45 dias.....	60
Figura 23 – Efeitos da administração materna de TBT, na massa magra e massa gorda da prole fêmea aos 45 dias.....	61
Figura 24 – Efeitos da administração materna de TBT, no peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole macho aos 45 dias.....	62
Figura 25 – Efeitos da administração materna de TBT, no peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole fêmea aos 45 dias.....	63
Figura 26 – Efeitos da administração materna de TBT, na prole macho aos 45 dias..	64
Figura 27 – Efeitos da administração materna de TBT, na prole fêmea aos 45 dias...	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeitos da administração materna de TBT sob parâmetros metabólicos no sangue e no plasma das mães no dia do desmame da prole.....	42
Tabela 2 –	Efeitos da administração materna de TBT na composição do leite materno ao final da lactação.....	43
Tabela 3 –	Efeitos da administração materna de TBT na data de abertura ocular da prole.....	46
Tabela 4 –	Efeitos da exposição materna ao TBT no perfil metabólico das proles de ambos os sexos aos 21 e aos 45 dias de vida pós-natal.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área sob a Curva
ATP	Adenosina Trifosfato
AV	Abertura Vaginal
BPA	Bisfenol A
BTX	Benzeno, Toluenos e Xilenos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNA	Comprimento Naso-anal
COE	Compostos de Organoestanho
CYP	Citocromo p450
DBCP	Dibromo Cloropropano
DBT	Dibutilestanho
DDT	Diclorofenil Tricloroetano
DES	Dietilestilbetrol
DG	Dia Gestacional
DL	Dia de Lactação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
DPT	Bifenilestanho
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estado Unidos da América
HCH	Hexaclorociclohexano
HHG	Hipotálamo-Hipófise-Gônadas
HOMA	Modelo de Avaliação da Homeostase
IP	Intraperitoneal
MBT	Monobutilestanho
MPT	Monofenilestanho
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
OMI	Organização Marítima Internacional
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBDE	Difenílicos Polibromados
PC	Peso Corporal

PCB	Bifenila Policlorada
PN	Dia Pós-Natal
POP	Poluente Orgânico Persistente
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
SN	Estanho
SNC	Sistema Nervoso Central
T3	Triiodotironina
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TBT	Tributilestanho
TD	<i>Tolerable Daily Intake</i>
TeTBT	Tetrafenilestanho
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
TPT	Trifenilestanho
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	15
1	<b>OBJETIVOS .....</b>	31
1.1	<b>Geral .....</b>	31
1.2	<b>Específicos .....</b>	31
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	32
2.1	<b>Ética.....</b>	32
2.2	<b>Modelo experimental .....</b>	32
2.3	<b>Diluição do TBT .....</b>	33
2.4	<b>Coleta e avaliação da composição do leite.....</b>	33
2.5	<b>Ressonância magnética Nuclear – RMN.....</b>	34
2.6	<b>Teste oral de tolerância à glicose – TOTG.....</b>	34
2.7	<b>Eutanásia e coleta de tecidos.....</b>	35
2.8	<b>Avaliações de parâmetros bioquímicos.....</b>	35
2.9	<b>Análises estatísticas.....</b>	36
3	<b>RESULTADOS.....</b>	37
3.1	<b>Efeitos da exposição de TBT nas mães durante o período de gestação e lactação.....</b>	37
3.1.1	<u>Peso corporal e consumo das mães durante o período de gestação e lactação.....</u>	37
3.1.2	<u>Avaliação de massa gorda e massa magra das mães por RMN no dia do parto.....</u>	39
3.1.3	<u>Avaliação de massa gorda e massa magra das mães por RMN no dia do desmame da prole.....</u>	39
3.1.4	<u>Efeito da exposição ao TBT no peso dos depósitos de gordura e órgãos das mães no dia do desmame da prole.....</u>	40
3.1.5	<u>Avaliação do perfil metabólico das mães.....</u>	42
3.1.6	<u>Avaliação da composição do leite materno no dia do desmame da prole.....</u>	42
3.2	<b>Efeitos da exposição materna ao TBT na prole.....</b>	43
3.2.1	<u>Avaliação do peso corporal, comprimento naso-anal (CNA) e glicemia da prole no nascimento.....</u>	43

3.2.2	<u>Avaliação da evolução ponderal da prole macho do nascimento ao desmame.....</u>	45
3.2.3	<u>Avaliação da evolução ponderal da prole fêmea do nascimento ao desmame.....</u>	47
3.2.4	<u>Avaliação do peso corporal, CNA e índice de Lee no desmame.....</u>	48
3.2.5	<u>Avaliação da massa magra e massa gorda por RMN da prole macho no dia do desmame.....</u>	50
3.2.6	<u>Avaliação da massa magra e massa gorda da prole fêmea no dia do desmame.....</u>	50
3.2.7	<u>Avaliação do peso dos depósitos de gordura e dos órgãos da prole macho ao desmame.....</u>	51
3.2.8	<u>Avaliação do peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole fêmea ao desmame.....</u>	53
3.3	<b>Efeitos da exposição materna ao TBT na prole na adolescência.....</b>	55
3.3.1	<u>Avaliação da evolução ponderal da prole macho do desmame aos 45 dias de vida.....</u>	55
3.3.2	<u>Avaliação da evolução ponderal da prole fêmea aos 45 dias de vida.....</u>	56
3.3.3	<u>Avaliação da evolução do consumo alimentar da prole macho aos 45 dias de vida.....</u>	57
3.3.4	<u>Avaliação da evolução do consumo alimentar da prole fêmea aos 45 dias de vida.....</u>	58
3.3.5	<u>Avaliação do peso corporal, CNA e índice de Lee da prole de ambos os sexos aos 45 dias de vida.....</u>	59
3.3.6	<u>Avaliação da massa magra e massa gorda da prole macho aos 45 dias de vida.....</u>	60
3.3.7	<u>Avaliação da massa magra e massa gorda da prole fêmea aos 45 dias de vida.....</u>	60
3.3.8	<u>Avaliação do peso dos depósitos de gordura e dos órgãos da prole macho aos 45 dias de vida.....</u>	61
3.3.9	<u>Avaliação do peso dos depósitos de gordura e dos órgãos da prole fêmea aos 45 dias de vida.....</u>	63
3.3.10	<u>Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) na prole macho aos 45 dias de vida.....</u>	64

3.3.11	<u>Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) na prole fêmea aos 45 dias de vida.....</u>	65
3.3.12	<u>Avaliação do perfil metabólico da prole aos 21 e aos 45 dias de vida pós-natal.....</u>	65
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	68
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	74
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	75
	<b>ANEXO - Certificado de aprovação da Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (protocolo nº 010/2019).....</b>	88



## INTRODUÇÃO

A corrida em busca da alta produção industrial e agrícola têm gerado, ao longo de anos, grandes impactos ambientais e diminuído de forma considerável a salubridade da população em todo o mundo. A partir da publicação do livro *Primavera Silenciosa* em 1962, escrito por Rachel Carson, aumentou-se o interesse pelos impactos causados por produtos químicos criados com o intuito de garantir a alta produção em diversas áreas, sendo elas industriais ou alimentícias. Esses produtos contêm substâncias químicas que podem ser dispersas através do ar, solo ou água, sendo muitas delas persistentes no meio ambiente, acumulando-se no solo, sedimento de rios e ao longo da cadeia trófica, representando riscos à saúde humana (TRAVIS; HESTER, 1991). Uma característica importante dessas substâncias é a capacidade de interagir com receptores hormonais, interferindo, dessa forma, na ação de diversos hormônios e, devido a essa habilidade, são denominadas desreguladores endócrinos (no inglês, *endocrine disruptors*) (MONNERET, 2017).

Diversos desreguladores endócrinos têm sido estudados, tais como: componentes presentes em plásticos (exemplos: polifluoroalquil, bisfenol A, éteres difenílicos polibromados, alquilfenóis e ftalatos) (FUCIC et al., 2018), pesticidas (exemplos: organoclorados, organofosfatos, carbamatos, triazinas e piretróides) (MCKINLAY et al., 2008) e compostos organoestânicos (exemplo: tributilestanho) (GRÜN et al., 2006). Diversos desreguladores endócrinos podem ser observados no Quadro. Esses compostos químicos interferem em diversas vias de sinalização e mecanismos e podem influenciar diretamente a adipogênese, a sensibilidade à insulina, o comportamento, a reprodução e outras funções importantes do organismo (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011). A exposição a estes desreguladores pode se dar por via oral, inalatória ou absorção dérmica (DARBRE, 2015).

Quadro – Algumas substâncias descritas como desreguladores endócrinos e suas procedências

<b>Desreguladores endócrinos</b>	<b>Uso e/ou ocorrência</b>
2,4-D; 2,4,5-T; Alacloro; Atrazina	Herbicidas
Cloreto de Cádmio; Metiram; Mancozeb; Maneb; Zineb (os 3 últimos contém etilenotioúrea);	Fungicidas
Carbaril; Clordano; Dieldrin; DDT; Endosulfan; Heptacloro; HCH; Metoxicloro; Mirex; Paration; Piretróides; Toxafeno	Inseticidas
Compostos organoestânicos (TeBT, TBT)	Biocidas
Acrilamida	Tratamento de água e esgoto; floculante; produção de papel e celulose; impressão definitiva de tecidos
Ascarel (PCB)	Óleo isolante dielétrico; papel copiativo não-carbono, adesivos, lubrificante para lâminas de corte, tintas, revestimento interno de silos para estocagem de grãos e leite nos anos 80
Benzo(a)antraceno; Benzo(a)pireno	Alcatrão; Asfalto; Coquearias; Emissões de diesel; Fundição de alumínio; graxas e óleos minerais
Bisfenol A	Resinas epóxi; revestimento interno de latas para alimentos diversos
BTX (Benzeno, tolueno e xilenos)	Tintas, solventes, gasolina, thinner, removedores
Cádmio	Ligas metálicas; solda; pigmentos; estabilizante de plásticos; baterias; cinzas de incineradores; chapas galvanizadas
Chumbo	Baterias; pigmentos; soldagem; ligas; tintas; primers; gasolina de aviação
Compostos pirimidínicos (Metirimol, Etirimol e Ciprodinil)	Fungicidas aplicados em frutas e cereais
Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas e Dibenzofuranos policlorados	Incineração de resíduos urbanos e de resíduos perigosos; produção e queima de pesticidas, como pentaclorofenol, agente laranja, benzenos clorados; aciarias; queima de carvão; fundição de alumínio; produção de PVC; emissões de diesel
DBCP (Dibromocloropropano)	Nematocida
Dissulfeto de Carbono	Fabricação de celofane e de rayon; solvente para ceras, óleos, lacas e resinas; vulcanização a frio de borrachas; componente de certos tipos de inseticidas, parasiticidas e herbicidas
Estireno	Fabricação de plásticos (ex.: copinhos descartáveis) e borrachas diversas

Legenda: Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D); Ácido Triclorofenoxiacético (2,4,5-T); Diclorofenil tricloroetano (DDT); Hexaclorociclohexano (HCH); Tetrafenilestanho (TeTBT); Tributilestanho (TBT); Dibromocloropropano (DBCP); Bifenila policlorada (PCB).

Fonte: Adaptado de GUIMARÃES, 2019.

No entanto, a exposição à desreguladores endócrinos vai muito além de uma via direta. Essa exposição pode ser transplacentária ou via leite materno, o que pode causar disfunções no feto tanto a curto quanto em longo prazo (SAIYED et al., 2003). A exposição pré-natal aos desreguladores promove mudanças epigenéticas transgeracionais e fisiologia

anormal (SKINNER, 2016). Os desreguladores endócrinos já foram descritos como contribuintes para o desenvolvimento da síndrome metabólica pelo fato de induzirem processos inflamatórios exacerbados (PETRAKIS et al., 2017). A síndrome metabólica refere-se à obesidade central, resistência à insulina/intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão, disfunções endoteliais e aterogênese (SAMSON; GARBER, 2014). De forma interessante, o aumento exponencial no uso de produtos químicos em áreas industriais e agrícolas coincide com a pandemia da obesidade e síndrome metabólica, evidenciando o papel dos desreguladores endócrinos na etiologia de importantes fisiopatologias (BAILLIE-HAMILTON, 2002; CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011).

Especificamente, alguns compostos desreguladores endócrinos podem induzir diferentes disfunções dependendo do tipo, tempo e dose de exposição. O dietilestilbestrol (DES), um estrogênio sintético não esteroide sintetizado em 1938 e um dos primeiros desreguladores descritos, foi amplamente utilizado por mulheres como prevenção a abortos espontâneos entre os anos de 1940 e 1971. As filhas de mulheres que utilizaram essa substância apresentaram infertilidade, além de estar associado ao desenvolvimento de câncer no sistema reprodutor e outras anormalidades, tanto nas mães quanto nas filhas (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 2002). O Diclorodifenil tricloroetano (DDT), pesticida organoclorado banido na década de 70, causa em humanos: hipertensão arterial, vários tipos de câncer, hipotireoidismo e diabetes mellitus tipo 2 (ANDREOTTI et al., 2009; ARREBOLA et al., 2015; COHN; CIRILLO.; CHRISTIANSON, 2010; EVERETT et al., 2007; GOLDNER et al., 2013; TANG et al., 2014). O bisfenol A (BPA) e os ftalatos, amplamente usados na fabricação de plásticos e diversos outros produtos, foram descritos como desreguladores endócrinos que são capazes de se acumular em tecidos humanos e induzir distúrbios relacionados principalmente ao sistema reprodutor masculino e feminino, tais como infertilidade; distúrbios relacionados ao metabolismo e associação com o desenvolvimento de cânceres também são descritos (MEEKER et al., 2010; NOMIRI et al., 2019; SOUNDARARAJAN et al., 2019; ZIV-GAL; FLAWS, 2016). Os éteres difenílicos polibromados (PBDE), utilizados como inibidores de combustão em materiais como computadores, eletrodomésticos, espumas de poliuretano e outros, são liberados lentamente desses produtos e se acumulam no ambiente, sendo diretamente associados a alterações neurotóxicas, hepatotóxicas, imunológicas e endócrinas (COSTA et al., 2014; LEIJS et al., 2009; PEREIRA et al., 2018; VOS et al., 2003). Parabenos, utilizados como agentes antimicrobianos em produtos de beleza e farmacêuticos, estão amplamente presentes em tecidos humanos, possuindo propriedades estrogênicas e estão relacionados ao

desenvolvimento de câncer de mama em humanos (DARBRE; HARVEY, 2014). Os compostos organoestânicos, como o tributilestanho (TBT), utilizados como biocidas em tintas de navegações, estão associados ao desenvolvimento do imposex, surgimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas, em moluscos e peixes (HORIGUCHI, 2006). O TBT é capaz de inibir a aromatase, enzima responsável por converter testosterona em estrogênio (COOKE, 2002) e a exposição a esse composto pode desencadear disfunções endócrinas em modelos experimentais (MERLO et al., 2016; SENA et al., 2017; SHARAN; NIKHIL; ROY, 2014). Mais informações sobre compostos organoestânicos serão descritas no item subsequente.

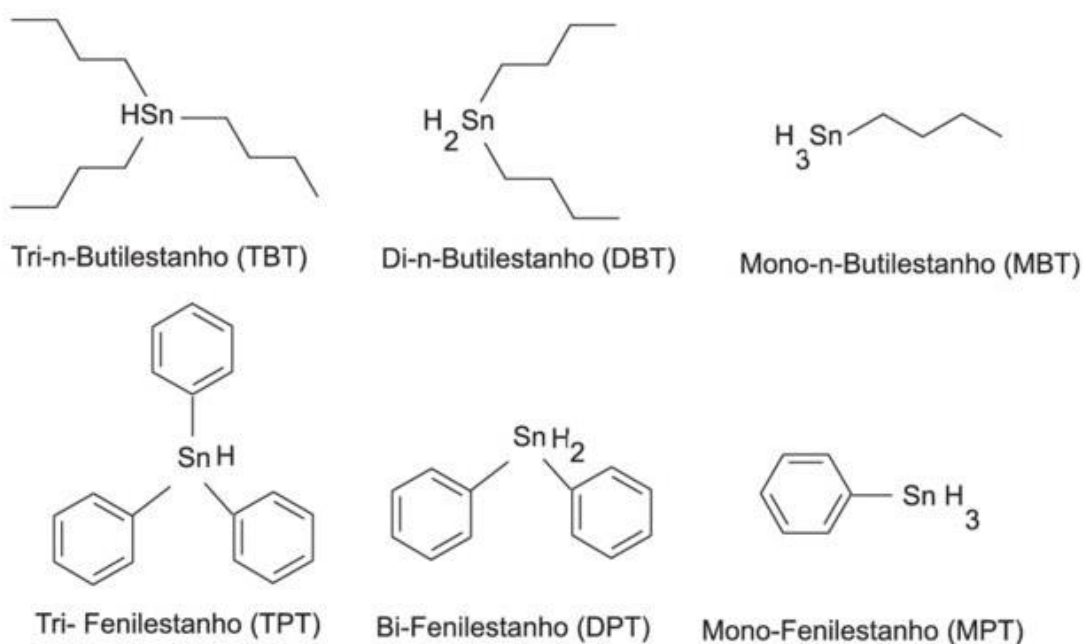
Os ambientes marinhos não estão livres da contaminação por desreguladores endócrinos. Grandes quantidades de contaminantes provenientes de efluentes, precipitação atmosférica, lixiviação de solos, embarcações e outros, são depositados nos ecossistemas marinhos e são capazes de afetar o equilíbrio dos mesmos, provocando alterações morfológicas e funcionais dos organismos de vida marinha (GOKSOYR, 2006). O aumento da movimentação portuária proveniente da expansão industrial foi uma das principais causas do aumento da dispersão de contaminantes ambientais em ecossistemas marinhos por intermédio das embarcações. Por estarem constantemente submersas, as embarcações passam por um processo natural chamado de bioincrustação, que nada mais é do que o acúmulo de matéria orgânica que favorece a formação de biofilme bacteriano que, por sua vez, favorece a colonização de invertebrados e macroalgas (DA GAMA, 2009).

A bioincrustação é considerada um problema para as embarcações, pois gera entupimento de tubulações submersas e compromete tanto a estrutura quanto o desempenho das mesmas, fazendo com que o custo de as manter seja elevado, uma vez que a velocidade é diminuída e mais combustível é consumido e, além disso, reparações constantes devem ser realizadas (DA GAMA, 2009; EGUÍA; TRUEBA, 2007). Visando o combate da bioincrustação, desde o início das navegações, muitos compostos foram utilizados na tentativa de impedir este processo, tais como: utilização de revestimentos de cobre, cera, chumbo, óxidos de zinco e breu (EGUÍA; TRUEBA, 2007; YEBRA; KIIL; DAM-JOHANSEN, 2004). No entanto, como a estrutura das embarcações foi evoluindo, esses compostos já não eram lucrativos, pois eram capazes de interagir com as estruturas de ferro e novos compostos foram sendo inseridos a fim de se reduzir o processo de bioincrustação. Em virtude disso, uma grande variedade de biocidas, substâncias capazes de impedir a formação do biofilme bacteriano e, por consequência, a bioincrustação, foram inseridas como anti-incrustantes em revestimentos de embarcações e se tornaram amplamente utilizadas (YEBRA; KIIL; DAM-JOHANSEN, 2004).

Em meados do século XX, tintas de embarcações contendo compostos biocidas foram desenvolvidas, porém possuíam baixa durabilidade. Na década de 60, foram criados os biocidas de segunda geração contendo compostos de organoestanho (COE), excelentes agentes anti-incrustantes devido suas propriedades moleculares (CHAMP; SELIGMAN, 1996) e alta durabilidade tendo um ótimo custo-benefício. Os COEs tiveram ampla utilização pela indústria naval nas décadas de 70 e 80 e os mais utilizados foram o TBT e o trifenilestanho (TPT), sendo o TBT o mais utilizado em todo o mundo (CHAMP; SELIGMAN, 1996).

Os COEs são compostos hidrofóbicos que apresentam em sua estrutura, pelo menos uma ligação entre o carbono e o estanho (Sn), tendo com fórmula geral  $R_{(4-n)}SnX_n$ . O radical R pode ser um grupo alquil ou aril ligado ao átomo de Sn por uma ligação covalente e X é, em geral, uma espécie aniônica (exemplos: cloreto e hidróxido), podendo o n variar de 0 a 3 (NUNES-SILVA et al., 2018). As quantidades de ligação entre o Sn e o carbono influenciam diretamente na propriedade dos COEs. Existem os COEs tetrassubstituídos (exemplos: TeBT, tetra-n-butilestanho), os trissubstituídos (exemplos: TBT e TPT), dissubstituídos (exemplos: DBT, di-n-butilestanho e DPT, bifenilestanho) e os monossubstituídos (exemplos: MBT, mono-n-butilestanho e MPT, monofenilestanho). As estruturas moleculares desses COEs, com exceção do TeBT, podem ser observadas na Figura 1. A quebra dos COEs ocorre principalmente por fotólise e por degradação via microrganismos (DUBEY; ROY, 2003).

Figura 1 – Estrutura dos principais COEs presentes em ambientes marinhos



Fonte: CASTRO; RODRIGUES-QUEIROZ; ROCHA-BARREIRA, 2007.

Os compostos tetrasubstituídos não possuem ação biocida considerável, sendo a ação tóxica máxima ocasionada pelos trissubstituídos. Isso ocorre devido a capacidade desses compostos de atravessar membranas celulares, devido sua característica hidrofóbica. Os COEs di- e monossubstituídos apresentam toxicidades pouco estudadas (KUBALLA et al., 1995; GRAY et al., 1987).

Visando a prevenção e controle da poluição marítima, acordos internacionais foram criados, como por exemplo, o anexo “lixo oceânico” no protocolo de 1978, MARPOL 73/78, criado pela Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios como forma de obrigar o setor marítimo a reduzir a propagação de poluentes nos EUA (NATIONAL RESEARCH COUNCIL [NRC], 1995). Em relação aos COEs, após estudos toxicológicos, foram comprovadas o surgimento de alterações em diferentes níveis tróficos e em estudos experimentais e com isso foram adotadas regulamentações para redução da utilização desses compostos em diversos países (CHAMP, 2000). Países desenvolvidos apresentam taxas de COEs muito menores quando comparados a países em desenvolvimento, muito provavelmente devido ao maior controle e fiscalização na venda e utilização de tais compostos.

Mesmo com a proibição da utilização dos COEs, ainda há registros de contaminação em diversos países, como China, Taiwan, Austrália, Índia e Brasil (HSU; WANG, 2010; HU

et al., 2006; TANG; HSU; REITSEMA; SPICKETT, 1999; ZEIDAN; BOEHS, 2016). Mais recentemente foi verificado na América latina, recordes de imposex em 6 países (Argentina, Chile, Equador, Peru, Venezuela e Brasil) devido a contaminações de marinas e portos comerciais além de pesca artesanal, já que o TBT pode estar presente nas redes (CASTRO et al., 2021).

O TBT, como já mencionado anteriormente, é o COE mais utilizado em todo o mundo. A hidrofobicidade apresentada pela molécula de TBT caracteriza a sua capacidade de bioacumulação, visto que pode facilmente penetrar bicamadas lipídicas celulares. A bioacumulação de TBT pode se dar via absorção de componentes presentes na água e nos sedimentos ou via biomagnificação, ou seja, acúmulo do composto a partir da cadeia trófica (IKEDA; YAMADA, 2003). O TBT tende a se acumular em tecidos com maior teor lipídico, sendo considerado um desregulador endócrino em diversos níveis tróficos, pois é capaz de desequilibrar o sistema endócrino de moluscos, crustáceos, peixes e mamíferos (JORDÃO, 2016; MATTHIESSEN; GIBBS, 1998; ORTIZ-VILLANUEVA et al., 2018; SENA et al., 2017). A acumulação do TBT é notavelmente estável. Fêmeas gastrópodes (*P. canaliculata*) que sofreram exposição crônica de TBT em bacias argentinas, ainda que mantidas em água limpa por uma semana ainda apresentavam níveis mensuráveis de organoestânicos (MARTINEZ et al., 2017). O efeito toxicológico mais bem estudado do TBT é o imposex, surgimento irreversível de características sexuais masculinas em fêmeas de gastrópodes (SCHOYEN et al., 2019), que impacta diretamente o equilíbrio ecológico.

A ingestão de alimentos marinhos é uma via potencial de contaminação por TBT na população em geral, porém afeta mais diretamente populações ribeirinhas (BELFROID; PURPERHART; ARIES, 2000). Um estudo em humanos demonstrou a existência de uma associação entre concentrações placentárias de 0,06 a 0,56 ng/g de COEs e maior peso de crianças até os 3 meses de idade (RANTAKOKKO et al., 2014). Outros estudos avaliaram a presença de TBT em peixes no golfo árabe verificando contaminações na faixa de 98,5 ng/g na espécie de peixe *Epinephelus Tauvina* (ASHRAF; SALAM; MIAN, 2017) e consumo de COEs a partir de peixes na Finlândia com valores inferiores a 0,01 até 0,54 ng/g pc em diferentes peixes (AIRAKSINEN et al., 2010), o que não é observado para alimentos como arroz, óleos de soja e de girassol e laticínios como queijo e manteiga. O estudo reforça, porém que frutos do mar apresentaram valores abaixo de 1 a 341 ng/g (KANNAN; TANABE; TATSUKAWA, 1995). A ingestão média de compostos organoestânicos através do consumo de peixes pode ser calculada multiplicando o consumo de peixes ( $\text{g/dia}^{-1}$ ) com a concentração média de compostos organoestânicos nas espécies correspondentes (ng/g de

peso fresco) e dividindo o produto por um peso corporal de 60 kg (AIRAKSINEN et al., 2010). Esses pesquisadores detectaram que o consumo médio diário total, por meio do consumo de peixes (considerando peixes importados e nacionais), foi de 3,2 ng/kg de peso corporal/dia. A maioria dos estudos sugere que as concentrações presentes nesses frutos do mar estão abaixo do nível de ingestão tolerável diária (no inglês, *Tolerable daily intake, TDI*), de 0,25 µg/kg (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004), e que suas populações podem consumir esses alimentos de forma segura (AIRAKSINEN et al., 2010; CHOI, M; MOON; CHOI, H., 2012). No entanto, eles não consideram um fator importante dos compostos organoestânicos, a bioacumulação.

Diversos métodos de avaliação para validar as concentrações de TBT são utilizados. Na água, as concentrações de TBT são avaliadas a partir de ressonância magnética (LAUGHLIN; GUARD; COLEMAN, 1986) ou cromatografia gasosa (TUNÇ et al., 2021). Em frutos do mar, as concentrações de TBT já foram avaliadas por espectrometria de massa (PODRATZ et al., 2015) ou por cromatografia líquida (HAYASHI et al., 2020). No entanto, é importante ressaltar que o TBT não é o único organoestânico observado no mar. Furdek et al. (2012) constataram a presença do TBT, de seus metabólitos e também do TPT, tanto na água marinha em concentrações de 0,1 até 27,98 ng de estanho por grama assim como em moluscos onde foram observados valores inferiores a 5 até 1676 ng de estanho por grama na Costa Adriática da Croácia (FURDEK et al., 2012). Ainda sim, o TBT se apresenta como o organoestânico mais importante, uma vez que o processo de sedimentação atrasa a sua degradação em décadas (SOUSA et al., 2014).

A França foi o primeiro país a tomar medidas regulatórias no ano de 1982, proibindo o TBT em pequenas embarcações, seguido da Inglaterra em 1985 (KEITHLY; CARDWELL; HENDERSON, 1999). A partir de 1988, a Organização Marítima Internacional (OMI) formou comitês para estudos mais aprofundados a respeito dos impactos causados no meio ambiente e os riscos para a saúde humana (SVENSSON, 2011). Posteriormente aos estudos emitidos por esses comitês, em 2001, a OMI determinou a proibição de novas aplicações de tintas anti-incrustantes contendo TBT em embarcações a partir de 2003 e, a partir de 2008, também a remoção de todos os revestimentos de embarcações no mundo que continham tal composto (CHAMP, 2001).

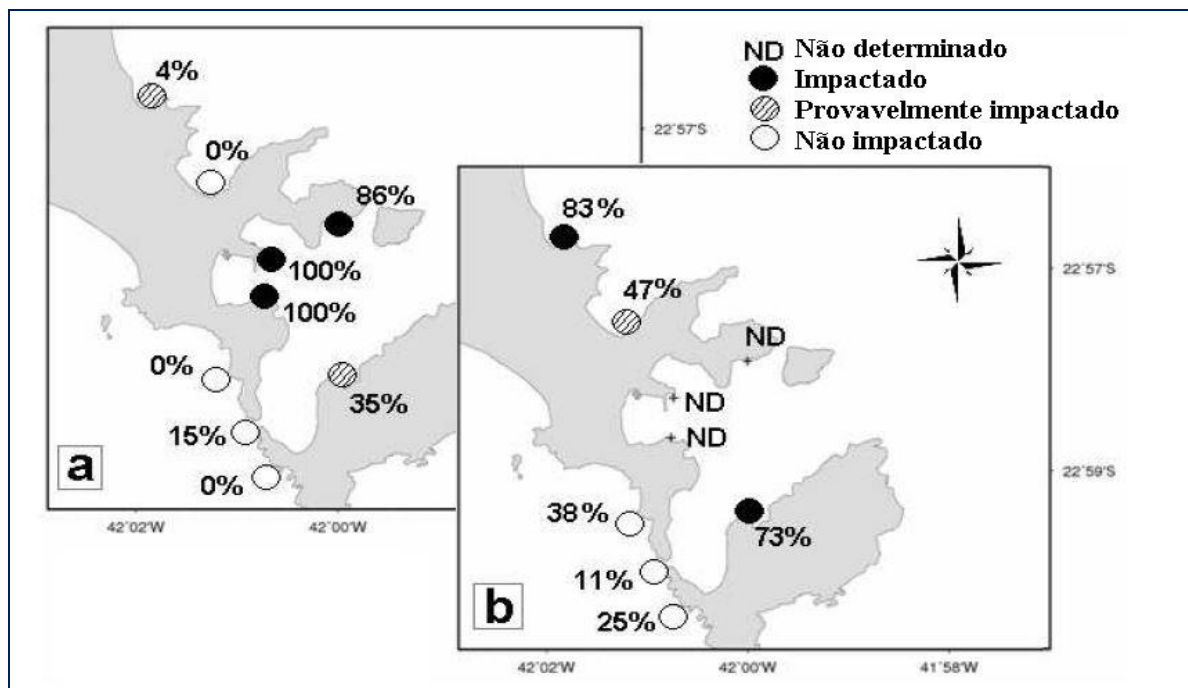
No Brasil, a Marinha do Brasil (autoridade marítima nacional), emitiu em 2007 a NORMAM-23 que proibiu a utilização de biocidas COEs em tintas em todo território nacional. A partir daí, as embarcações foram obrigadas a apresentar o “Certificado de



conformidade para sistema anti-incrustante” emitido pela própria Marinha após vistorias das embarcações por órgãos regulamentados (NORMAN23/DPC) (BRASIL, 2007).

Ainda no Brasil, alguns estudos avaliaram a contaminação de ambientes marinhos por TBT. Na Bahia, foram encontrados gastrópodes com imposex em 7 das 8 estações avaliadas. No Rio de Janeiro, em Paraty, foi observado um aumento da presença de imposex em moluscos comparando-se os anos de 2004 e 2011 (BORGES et al., 2013); em Arraial do Cabo também foi observado um aumento de animais com essa condição (Figura 2) (TOSTE et al., 2011). Ambos os estudos avaliaram o mesmo gastrópode (*Stramonita haemastoma*) e ressaltam que, mesmo após a proibição do uso do TBT, a presença de imposex foi maior, ainda que fosse observada uma redução no início das medidas de restrições de uso. Outro estudo, na costa do Espírito Santo, indicou níveis elevados de contaminação por TBT nos primeiros anos do estudo, entre 2007 a 2011, seguido de uma melhoria do estado ecológico nos últimos dois anos (2017 e 2018). Esses resultados indicam que o litoral capixaba ainda está contaminado com TBT, principalmente em áreas próximas a portos e atividades pesqueiras (FRANÇA et al., 2021)

Figura 2 – Distribuição do percentual de gastrópodes fêmeas afetadas por imposex (% de fêmeas afetadas) e respectiva avaliação estatística em 2001 (a) e 2008 (b) em Arraial do Cabo, RJ



Fonte: Adaptada de TOSTE et al., 2011.

Muito embora haja uma grande preocupação com os efeitos tóxicos de TBT em organismos aquáticos, mais dados sobre seu acúmulo e implicações ecotoxicológicas ainda são necessários. Além disso, não há um consenso igualitário mundial a respeito das regulamentações que proíbem o uso de tintas anti-incrustantes a base de TBT e outros COEs, dificultando a fiscalização e possibilitando a livre travessia de embarcações contendo anti-incrustantes a base desses compostos para países onde seu uso foi erradicado, impactando, dessa forma, regiões que supostamente já teriam evitado e/ou reduzido contaminações (CHAMP, 2003).

A toxicidade do TBT está documentada desde a década de 70 e foi comprovada a partir de estudos em organismos marinhos e modelos experimentais (BLABER, 1970; TRUHAUT, 1976; ALDRIDGE, 1977). No final da década de 90, diversos estudos demonstraram também a presença de TBT em amostras de sangue e fígado de humanos (TAKAHASHI et al, 1999; KANNAN; SENTHILKUMAR; GIESY, 1999).

Invertebrados marinhos em estágios iniciais do desenvolvimento têm sido utilizados como biomarcadores de qualidade biológica da água, uma vez que são muito mais sensíveis ao efeito toxicológico do TBT (LIMAVERDE et al, 2007). Larvas de peixes, por exemplo, são sensíveis ao TBT em uma faixa de  $0,05 \text{ ng/mL}^{-1}$  (FENT, 1996).

Para humanos, a dose considerada segura para exposição ao TBT varia em torno de 250ng a 300ng por dia (AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS, 1997); ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1990). Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), a concentração em que há um Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (no inglês, *No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) é de 0,0003mg/kg, com base no peso corporal e em estudos em animais e humanos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1998).

Após a exposição ao TBT, ele é convertido à dibutilestanho, monobutilestanho e estanho inorgânico no fígado, como demonstrado em estudos com roedores e humanos (OHHIRA; WATANABE; MATSUI et al., 2003). As enzimas do citocromo (CYP) P450, superfamília de proteínas envolvidas na síntese e no metabolismo de drogas e toxinas, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4 são responsáveis por metabolizar o TBT a partir de uma reação de alquilação (OHHIRA; ENOMOTO; MATSUI et al., 2006). O TBT se distribui de forma desigual, tendo sido detectado principalmente em tecidos como cérebro, fígado, gordura, rins, baço, músculos e sangue (COOKE, 2006).0

Na literatura são encontrados diversos estudos sobre os efeitos do TBT nocivos à saúde, entre os quais podem se destacar o efeito obesogênico (DE ARAÚJO et al., 2018;

KIRCHNER et al., 2010; LI; BLUMBERG et al., 2011), danos ao DNA a partir de aumento do estresse oxidativo (ZHANG et al., 2017), redução da expressão gênica e proteica da enzima aromatase (HEIDRICH; STECKELBROECK; KLINGMULLER, 2001; SAITOH et al., 2001), redução de níveis de estradiol e aumento de testosterona (OMURA et al., 2001), alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, permitindo saída do citocromo c e iniciando a apoptose (NISHIKIMI et al., 2001), redução dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) (MARINOVICH; VIVIANI.; GALLI, 1990; NISHIKIMI et al., 2001) e alteração de múltiplos receptores nucleares, por exemplo, os receptores de retinóides (BAKER et al., 2015).

O TBT é uma substância nociva mesmo em baixas concentrações. Estudos em roedores mostram seus malefícios e toxicidade em mamíferos. Em camundongos machos, a gavagem de TBT na concentração de 5 µg/kg de peso corporal durante 45 dias, uma vez a cada 3 dias, foi capaz de induzir o aumento do peso corporal e a porcentagem de massa gorda, além de aumentar os níveis de insulina e leptina (que também ocorre nas dosagens de 0,5 e 50 µg/kg). No fígado desses mesmos animais foram observadas inclusões de gotículas lipídicas, cujo volume foi aumentado de forma dose dependente. Além disso, o TBT foi capaz de induzir a degeneração citoplasmática dos hepatócitos (ZUO et al., 2011). Zuo et al. (2014), utilizando as mesmas doses de TBT (0,5, 5 e 50 µg/kg) mas por um período de 60 dias, observaram aumento da glicemia dos animais em todas as concentrações de exposição. Apesar disso, detectaram redução dos níveis de glucagon e insulina no soro. Os níveis de estradiol e triiodotironina (T3) também foram reduzidos, enquanto uma elevação nos níveis de testosterona foi observada (ZUO et al., 2014). Estudos toxicológicos em roedores demonstram que a exposição ao TBT em uma faixa de concentração que varia de 100 ng a 100 mg/kg induzem disfunções reprodutivas, renais, neurais e imunológicas (MERLO et al. 2018).

O TBT foi também descrito como adipogênico em camundongos (GRÜN et al., 2006). Além disso, foram observadas alterações dose-dependentes na resposta ao estrogênio no rim, epidídimo e tecido adiposo marrom (PENZA, 2011). O TBT é capaz de alterar a ação das enzimas relacionadas com a esteroidogênese ovariana por inibir competitivamente a enzima aromatase (uma enzima da via do citocromo P450 envolvida na conversão de testosterona em estradiol), diminuindo a conversão de andrógenos em estrógenos (OMURA et al., 2001; DELGADO FILHO et al., 2011), aumentando os níveis de testosterona e prejudicando o desenvolvimento sexual de ratos (GROTE et al., 2004). A exposição de roedores ao TBT está relacionada com a redução do tamanho de órgãos reprodutivos em machos e fêmeas e altera a esteroidogênese em gametas (GROTE et al., 2004; OGATA et al., 2001; OMURA et al., 2001;

SI et al., 2015), além de causar disfunções reprodutivas, como ciclicidade estral anormal e modificações na morfofisiologia do ovário (DELGADO FILHO et al., 2011; GRACELI et al., 2013; PODRATZ et al., 2012). Em diferentes concentrações, o TBT é responsável por modificar a função de tecidos endócrinos, como pâncreas, hipófise, gônadas e tireoide (LEBLANC, 1998; OBERDÖRSTER; RITTSCHOF; WADA et al., 1982; VOS et al., 2000). A exposição ao TBT foi também relacionada ao desenvolvimento de fatores de riscos cardiovasculares (RODRIGUES et al., 2014; SANTOS et al., 2012)

Após a exposição *in útero* ao TBT na dose de 25 µg/kg em roedores, foram observados diminuição de peso materno e da prole, bem como retardo de crescimento e na abertura ocular na prole fêmea (MAKITA et al., 2003). A exposição ao TBT nas doses de 10 e 20 mg/kg, também *in útero*, foi capaz de reduzir o número de células germinativas e regrediu a maturação sexual de ratos de ambos os sexos (KISHTA et al., 2007).

Distúrbios nas fases iniciais da vida estão intimamente associados com o desenvolvimento de obesidade, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. A hipótese conhecida como “*Developmental Origins of Health and Disease*” (DOHaD), relaciona a influência de determinados fatores ambientais do início da vida com alterações na expressão da carga genética do indivíduo, determinando um padrão de saúde-doença (BARKER, 2002; LI et al., 2011). As fases de gestação e lactação, são períodos de grande intensidade nos processos de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (MARKAKIS et al., 2002), e por isso de grande vulnerabilidade a alterações nutricionais, hormonais e/ou ambientais que podem programar a prole para graves distúrbios metabólicos na vida adulta.

Um dos primeiros estudos demonstrando essa hipótese foi desenvolvido por David Barker et al. a partir de estudos que avaliaram dados de homens filhos de mulheres que passaram pelo período da fome Holandesa durante a Segunda Guerra Mundial. Esses autores demonstraram que a desnutrição materna induzia baixo peso no nascimento e isso estava diretamente relacionado ao aumento da susceptibilidade de desenvolver doenças na vida adulta, principalmente doenças coronárias, hipertensão e dislipidemia (BARKER, 1992; BARKER et al., 1993; BARKER; MARTYN, 1992; ROSEBOOM et al., 2000, 2001). A desnutrição materna prioriza a transferência de nutrientes para o feto, induzindo adaptações que favorecem o desenvolvimento e maturação de órgãos essenciais à sobrevivência. Essas adaptações levam a um “fenótipo poupador”, no qual o indivíduo que se mantém sob as mesmas condições durante a vida se desenvolve normalmente, no entanto, quando há uma mudança entre os ambientes pré- e pós-natal, o indivíduo apresenta mudanças que predispoem ao desenvolvimento de doenças crônicas (BARKER, et al., 1993; HALES; BARKER, 1992).

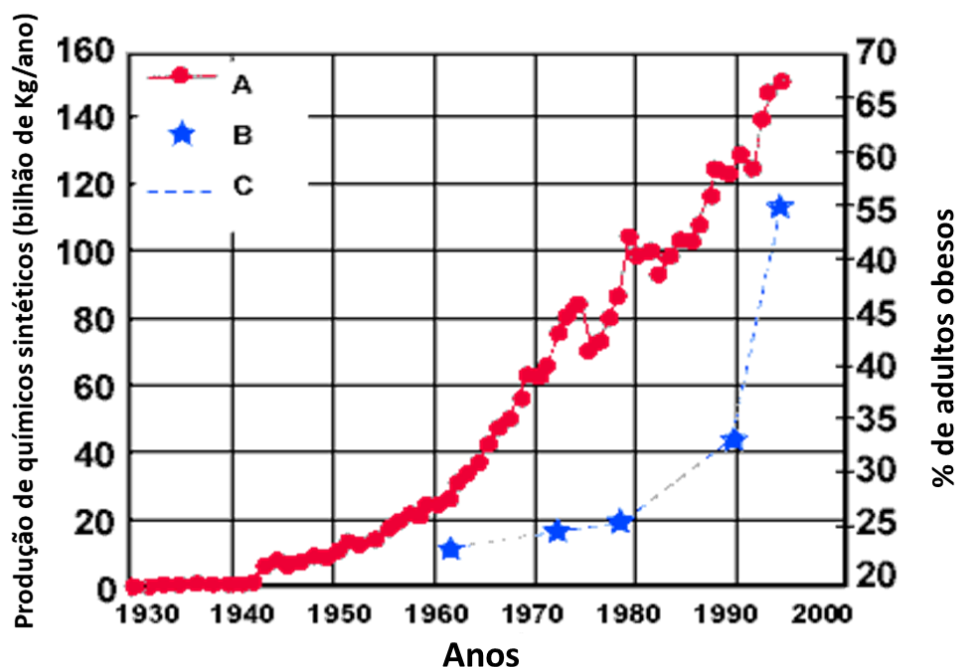
Os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem não são totalmente esclarecidos, mas podem envolver alterações epigenéticas como metilação do DNA, modificações do padrão de histonas ou de RNAs não codificantes (MEANEY et al., 2005; PHILIPPEN et al., 2015).

Embora o estudo do DOHaD tenha se iniciado com foco em nutrição materna, diversos estudos com foco em outros tipos de insultos surgiram. Dessa forma, assim como os efeitos dos insultos nutricionais durante as fases iniciais da vida, existem casos em que exposições ao estresse, drogas e químicos ambientais durante o desenvolvimento podem levar a um feto de aparência normal que desenvolve mudanças funcionais em tecidos específicos, resultando no aumento da suscetibilidade à doenças e/ou disfunções metabólicas (HEINDEL et al., 2015).

Em 2002, Baillie-Hamilton publicou um artigo que despertou o interesse na relação entre programação metabólica e os desreguladores endócrinos. A autora relatou que o aumento de toxinas químicas sintéticas poderia explicar a epidemia global de obesidade, como traduzido de seu artigo:

Pode-se afirmar que a presença relativamente recente de produtos químicos sintéticos no meio ambiente pode ser um fator causal significativo na atual epidemia mundial de obesidade. Esses produtos químicos podem estar causando ganho de peso por meio de efeitos tóxicos nos mecanismos naturais de controle de peso do corpo (BAILLIE-HAMILTON et al., 2002) (Figura 3).

Figura 3 – Produção de produtos químicos sintéticos em relação a porcentagem de adultos com sobrepeso nos Estados Unidos da América durante o século XX



Legenda: A= produção de produtos químicos; B= % de adultos com sobrepeso; C= Interpolação da % de adultos com sobrepeso.

Fonte: HSU-LEBLANC, 2017.

Desde o início da década de 70, muitos artigos demonstraram que a exposição química ambiental em roedores poderia desencadear o aumento de peso corporal. Porém, os autores não consideravam a alteração de peso como um resultado importante relacionado a toxicidade (HEINDEL, 2019). Somente mais tarde a hipótese de que os produtos químicos sintéticos poderiam levar a obesidade foi comprovada e produtos como pesticidas organoclorados, carbamatos, ftalatos, BPA, metais pesados e outros foram de fato associados a doenças metabólicas (HEINDEL et al., 2017).

Alguns desreguladores endócrinos foram, de fato, primeiramente relacionados ao desenvolvimento da obesidade e, portanto, são chamados de obesogênicos (GRÜN et al., 2006). No entanto, em 2015 a Declaração de Consenso de Parma propôs uma modificação do termo para “hipótese química da desregulação do metabolismo” (no inglês, *metabolism disrupting chemical hypothesis*), confirmando que substâncias químicas promovem alterações metabólicas importantes que podem desencadear, além de obesidade, diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica, dentre outras (LIU; PETERSON, 2015).

Como descrito nesta dissertação, muitas são as substâncias capazes de atuar como desreguladores endócrinos e muitas dessas substâncias, se expostas durante as fases iniciais do desenvolvimento como gestação e lactação, podem desencadear disfunções na vida adulta (como exemplos já citados anteriormente: pesticidas, componentes de plásticos, metais e os COEs). Aqui, vamos tratar da relação dos COEs com a programação metabólica, mais especificamente do TBT.

O TBT foi descrito como uma substância obesogênica que age como um agonista exógeno do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, PPAR $\gamma$  (no inglês, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), e induz a diferenciação de adipócitos e altera o metabolismo lipídico (PEREIRA-FERNANDES et al., 2013). Exposições tanto *in vitro* quanto *in útero* demonstraram tais efeitos do TBT (GRÜN, 2006).

A exposição de camundongos do 1º ao 8º ou 13º dia gestacional levou a um aumento do número de embriões reabsorvidos e a uma redução no peso do feto no 13º dia de gestação. Além disso, reduziu significativamente o peso, aumentou a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e de espécies reativas de oxigênio e reduziu a atividade de enzimas antioxidantes na placenta das mães expostas ao TBT, nas doses de 0,2 e 2 mg/kg de peso corporal (pc) ao dia (LIU et al., 2021).

A exposição materna 7 dias antes do acasalamento a baixos níveis de TBT (0,53, 5,3 53  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) na água de beber, considerados níveis ambientalmente relevantes, dado que a exposição de humanos ao TBT está abaixo da faixa de 250ng/kg/dia, induziu aumento dos depósitos de gordura, tamanho e quantidade de adipócitos e acúmulo de lipídios hepáticos nas três gerações subsequentes à geração exposta (CHAMORRO-GARCÍA et al., 2013). Outros estudos também demonstraram uma relação com o aumento da deposição de gordura no nascimento na prole de mães que receberam TBT durante a gestação (GRÜN et al., 2006). A administração oral de TBT também foi capaz de promover hiperglicemia acompanhada de uma redução significativa dos níveis séricos de insulina, além de uma redução da proliferação celular das células  $\beta$ -pancreáticas de camundongos machos (ZUO et al., 2014).

Decherf et al. (2010), demonstraram que a exposição pré-natal ao TBT em camundongos induz hipertireoidismo na prole, enquanto que um tratamento agudo em mães lactantes induz a um aumento da transcrição de hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (DECHERF et al., 2010)

Embriões de Zebrafish expostos ao TBT em concentrações subtóxicas de 0 a 72 horas após a fertilização apresentaram hipermetilação do gene da enzima aromatase, *CYP19A2*,

demonstrando que há uma relação direta da exposição ao TBT em estágios iniciais do desenvolvimento com alterações epigenéticas (BOUWMEESTER et al., 2016).

Em 2014, um estudo em humanos demonstrou que existe uma tendência de maior ganho de peso apenas do nascimento aos 3 meses de idade em relação ao aumento da concentração de TBT na placenta. No entanto, os autores relatam que esses resultados devem ser interpretados com cautela porque os efeitos obesogênicos em experimentos com animais foram observados após exposições *in utero* com TBT a doses que foram ordens de magnitude mais altas (RANTAKOKKO et al., 2014). Embora alguns estudos tenham demonstrado os efeitos da exposição ao TBT durante as fases de gestação e lactação em diferentes modelos experimentais e doses, não há estudos que relataram o efeito programador desse desregulador endócrino na adolescência.



## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Geral**

O objetivo geral deste estudo é estudar os efeitos da exposição de mães ao TBT, durante a gestação e lactação, sobre aspectos biométricos e bioquímicos das mães e proles machos e fêmeas, no nascimento, desmame e na adolescência.

### **1.2 Específicos**

Os objetivos específicos são:

- a) investigar nas mães: a composição bioquímica do leite (colesterol, triglicerídeos, lactose e proteína) e seu valor energético;
- b) investigar nas mães e nas proles machos e fêmeas: peso e composição corporal; ingestão alimentar; glicemia; acúmulo de gordura visceral; perfil lipídico (triglicerídeos e colesterol sérico);
- c) avaliar o perfil hormonal (insulina e leptina) no leite e plasma de mães expostas ao TBT e também no plasma das proles;
- d) avaliar a tolerância à glicose nas proles adolescentes de ambos os sexos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Ética

Este protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA nº 010/2019), conforme o ANEXO. Todos os animais foram mantidos em biotério sob condições controladas de temperatura e ciclo claro escuro (7:00-19:00h) recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*.

### 2.2 Modelo experimental

Ratas fêmeas Wistar foram acasaladas na proporção de 2 fêmeas para 1 macho. Durante o acasalamento, diariamente, foi feito lavado vaginal das fêmeas para observação do plug vaginal e presença de espermatozoides. Uma vez detectada a prenhez, as fêmeas foram alocadas em caixas individuais e ao nascimento (PN0), as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes (3 machos e 3 fêmeas, quando possível) para cada mãe com o objetivo de maximizar o potencial lactotrófico.

No 7º dia de gestação, as mães foram randomicamente selecionadas para as seguintes exposições: controle (Controle) (n=6), que recebeu solução veículo (etanol 0,01%), TBT 100ng (n=5), que recebeu TBT na dose de 100ng/kg pc/dia e TBT 1000ng (n=8), que recebeu TBT na dose de 1000ng/kg pc/dia por gavagem intragástrica até o 21º dia de lactação. O sétimo dia foi selecionado para que fossem evitadas mortes fetais. Durante todo o período de gestação e lactação o peso corporal das mães foi avaliado diariamente enquanto que o consumo alimentar materno foi avaliado de 2 em 2 dias. Além disso, a glicemia das mães foi acompanhada a cada 7 dias durante o período de gestação e lactação.

Para as proles, ao PN0, avaliou-se o peso corporal, o comprimento naso-anal (CNA) e a glicemia apenas dos filhotes remanescentes. A glicemia foi avaliada através de glicosímetro, a partir do sangue do animal após sacrifício por decapitação (n=6 animais, 1 por grupo por sexo). O peso foi avaliado diariamente do nascimento aos 21 dias e dos 21 aos 45 dias a cada 2 dias por semana. O consumo foi avaliado dos 21 aos 45 dias 2 dias por semana. Para as

avaliações ao desmame (PN21) e adolescência (PN45), foram utilizados 2 filhotes em cada idade para cada grupo, sendo 1 de cada sexo por ninhada.

A data de abertura ocular da prole foi acompanhada visualmente, onde o dia 14 foi considerado como dia normal de abertura completa dos dois olhos (MAKITA et al., 2003).

### **2.3 Diluição do TBT**

A solução de cloreto de tributilestano (TBTCl) (pureza 96% e densidade=1,2 g/mL; Sigma-Aldrich®) foi mantida protegida da luz em recipiente fechado e revestida por papel alumínio em local fechado, sendo diluída em etanol 100%, em uma proporção de 1:100, obtendo-se uma solução de 11.520ng/mL. Outras duas diluições subsequentes foram feitas em água filtrada, também na proporção de 1:100, para a obtenção das doses de 100ng/mL e 1000ng/mL. A proporção final de etanol nas soluções de TBT em ambas as doses utilizadas foi de 0,001%, sendo essa porcentagem utilizada de etanol em água filtrada como veículo para a gavagem das mães do grupo Controle.

### **2.4 Coleta e avaliação da composição do leite**

Em PN20, as mães foram separadas dos filhotes por 2 horas para posterior coleta de leite. Para induzir a secreção de leite, 0,5mL de ocitocina sintética intraperitoneal (ip) (5UI/ml, UCB, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) foi administrada e, imediatamente após, as mães foram levemente anestesiadas com 0,2mL de tiopental sódico ip (THIOPENTAX®, 0,5g). O leite foi coletado em um microtubo, sendo as mamas torácicas e abdominais massageadas manualmente. Amostras de leite foram utilizadas para a quantificação de carboidratos, proteína total, colesterol total e triglicerídeos. O conteúdo de carboidratos foi quantificado por um método colorimétrico baseado na redução do ácido pícrico (PERRY; DOAN, 1950) (Vetec Química fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), utilizando a curva padrão de lactose sintética (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). O conteúdo de proteína total foi estimado pelo método colorimétrico descrito por Peterson (1977), usando albumina de soro bovino (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como padrão. O conteúdo de lipídios foi

determinado por método colorimétrico utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin, BH, Minas Gerais, Brasil). Amostras de leite materno também foram utilizadas para determinar o conteúdo de insulina por kit de ELISA específico para roedores, o que será descrito posteriormente.

## **2.5 Ressonância Magnética Nuclear – RMN**

A massa de gordura total e massa magra total (ou massa gorda livre), tanto das mães (no parto e no dia do desmame) quanto dos filhotes (PN21 e PN45), foram avaliadas usando a RMN para pequenos animais sem o uso prévio de anestesia. Em resumo, os animais foram digitalizados usando o equipamento (Minispec LF90 TD-NMR, Bruker, Rheinstetten, Alemanha). No dia do teste, foi realizada uma verificação de controle de qualidade de tensões internas, temperatura, ímãs e parâmetros da RMN usando um padrão fornecido pelo fabricante. Os animais foram colocados em um cilindro de plástico transparente (50 mm de diâmetro) e mantidos imóveis por um leve aperto pela haste no cilindro. O tubo foi então inserido na câmara de amostra do equipamento para varredura com duração de aproximadamente 2 min. O técnico da RMN foi cego quanto à atribuição do grupo. Os dados foram expressos em massa gorda total (g) e massa magra total (g).

## **2.6 Teste oral de tolerância à glicose – TOTG**

Em PN45, uma fêmea e um macho de cada ninhada por grupo foram submetidos a jejum noturno de 12 h e uma amostra de sangue basal foi colhida da ponta da cauda ( $T=0$ ). Em seguida, os ratos receberam 2g/kg de glicose 50% (Próquímicos, Rio de Janeiro, Brasil) dissolvida em água filtrada por gavagem intragástrica. Amostras de sangue adicionais foram obtidas aos 15, 30, 60 e 120 min. As concentrações de glicose no plasma foram registradas usando um glicosímetro portátil (ONETOUCH Select Plus Flex®, Johnson & Johnson Medical S. A., São Paulo, Brasil).

## 2.7 Eutanásia e coleta de tecidos

Parte das proles Controle, TBT100ng e TBT1000ng foram pesadas, o comprimento naso-anal (CNA) foi mensurado e posteriormente foram eutanasiadas no desmame (PN21) e outra parte na adolescência (PN45) por decaptação em guilhotina. O CNA e o peso corporal dos animais foram utilizados para o cálculo de massa corporal para roedores, o Índice de Lee (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Foram coletadas amostras de sangue em tubos previamente heparinizados e centrifugados ( $1500 \times g/20 \text{ min}/4^\circ\text{C}$ ) para obtenção do plasma, que foi mantido em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  para análises futuras.

Os estoques principais de tecido adiposo branco visceral (retroperitoneal, perigonadal e mesentérica), além de órgãos como adrenais, gônadas, cérebro, coração, baço, tireóide, tecido adiposo marrom (TAM), fígado e pâncreas foram dissecados, pesados e armazenados para avaliação de parâmetros biométricos e demais análises, tanto nas mães quanto na prole em ambas as idades e gêneros. Os dados foram expressos em gramas ou em porcentagem relativa de 100g de massa corporal.

## 2.8 Avaliações de parâmetros bioquímicos

O plasma obtido após a eutanásia foi utilizado para medir os níveis de triacilglicerol e colesterol total a partir de kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de insulina (plasma de mães e proles; leite materno) e leptina (plasma de mães e proles) foram determinadas a partir de kits ELISA (Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Germany. Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Cat. #EZRMI-13K; Rat Leptin Elisa Kit, Cat. #EZRL-83K). Os valores de sensibilidade de detecção para insulina variam entre 0,2 a 10ng/mL, enquanto os de leptina variam de 0,2 a 30ng/mL.

Os índices HOMA-IR e HOMA- $\beta$  (homeostasis model assessment of insulin resistance/  $\beta$ -cell function) foram calculados usando as seguintes fórmulas: (insulinemia de jejum [mUI/mL]  $\times$  glicemia de jejum [mg/dL])/22,5 e  $20 \times$  insulinemia de jejum (mUI/ml)  $\div$  (glicemia de jejum - 3,5), respectivamente (COHEN, 2006; PACINI; MARI, 2003).

## 2.9 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análises, foi utilizado Anova de uma via, seguida de pós-teste de Dunnet. Os grupos TBT foram comparados ao grupo Controle do mesmo sexo. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Para tais análises, utilizou-se o programa *GraphPad Prism* versão 6.0 para *Windows* (GraphPad Software©).

### 3 RESULTADOS

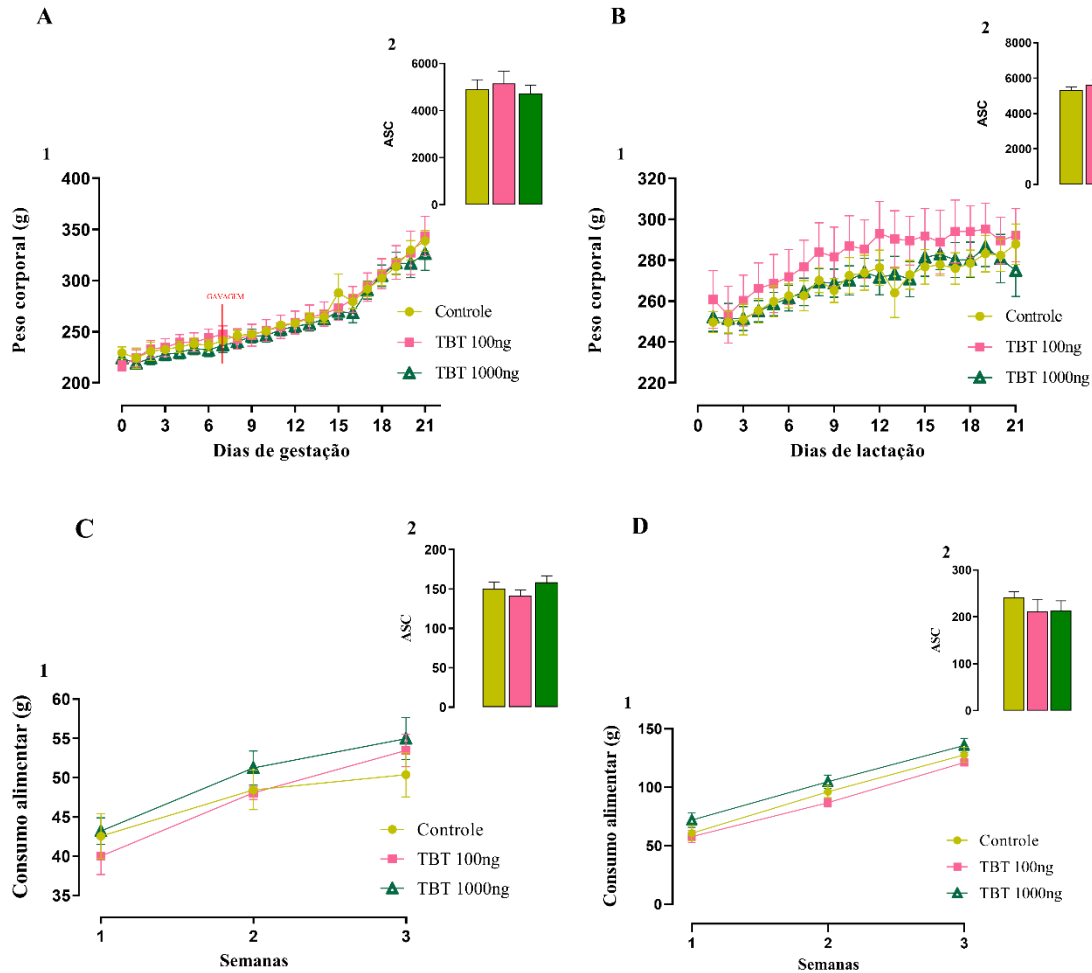
#### 3.1 Efeitos da exposição de TBT nas mães durante o período de gestação e lactação

##### 3.1.1 Peso corporal e consumo das mães durante o período de gestação e lactação

Durante o período gestacional não encontramos alterações significativas na evolução ponderal das mães expostas ao TBT em ambas as doses 100 e 1000ng (Figura 4 - 1A). O cálculo da área sob a curva (ASC) da evolução ponderal também não apresentou alterações significativas (Figura 4 - 1B). Não observamos alterações também para a evolução ponderal das mães durante a lactação (Figura 4 - 2A). O cálculo da área sob a curva (ASC) desse período não apresentou alterações também (Figura 4 - 2B).

O consumo materno não apresentou alterações durante a gestação (Figura 4 - 3A). O cálculo da área sob a curva (ASC) do consumo durante esse período não apresentou alterações (Figura 4 - 3B). Durante a lactação o consumo não apresentou alterações (Figura 4 - 4A). O cálculo da área sob a curva (ASC) do consumo desse período também não apresentou alterações (Figura 4 - 4B).

Figura 4 – Efeitos da administração de TBT, a partir do dia gestacional 7, na evolução ponderal e consumo das mães durante a gestação e a lactação



Legenda: gráfico A1: evolução ponderal das mães durante a gestação; gráfico A2: Área sob a curva (ASC) da evolução ponderal durante gestação; gráfico B1: evolução ponderal das mães durante a lactação; gráfico B2: área sob a curva (ASC) da evolução ponderal durante lactação. gráfico C1: evolução do consumo das mães durante a gestação; gráfico C2: área sob a curva (ASC) da evolução de consumo durante gestação. gráfico D1: evolução do consumo das mães durante a lactação; gráfico D2: área sob a curva (ASC) da evolução de consumo durante lactação; o dia inicial da gavagem está indicado no gráfico pela linha vertical no dia gestacional 7; o consumo é apresentado como a média dos dias avaliados a cada semana; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 1000ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

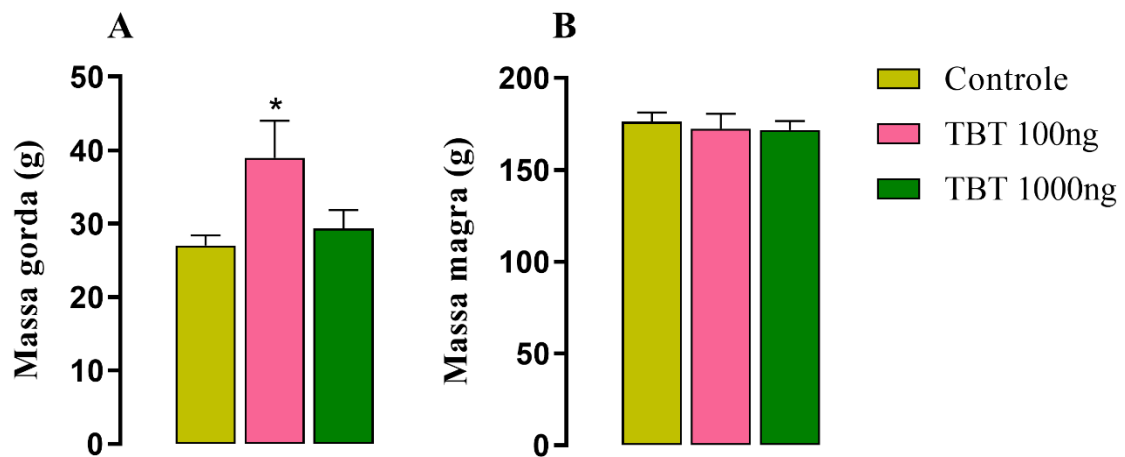
Fonte: O autor, 2021.



### 3.1.2 Avaliação de massa gorda e massa magra das mães por RMN no dia do parto

Observamos um aumento de 44% na massa gorda das mães expostas ao TBT na dose de 100ng no dia do parto comparado ao grupo Controle. Não observamos alterações na massa magra em ambas doses (Figuras 5A e 5B).

Figura 5 – Efeitos da administração de TBT na massa magra e massa gorda das mães, avaliadas por RMN, no dia do parto



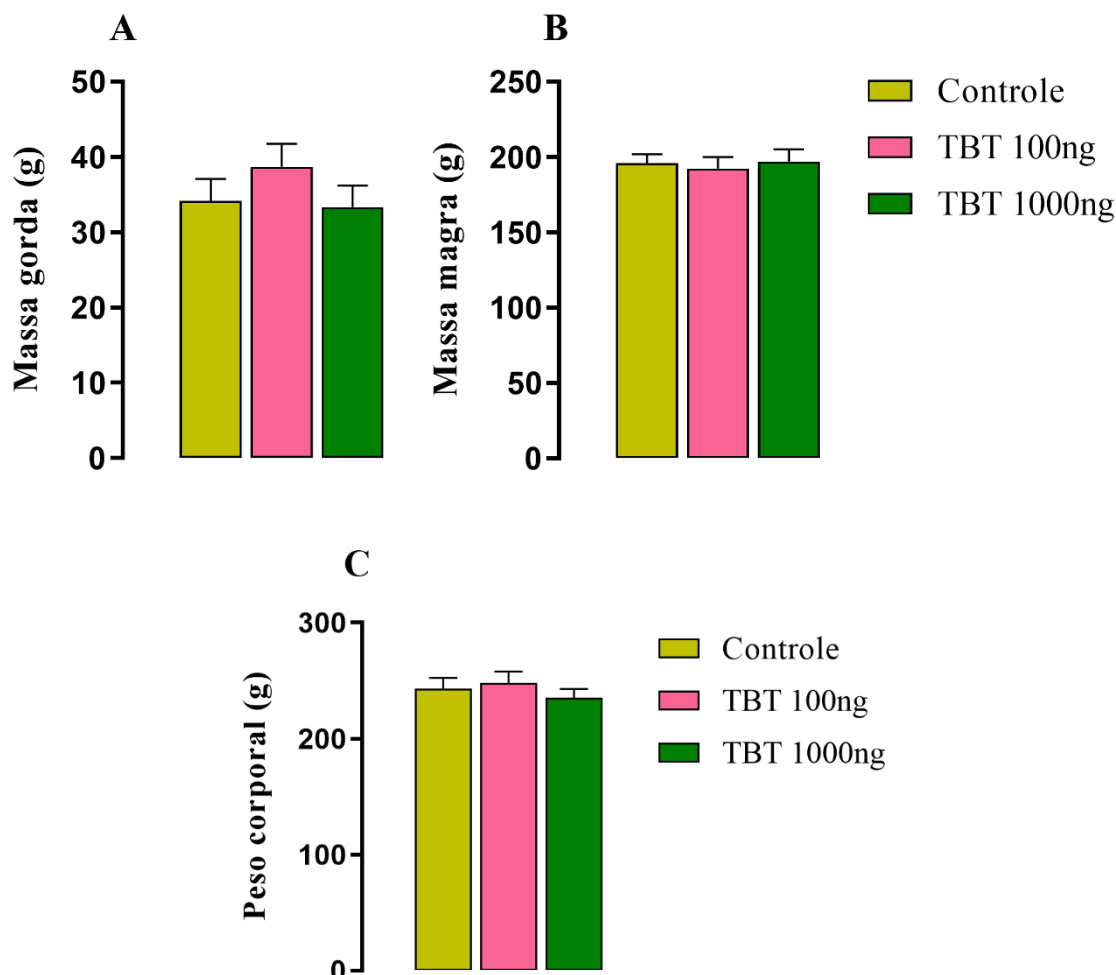
Legenda: gráfico A: massa gorda das mães em gramas no dia do parto; gráfico B: massa magra das mães em gramas no dia do parto; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; \*  $p < 0,05$  (Controle,  $n = 6$ ; TBT 100ng,  $n = 5$ ; TBT 1000ng,  $n = 8$ ).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.1.3 Avaliação de massa gorda e massa magra das mães por RMN no dia do desmame da prole

Não observamos diferenças significativas nas massas gorda e magra das mães expostas ao TBT em ambas as doses no dia do desmame da prole (PN21) (Figuras 6A e 6B). Também não observamos alterações no peso ao final da lactação (Figuras 6C).

Figura 6 – Efeitos da administração de TBT na massa gorda e magra das mães, avaliadas por RMN, no dia do desmame da prole e peso corporal ao final da lactação



Legenda: gráfico A: massa gorda das mães no dia do desmame da prole; gráfico B: massa magra das mães no dia do desmame da prole; gráfico C: Peso corporal das mães ao final da lactação; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

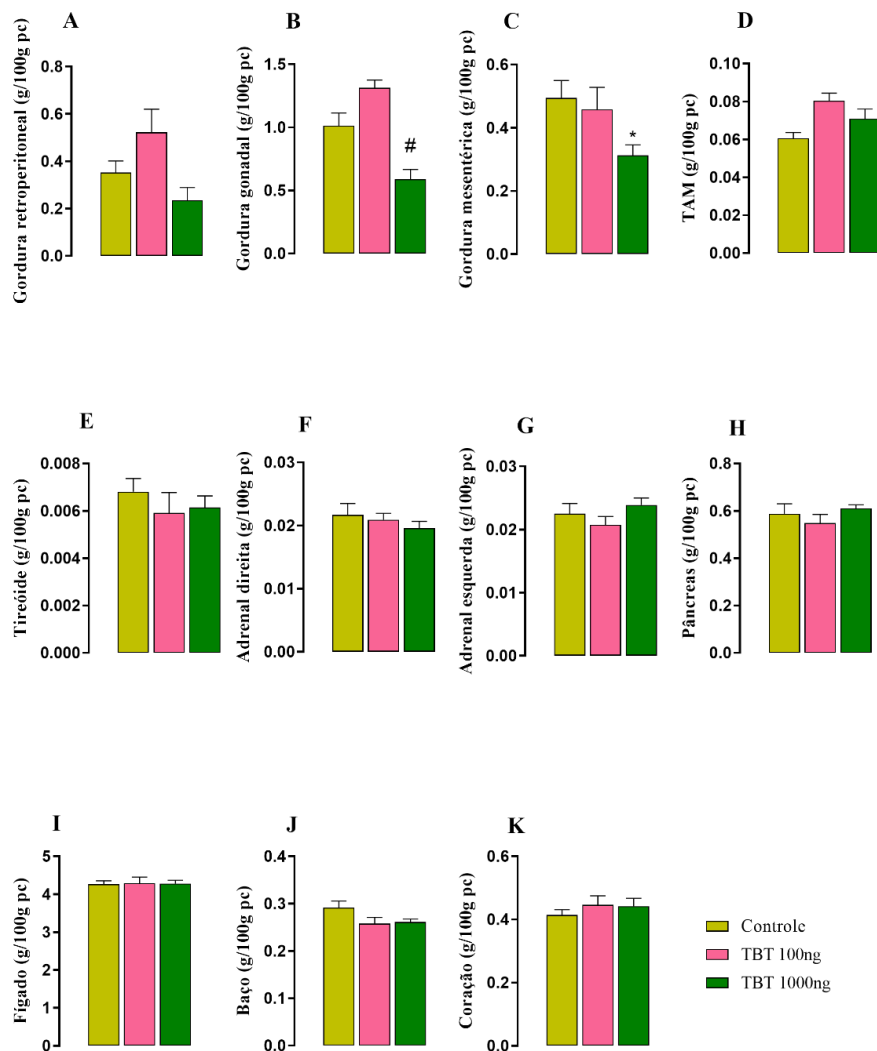
### 3.1.4 Efeito da exposição ao TBT no peso dos depósitos de gordura e órgãos das mães no dia do desmame da prole

A exposição ao TBT em ambas as doses durante os períodos de gestação e lactação não alterou os depósitos de gordura retroperitoneal das mães (Figura 7A). No entanto, observamos nas mães expostas a dose de TBT 1000ng uma redução de 37% e 43% nos

depósitos de gordura mesentérica e gonadal, respectivamente, como observado nas Figuras 7B e 7C.

Em relação ao peso do TAM, tireoide, adrenais, pâncreas, fígado, baço e coração das mães expostas ao TBT, não observamos diferenças significativas quando comparadas ao grupo de mães controle (Figuras 7D a 7K).

Figura 7 – Efeitos da administração de TBT no peso relativo dos órgãos e depósitos de gorduras das mães no final da lactação



Legenda: gráfico A: peso da gordura retroperitoneal; gráfico B: peso da gordura gonadal; gráfico C: peso da gordura mesentérica; gráfico D: peso do tecido adiposo marrom (TAM); gráfico E: peso da tireóide; gráfico F: peso da adrenal direita; gráfico G: peso da adrenal esquerda; gráfico H: peso do pâncreas; gráfico I: peso do fígado; gráfico J: peso do baço; gráfico K: peso do coração; os dados foram expressos em porcentagem relativa de 100g de massa corporal; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,0001$  (Controle,  $n = 6$ ; TBT 100ng,  $n = 5$ ; TBT 1000ng,  $n = 8$ ).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.1.5 Avaliação do perfil metabólico das mães

No plasma das mães, em DL21, não foram observadas alterações nos níveis de insulina, colesterol e triglicerídeos. Os índices HOMA-IR e HOMA- $\beta$  não apresentaram alterações em ambas as doses de TBT (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeitos da administração materna de TBT sob parâmetros metabólicos no sangue e no plasma das mães no dia do desmame da prole

Parâmetros	Mães		
	Controle	TBT100ng	TBT1000ng
Glicemia (DG7) (mg/dL)	122 $\pm$ 5,66	124,4 $\pm$ 8,84	120,7 $\pm$ 4,49
Glicemia (DG14) (mg/dL)	101,5 $\pm$ 2,28	103 $\pm$ 5,26	102,7 $\pm$ 3,52
Glicemia (DG21) (mg/dL)	98,8 $\pm$ 7,89	103,4 $\pm$ 7,82	119,2 $\pm$ 5,25
Glicemia (DL7) (mg/dL)	118,3 $\pm$ 8,29	114,5 $\pm$ 3,57	114,7 $\pm$ 6,25
Glicemia (DL14) (mg/dL)	113,5 $\pm$ 4,1	106,8 $\pm$ 3,07	113,8 $\pm$ 3,95
Glicemia (DL21) (mg/dL)	115,6 $\pm$ 5,22	106,6 $\pm$ 5,93	115,3 $\pm$ 6,83
Insulina (DL21) (ng/mL)	0,76 $\pm$ 0,1	0,69 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,04
Colesterol total (mg/ dL)	68,25 $\pm$ 9,48	76,72 $\pm$ 9,15	78,31 $\pm$ 7,14
Triglicerídeos (mg/dL)	76,25 $\pm$ 8,80	117,4 $\pm$ 16,59	78,83 $\pm$ 9,58
HOMA-IR	4,97 $\pm$ 1,81	3,83 $\pm$ 0,75	3,63 $\pm$ 0,79
HOMA- $\beta$	51,59 $\pm$ 12,11	57,46 $\pm$ 8,78	39,95 $\pm$ 10,01

Nota: DG dia gestacional; DL dia de lactação; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.1.6 Avaliação da composição do leite materno no dia do desmame da prole

A glicemia materna foi avaliada de 7 em 7 dias durante a exposição ao TBT. Não observamos alteração glicêmica nas mães expostas ao TBT em ambas as doses tanto nos dias gestacionais (DG) 7, 14 e 21 quanto nos dias de lactação (DL) 7, 14 e 21 (Tabela 2).

A exposição materna ao TBT na dose de 100ng/kg foi capaz de alterar a composição do leite materno, aumentando os níveis de proteína e colesterol total (+18% e + 74%;  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente) e reduzindo os níveis de lactose (-30%,  $p < 0,05$ ), sem alterações nos níveis de triglicerídeos ou insulina (Tabela 2). A exposição materna ao TBT na dose de 1000ng não alterou a composição do leite materno quando comparado ao Controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeitos da administração materna de TBT na composição do leite materno ao final da lactação

Parâmetros	Mães		
	Controle	TBT100ng	TBT1000ng
Proteínas totais (mg/mL)	10,08 ± 0,52	11,92 ± 0,63*	10,93 ± 0,35
Colesterol total (mg/dL)	289,4 ± 41,8	503,2 ± 57,9**	307,8 ± 37,8
Triglicerídeos (mg/dL)	3,782 ± 0,39	4,702 ± 0,46	4,441 ± 0,28
Lactose (mg/mL)	29,98 ± 2,40	20,95 ± 2,42*	23,24 ± 1,5
Insulina (ng/mL)	6,64 ± 0,88	7,47 ± 1,63	6,47 ± 0,7

Legenda: dados apresentados como média ± erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; \* p<0,05; \*\* p<0,01 (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.2 Efeitos da exposição materna ao TBT na prole

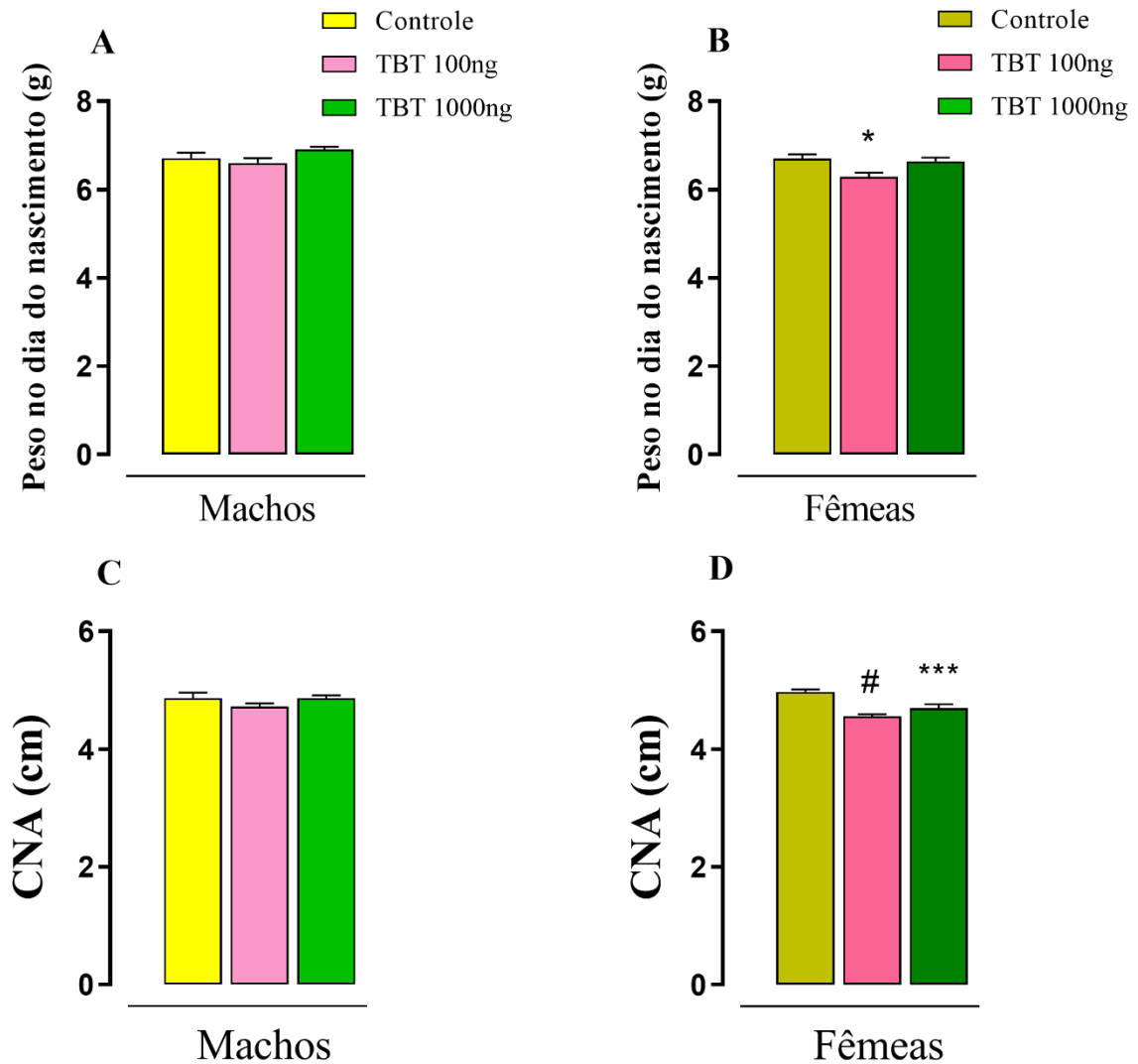
#### 3.2.1 Avaliação do peso corporal, comprimento naso-anal (CNA) e glicemia da prole no nascimento

A média de filhotes machos e fêmeas nascidos em cada grupo foi: Controle de 4 machos e 6 fêmeas; TBT 100ng de 4 machos e 6 fêmeas; TBT 1000ng de 4 machos e 4 fêmeas.

No dia do nascimento, o peso e o CNA da prole macho exposta ao TBT em ambas as doses não foram diferentes quando comparado à prole controle (Figuras 8A e 8C). Em contraste, a prole fêmea exposta ao TBT na dose de 100ng durante a gestação e lactação apresentou baixo peso ao nascer (-6%; p<0,05) enquanto a prole do grupo TBT1000ng não apresentou alterações (Figura 8 B). As fêmeas de ambos os grupos expostos ao TBT também apresentaram diferenças significativas em relação ao CNA (-8% vs TBT100ng; -6% vs TBT1000ng;) (Figura 8D).

Apesar de não terem sido encontradas alterações na prole macho ao nascimento, observamos na prole fêmea maior glicemia no grupo TBT1000ng quando comparado ao controle (+35% vs TBT100ng; p<0,05) (Figura 9 B).

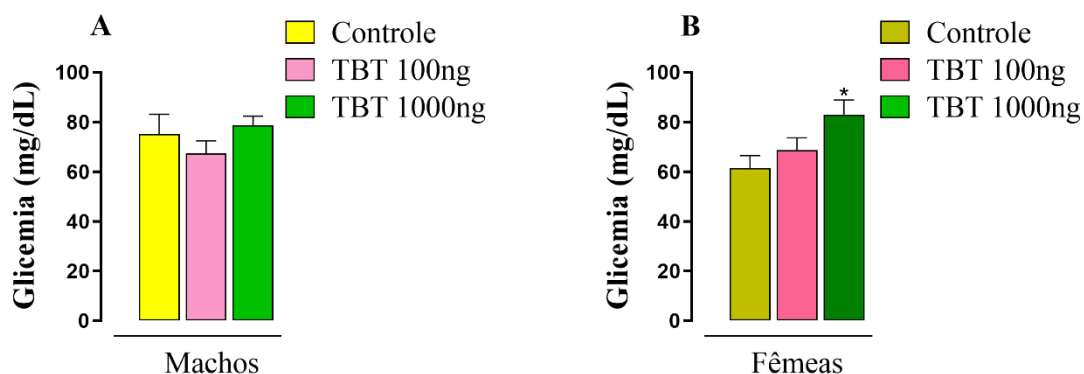
Figura 8 – Efeitos da administração materna de TBT no peso corporal e CNA no dia do nascimento da prole de ambos os sexos



Legenda: gráfico A: peso corporal da prole macho; gráfico B: peso corporal da prole fêmea; gráfico C: CNA da prole macho; gráfico D: CNA da prole fêmea; para as essas avaliações foram utilizados o n total de filhotes em PN0 com as ninhadas ajustadas para 6 filhotes; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; #  $p < 0,0001$  (n=6 filhotes por grupo).

Fonte: O autor, 2021.

Figura 9 – Efeitos da administração materna de TBT na glicemia no dia do nascimento da prole de ambos os sexos



Legenda: gráfico A: glicemia da prole macho; gráfico B: glicemia da prole fêmea; Para as avaliações de glicemia foram utilizados os filhotes remanescentes em P<sub>N0</sub>; dados apresentados como média ± erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; \*p>0,05 (n=6 animais de cada sexo, 1 de cada grupo).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.2.2 Avaliação da evolução ponderal da prole macho do nascimento ao desmame

Durante o período dos primeiros 21 dias de vida não encontramos alterações significativas na evolução de peso corporal da prole macho de mães expostas ao TBT em ambas as doses 100 e 1000ng (Figura 10A). O cálculo da área sob a curva (ASC) da evolução de peso corporal também não apresentou alterações significativas (Figura 10B).

Nesse período, observamos retardo na abertura ocular das proles expostas ao TBT em ambas as dosagens e sexos. O retardo foi de 1 dia no grupo TBT100ng e variou de 1 a 4 dias no grupo TBT1000ng. Cerca de 62 e 52% dos filhotes machos e fêmeas de mães expostas as doses de TBT 100ng e 1000ng, respectivamente, tiveram retardo na abertura ocular (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeitos da administração materna de TBT na data de abertura ocular da prole

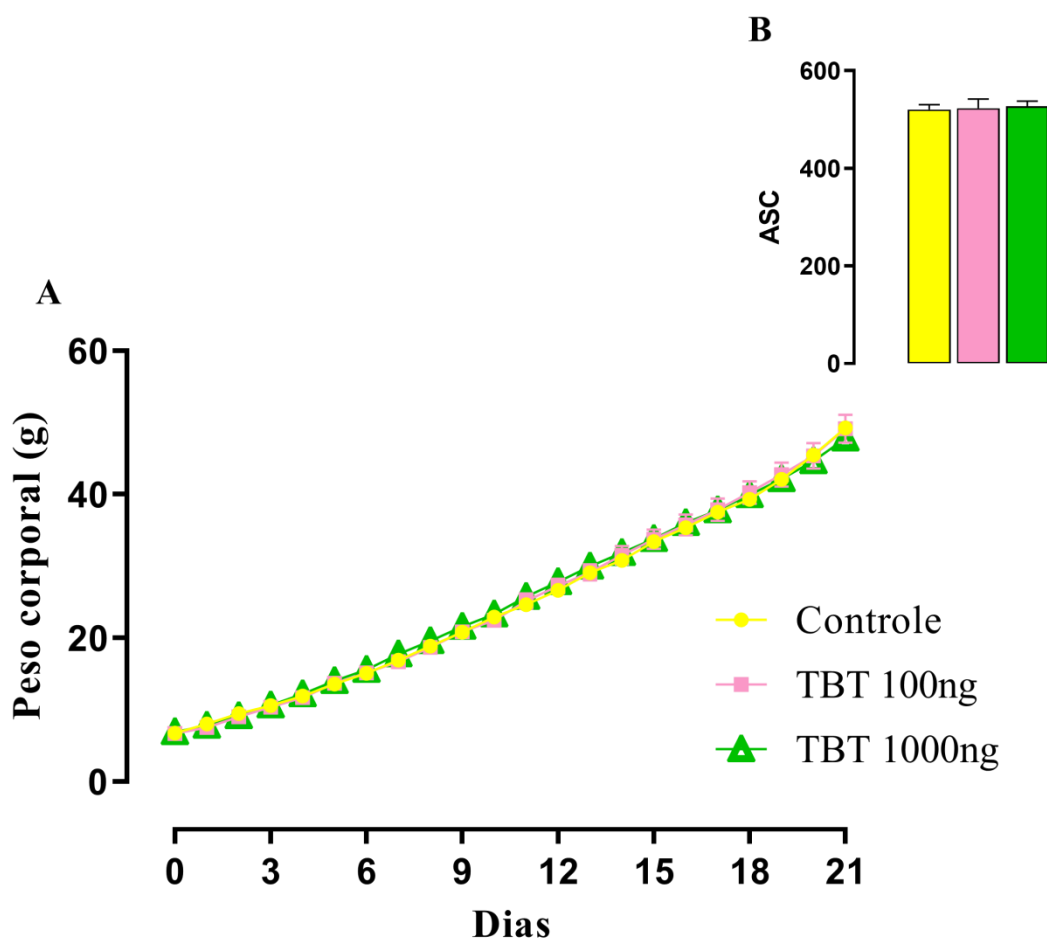
Animais	Proles	
Grupos / Sexos	Machos	Fêmeas
Controle	12/19 (63%)	13/17 (76%)
TBT 100ng	5/13 (38%)	6/16 (38%)
TBT 1000ng	9/22 (41%)	11/23 (48%)

Nota: quantidade de animais com abertura ocular até o 14º dia em comparação ao total de animais e seu percentual (Controle, n= 36; TBT 100ng, n= 29; TBT 1000ng, n=45).

Fonte: O autor, 2021.



Figura 10 – Efeitos da administração materna de TBT na evolução ponderal da prole macho do nascimento ao desmame



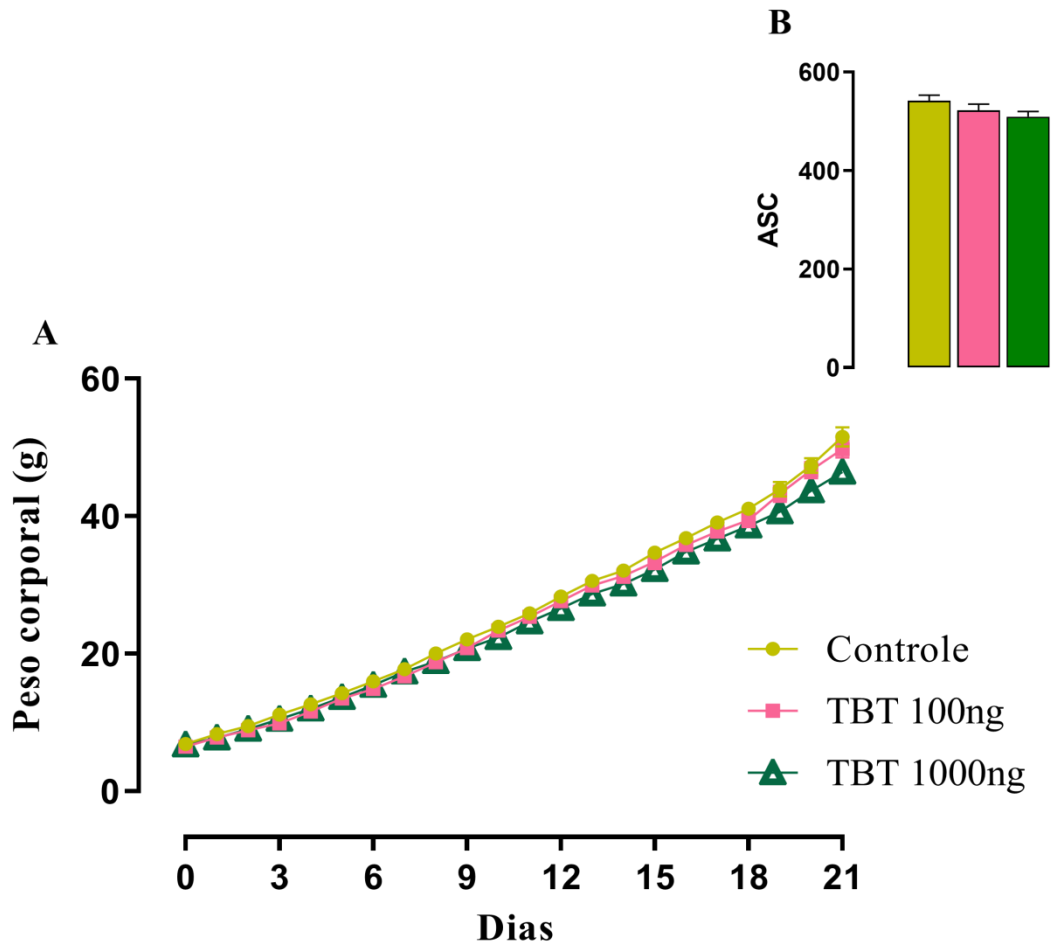
Legenda: gráfico A: evolução ponderal da prole macho; gráfico B: área sob a curva (ASC) da evolução de peso corporal; os dias se referem à idade dos animais; para essa avaliação, foi considerado o n total de filhotes machos em PNO por grupo; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle n= 19, TBT 100ng n= 13, TBT 1000ng n= 23).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.2.3 Avaliação da evolução ponderal da prole fêmea do nascimento ao desmame

Da mesma forma, não encontramos alterações significativas na evolução de peso corporal do nascimento ao desmame da prole fêmea de mães expostas ao TBT em ambas as doses 100 e 1000ng (Figura 11A). O cálculo da área sob a curva (ASC) da evolução de peso corporal também não apresentou alterações significativas (Figura 11B).

Figura 11 – Efeitos da administração materna de TBT, na evolução ponderal da prole fêmea do nascimento ao desmame



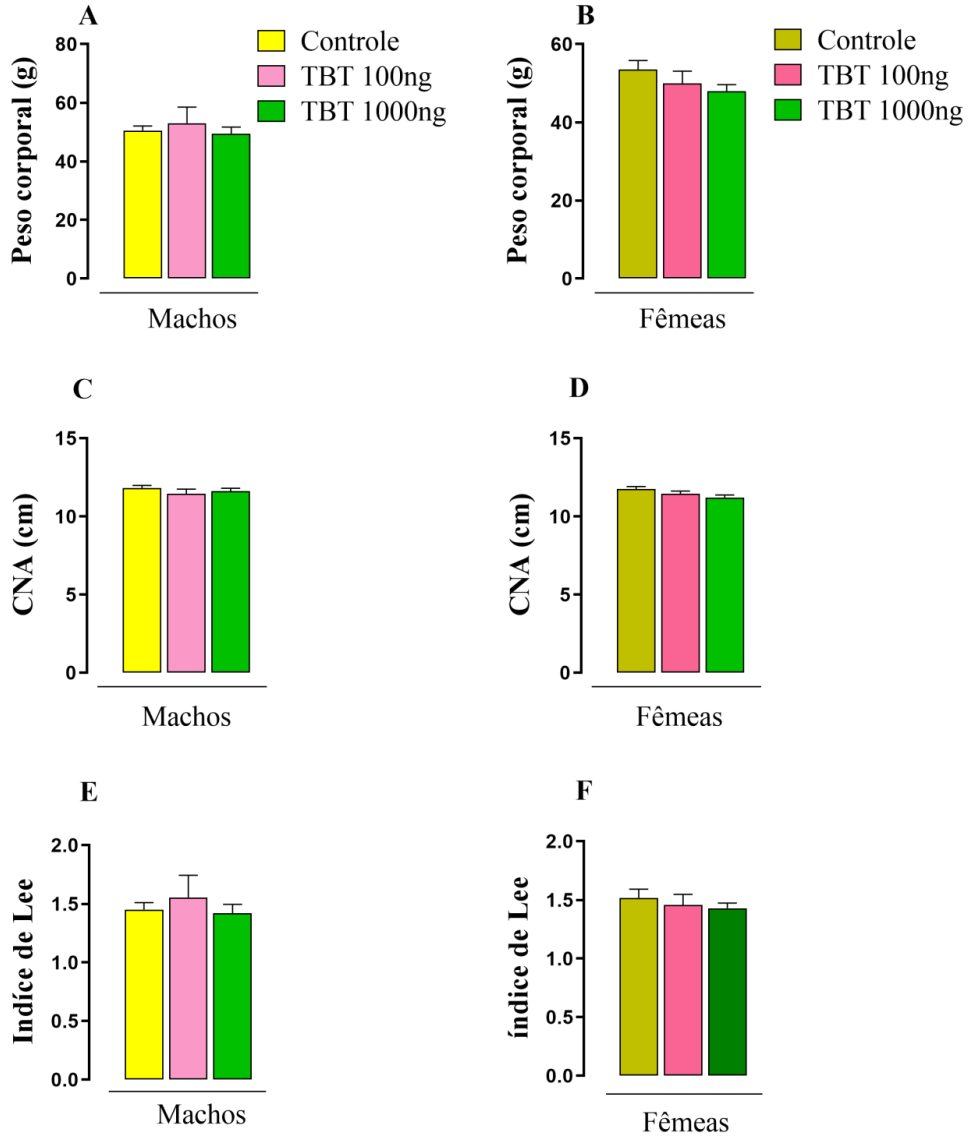
Legenda: gráfico A: evolução ponderal da prole fêmea; gráfico B: Área sob a curva (ASC) da evolução de peso corporal; os dias se referem à idade dos animais; para essa avaliação, foi considerado o n total de filhotes fêmeas em PN0 por grupo; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle n= 17, TBT 100ng n=16, TBT 1000ng n= 25).

Fonte: O autor, 2021.

#### 3.2.4 Avaliação do peso corporal, CNA e índice de Lee no desmame

Em PN21, não detectamos diferenças no peso corporal, CNA e nos valores do índice de Lee das proles de mães expostas ao TBT de ambos os sexos (Figuras 12A a 12F).

Figura 12 – Efeitos da administração materna de TBT no peso corporal, CNA e índice de Lee da prole de ambos os sexos no dia do desmame



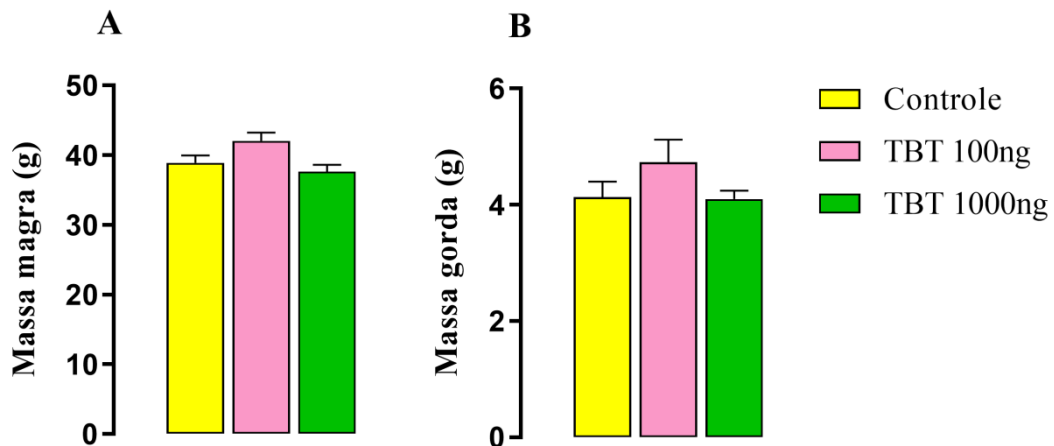
Legenda: gráfico A: peso da prole macho no dia do desmame; gráfico B: peso da prole fêmea no dia do desmame; gráfico C: CNA da prole macho; gráfico D: CNA da prole fêmea; gráfico E: índice de Lee da prole macho; gráfico F: índice de Lee da prole fêmea; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8, foram utilizados 2 filhotes por grupo, sendo 1 de cada sexo por ninhada).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.2.5 Avaliação da massa magra e massa gorda por RMN da prole macho no dia do desmame

A prole macho de mães expostas ao TBT em ambas as doses não apresentou diferença em relação ao peso das massas magra e gorda em PN21 em comparação a prole controle (Figuras 13A e 13B).

Figura 13 – Efeitos da administração materna de TBT, na massa magra e gorda prole macho no dia do desmame



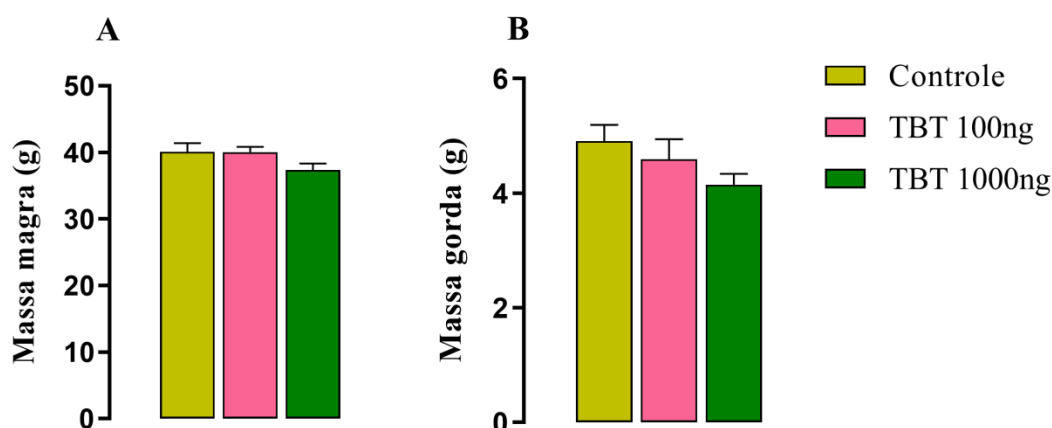
Legenda: gráfico A: massa magra da prole macho no dia do desmame; gráfico B: massa gorda da prole macho no dia do desmame; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.2.6 Avaliação da massa magra e massa gorda da prole fêmea no dia do desmame

Da mesma forma que a prole macho, as fêmeas cujas mães foram expostas ao TBT em ambas as doses não apresentaram diferenças em relação ao peso das massas magra e gorda em PN21 em comparação a prole controle (Figuras 14A e 14B).

Figura 14 – Efeitos da administração materna de TBT na massa magra e gorda da prole fêmea no dia do desmame



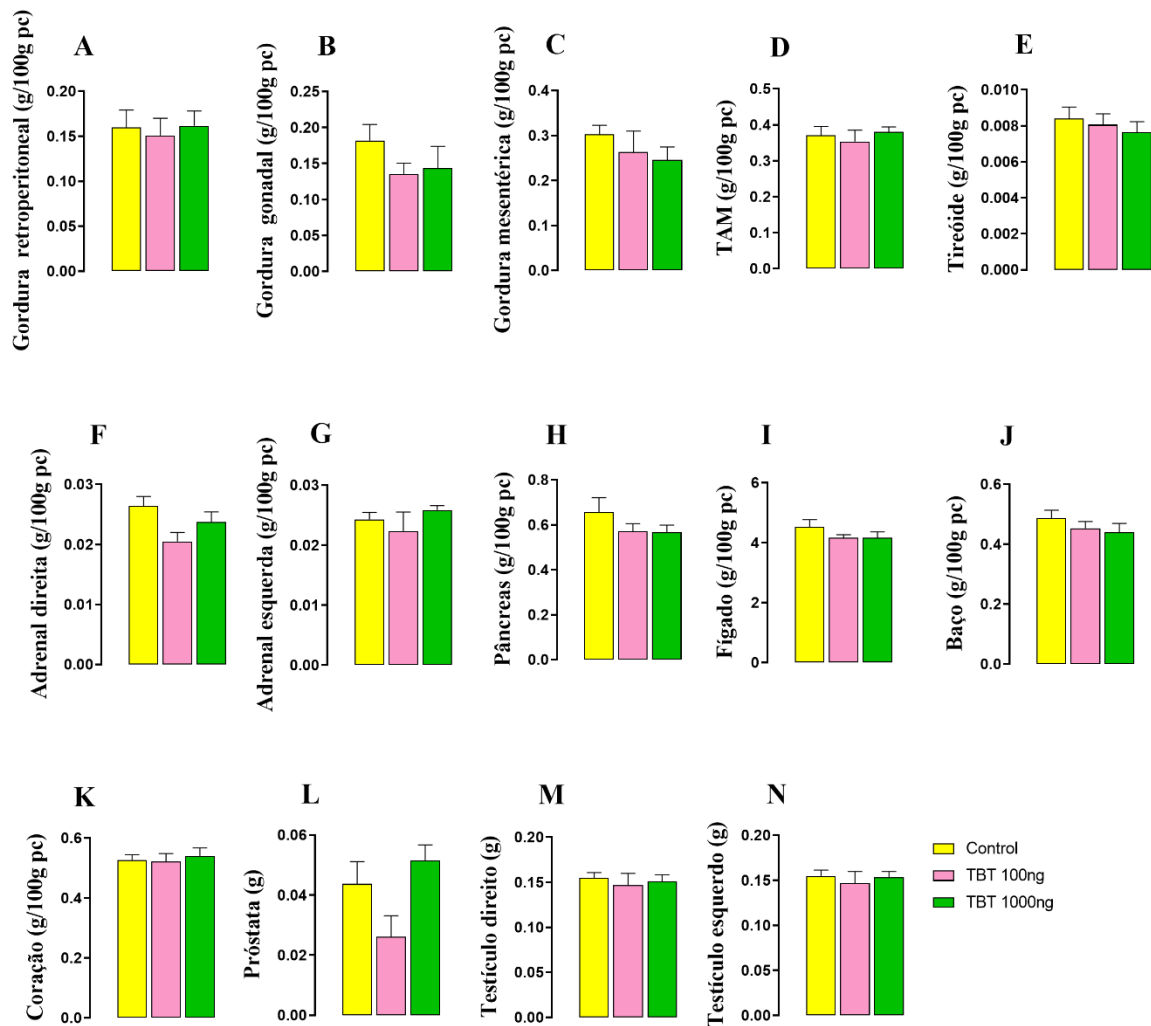
Legenda: gráfico A: massa magra da prole fêmea no dia do desmame; gráfico B: massa gorda da prole fêmea no dia do desmame; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.2.7 Avaliação do peso dos depósitos de gordura e dos órgãos da prole macho ao desmame

Nenhuma diferença significativa foi detectada nos pesos dos depósitos de gordura retroperitoneal, gonadal e mesentérica da prole macho de mães expostas em ambas as doses de TBT (Figuras 15A a 15C). Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas nos pesos relativos do TAM, tireoide, adrenais, pâncreas, fígado, baço, coração, próstata e testículos nesses animais (Figuras 15D a 15N).

Figura 15 – Efeitos da administração materna de TBT no peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole macho no dia do desmame



Legenda: gráfico A: peso da gordura retroperitoneal; gráfico B: peso da gordura gonadal; gráfico C: peso da gordura mesentérica; gráfico D: peso do tecido adiposo marrom (TAM); gráfico E: peso da tireóide; gráfico F: peso da adrenal direita; gráfico G: peso da adrenal esquerda; gráfico H: peso do pâncreas; gráfico I: peso do fígado; gráfico J: peso do baço; gráfico K: peso do coração; os dados foram expressos em gramas ou porcentagem relativa de 100g de massa corporal e como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

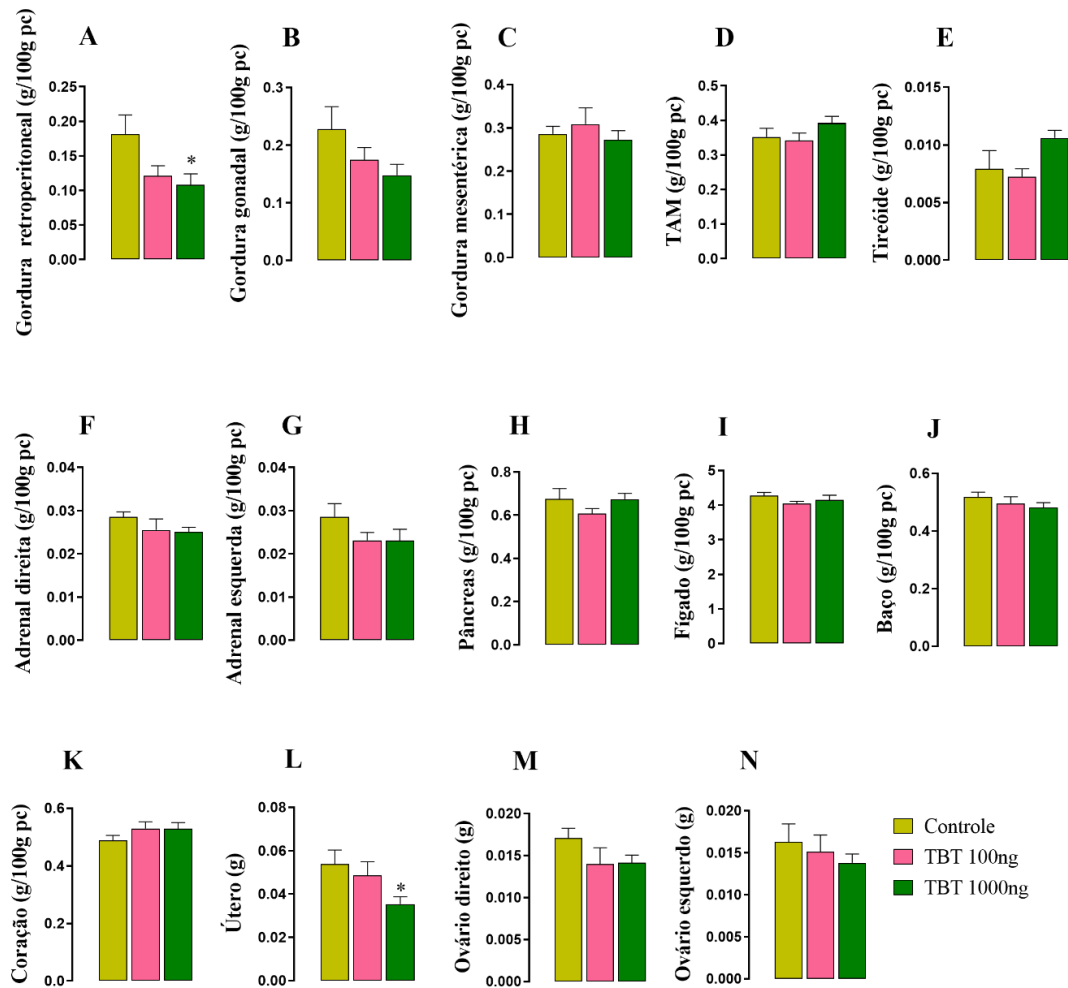
Fonte: O autor, 2021.

### 3.2.8 Avaliação do peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole fêmea ao desmame

As fêmeas cujas mães foram expostas ao TBT na dose de 1000ng apresentaram redução de 30% no peso relativo da gordura retroperitoneal em relação ao grupo Controle, sem alterações no grupo TBT100ng (Figura 16A). Embora exista uma tendência de redução nos estoques da gordura gonadal, não houve diferença estatística em ambos os grupos TBT comparados ao grupo Controle (Figura 16B), tampouco nos depósitos de gordura mesentérica (Figura 20C).

Em relação ao peso relativo dos órgãos (Figuras 16D a 16N), detectamos redução significativa de 30% no útero das fêmeas cujas mães foram expostas ao TBT na dose de 1000ng (Figura 16L).

Figura 16 – Efeitos da administração materna de TBT no peso dos depósitos de gordura e nos órgãos da prole fêmea no dia do desmame



Legenda: gráfico A: peso da gordura retroperitoneal; gráfico B: peso da gordura gonadal; gráfico C: peso da gordura mesentérica; gráfico D: peso do tecido adiposo marrom (TAM); gráfico E: peso da tireóide; gráfico F: peso da adrenal direita; gráfico G: peso da adrenal esquerda; gráfico H: peso do pâncreas; Gráfico I: peso do fígado; gráfico J: peso do baço; gráfico K: peso do coração; gráfico L: peso do útero; gráfico M: peso do ovário direito; gráfico N: peso do ovário esquerdo.; os dados foram expressos em gramas ou porcentagem relativa de 100g de massa corporal e como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; \*  $p < 0,05$  (Controle,  $n = 6$ ; TBT 100ng,  $n = 5$ ; TBT 1000ng,  $n = 8$ ).

Fonte: O autor, 2021.

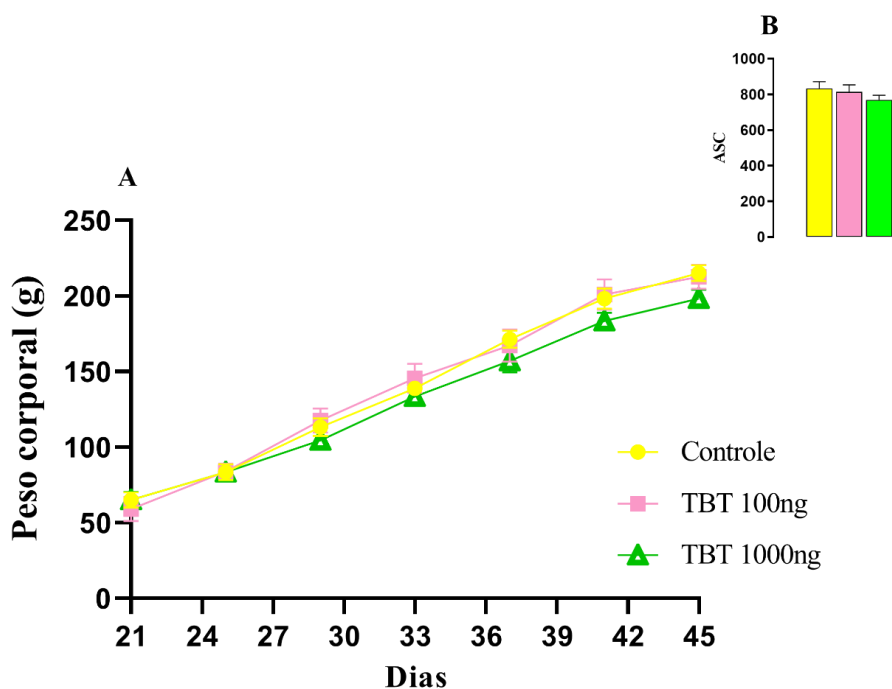


### 3.3 Efeitos da exposição materna ao TBT na prole na adolescência

#### 3.3.1 Avaliação da evolução ponderal da prole macho do desmame aos 45 dias de vida

Do desmame ao PN45, não observamos alterações no peso corporal da prole macho de mães expostas ao TBT em ambas as doses (Figura 17A). Também não houve diferença no cálculo da ASC referente a evolução ponderal (Figura 17B).

Figura 17 – Efeitos da administração materna de TBT na evolução ponderal da prole macho do dia do desmame aos 45 dias de vida



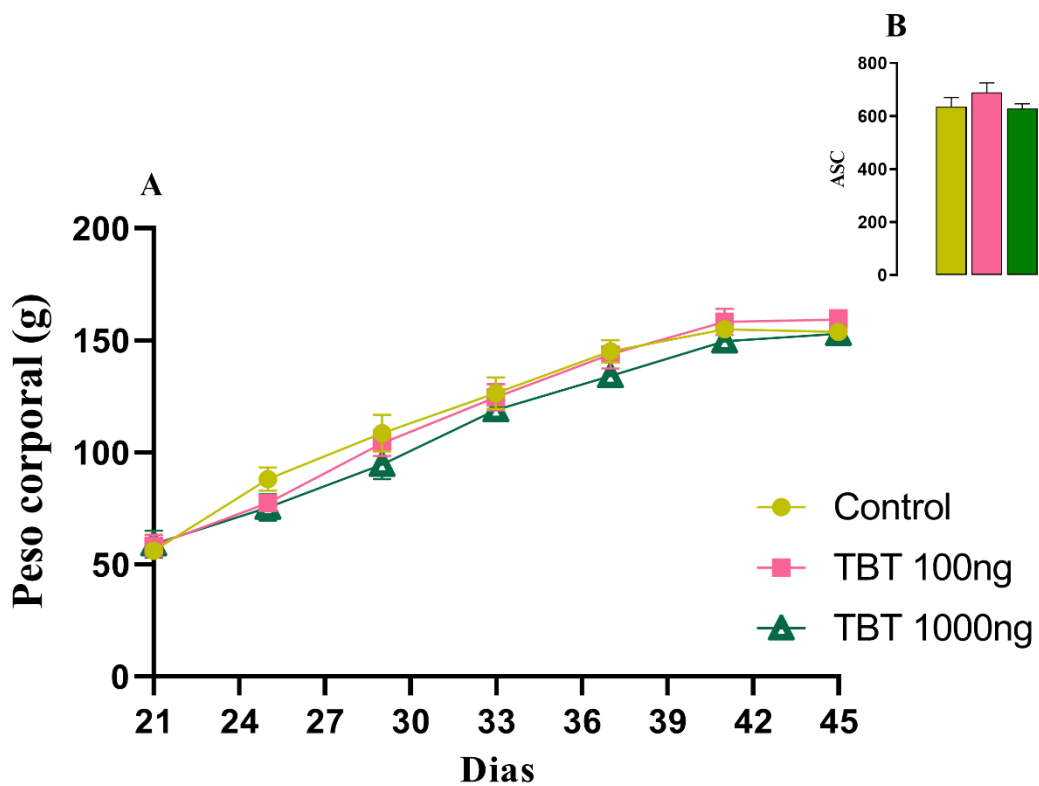
Legenda: gráfico A: evolução ponderal da prole macho do dia do desmame ao dia 45; gráfico B: Área sob a curva (ASC) da evolução ponderal; os dias se referem à idade dos animais; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.2 Avaliação da evolução ponderal da prole fêmea aos 45 dias de vida

Seguindo o mesmo padrão da prole macho, a prole fêmea de mães expostas ao TBT em ambas as doses não teve alterações na evolução ponderal a partir do desmame até PN45 (Figura 18A). Sem diferenças também na ASC referente a evolução ponderal (Figura 18B).

Figura 18 – Efeitos da administração materna de TBT na evolução ponderal da prole fêmea do dia do desmame ao dia 45



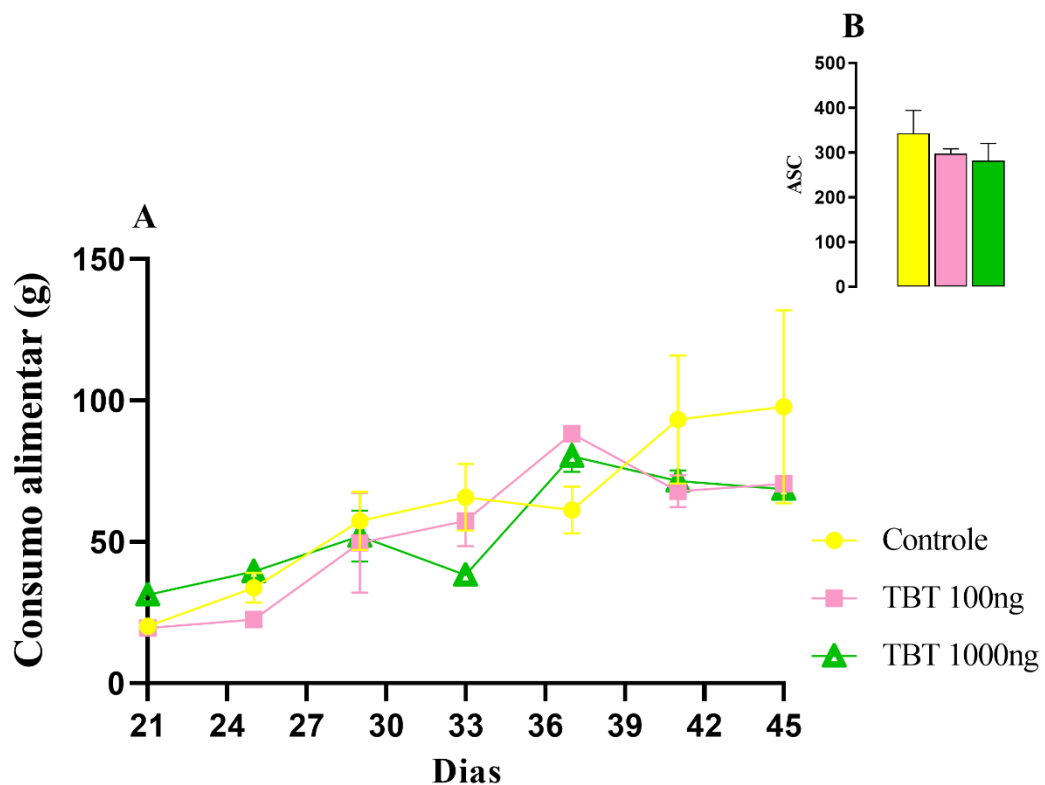
Legenda: gráfico A: evolução ponderal da prole fêmea do dia do desmame ao dia 45; Gráfico B: Área sob a curva (ASC) da evolução ponderal; os dias se referem à idade dos animais; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.3 Avaliação da evolução do consumo alimentar da prole macho aos 45 dias de vida

Não encontramos alterações no consumo alimentar das proles de mães expostas ao TBT em ambas as doses no período da adolescência (Figura 19A). Da mesma forma não observamos alteração na ASC referente ao consumo alimentar (Figura 19B).

Figura 19 – Efeitos da administração materna de TBT, no consumo alimentar da prole macho do dia do desmame aos 45 dias de vida



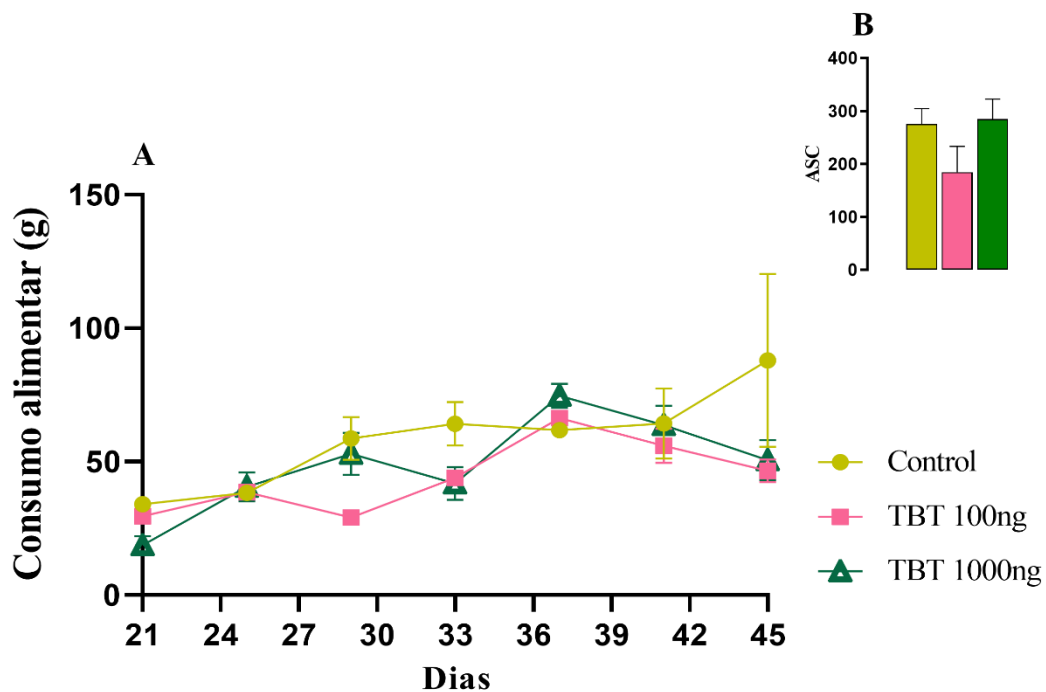
Legenda: gráfico A: evolução do consumo alimentar da prole macho do dia do desmame ao dia 45; gráfico B: Área sob a curva (ASC) do peso diário da prole macho do dia do desmame ao dia 45; o consumo total da caixa foi dividido pelo número de animais em cada caixa (3 a 4 animais em cada) sendo calculado o consumo diário individual; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.4 Avaliação da evolução do consumo alimentar da prole fêmea aos 45 dias de vida

Assim como na prole macho, não observamos alterações no consumo alimentar das proles fêmea de mães expostas ao TBT em ambas as doses no período da adolescência (Figura 20A). Em relação à ASC referente ao consumo alimentar também não observamos alteração (Figura 20B).

Figura 20 – Efeitos da administração materna de TBT no consumo alimentar da prole fêmea do dia do desmame aos 45 dias de vida



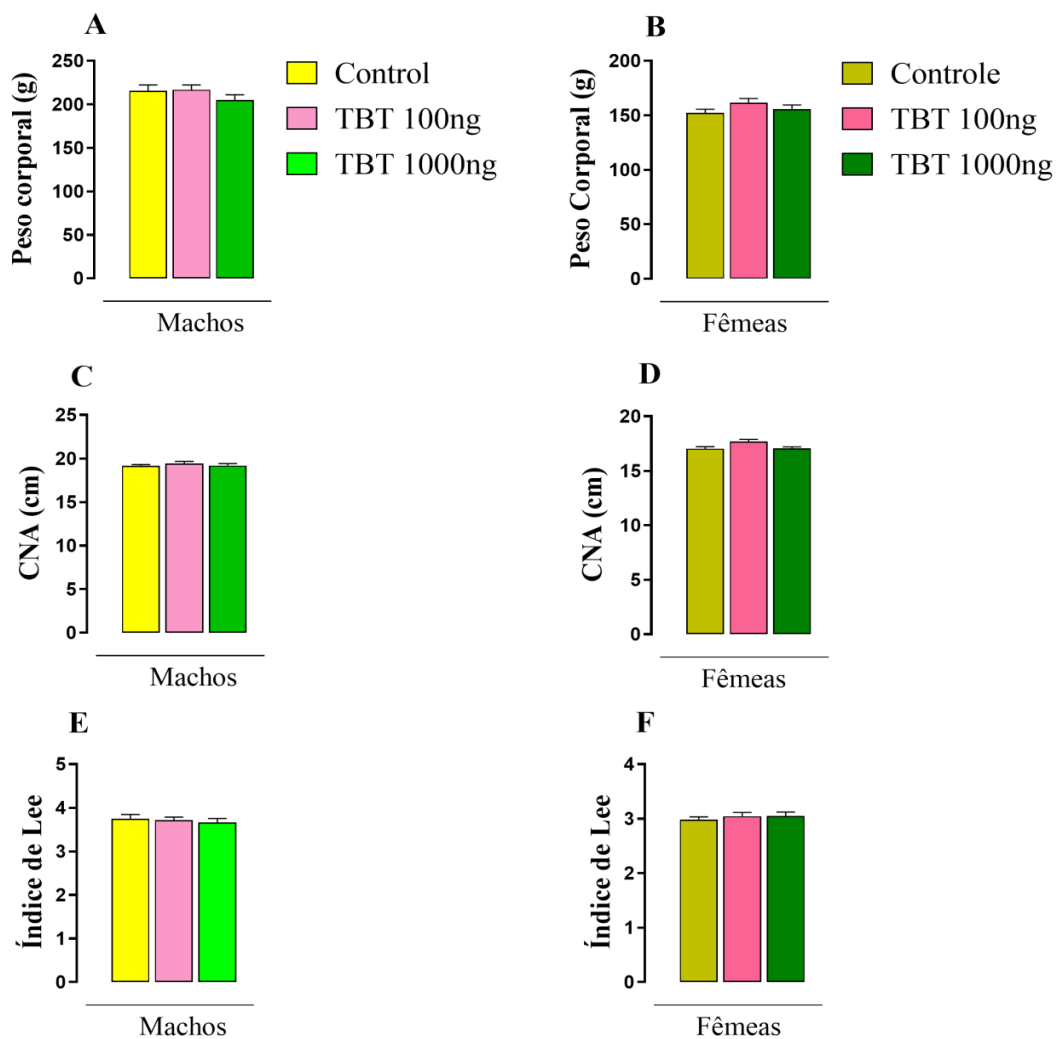
Legenda: gráfico A: evolução do consumo alimentar da prole fêmea do dia do desmame ao dia 45; gráfico B: Área sob a curva (ASC) do consumo da prole fêmea do dia do desmame ao dia 45. consumo total da caixa foi dividido pelo número de animais em cada caixa (3 a 4 animais em cada) sendo calculado o consumo diário individual; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.5 Avaliação do peso corporal, CNA e índice de Lee da prole de ambos os sexos aos 45 dias de vida

Em PN45, não verificamos diferenças no peso corporal, CNA e no cálculo do índice de Lee das proles de mães expostas ao TBT de ambos os sexos (Figuras 21A a 21F).

Figura 21 – Efeitos da administração materna de TBT, no peso aos 45 dias, CNA e índice de Lee da prole de ambos os sexos aos 45 dias



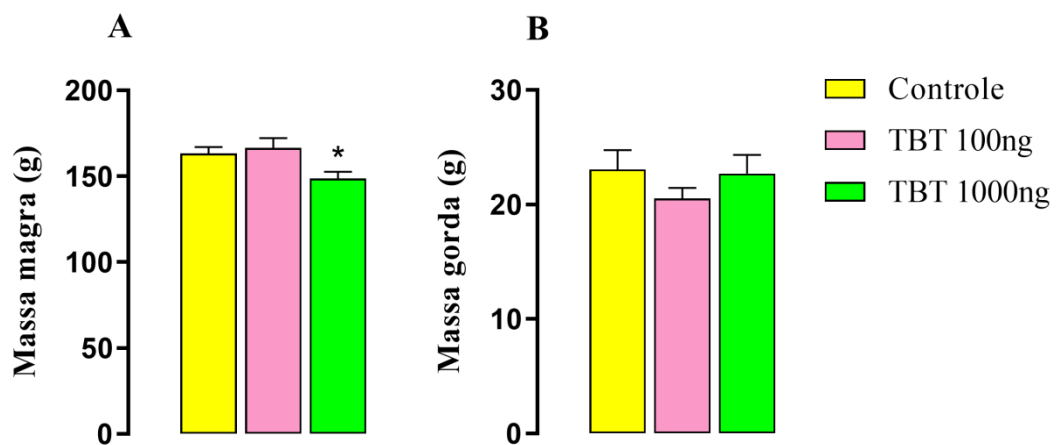
Legenda: gráfico A: Peso da prole macho; Gráfico B: Peso da prole fêmea; gráfico C: CNA da prole macho; gráfico D: CNA da prole fêmea; gráfico E: índice de Lee da prole macho; gráfico F: índice de Lee da prole fêmea; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.6 Avaliação da massa magra e massa gorda da prole macho aos 45 dias de vida

A avaliação do conteúdo de massa magra e massa gorda da prole macho em PN45 mostrou redução da massa magra total da prole de mães expostas ao TBT na dose de 1000ng (Figura 22A), sem alterações na massa de gordura total em ambos os grupos (Figura 22B).

Figura 22 – Efeitos da administração materna de TBT na massa magra e massa gorda da prole macho aos 45 dias



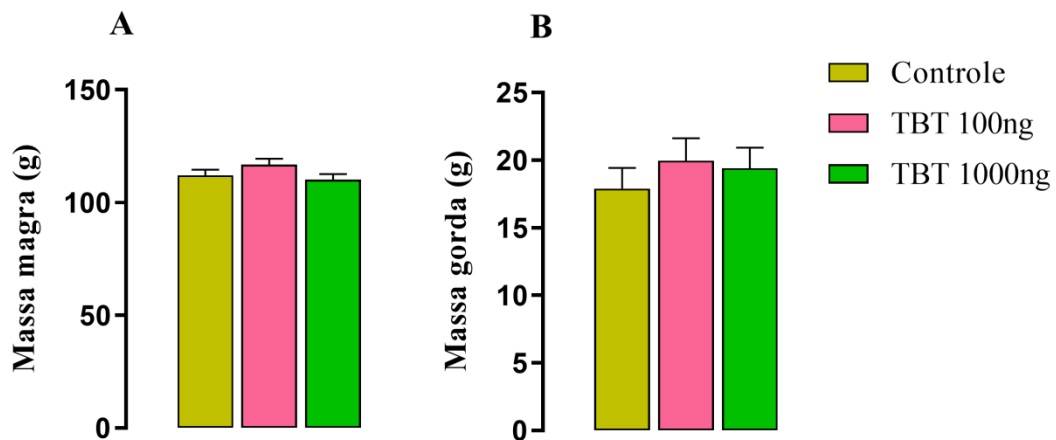
Legenda: gráfico A: massa magra da prole macho aos 45 dias; gráfico B: massa gorda da prole macho aos 45 dias; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc;  $p < 0,05$  (Controle,  $n = 6$ ; TBT 100ng,  $n = 5$ ; TBT 1000ng,  $n = 8$ ).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.7 Avaliação da massa magra e massa gorda da prole fêmea aos 45 dias de vida

A prole fêmea de mães expostas ao TBT em ambas as doses não apresentou diferença em relação ao peso das massas magra e gorda em PN45 em comparação a prole controle (Figuras 23A e 23B).

Figura 23 – Efeitos da administração materna de TBT, na massa magra e massa gorda da prole fêmea aos 45 dias



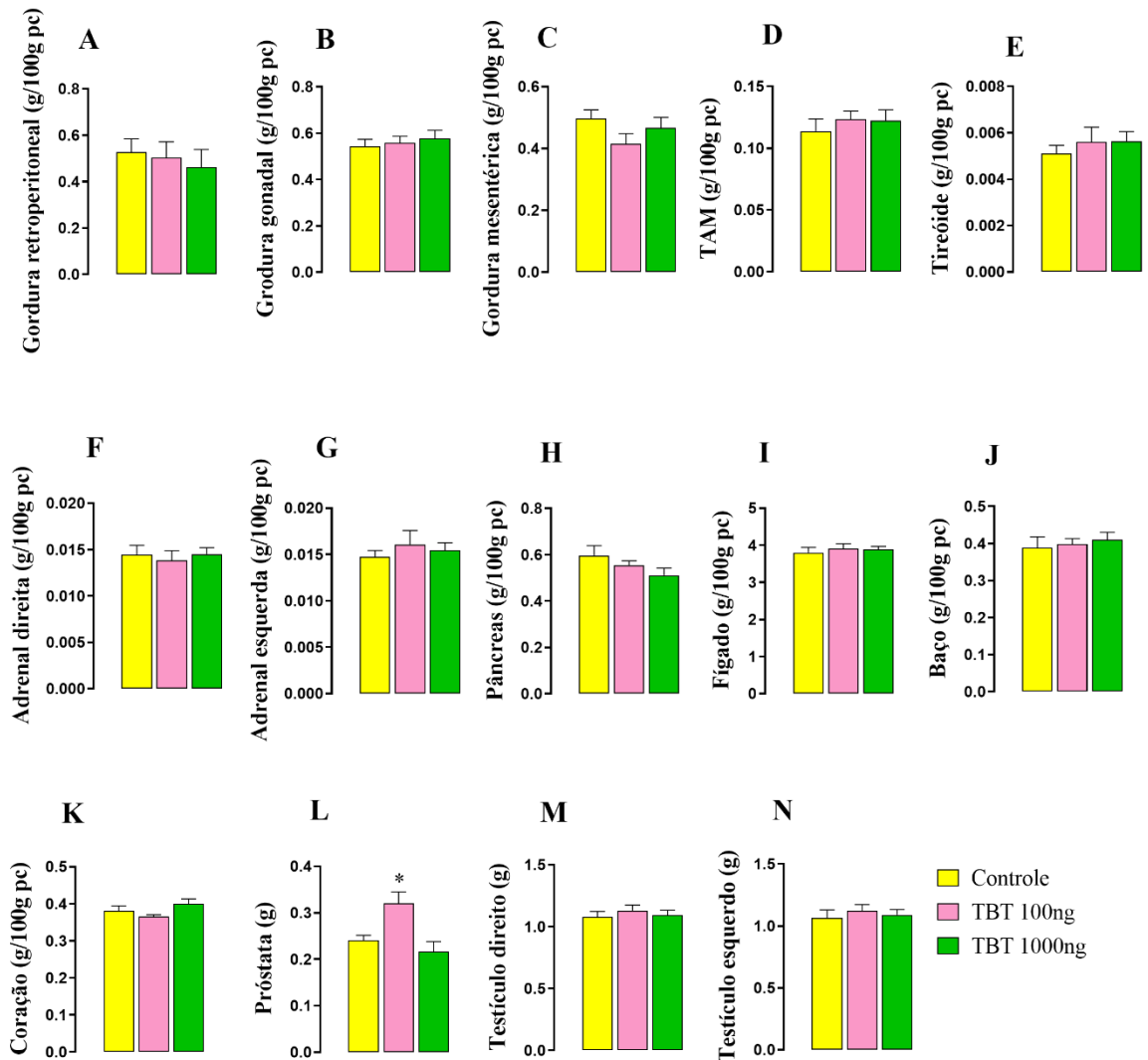
Legenda: gráfico A: massa magra da prole fêmea aos 45 dias; gráfico B: massa gorda da prole fêmea aos 45 dias; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.8 Avaliação do peso dos depósitos de gordura e dos órgãos da prole macho aos 45 dias de vida

O peso dos principais estoques de gordura (retroperitoneal, gonadal e mesentérica) não foi alterado na prole macho de mães expostas ao TBT em ambas as doses (Figuras 24A a 24C). Em relação ao peso dos órgãos (Figuras 24D a 24N), observamos aumento significativo de 36% no peso relativo da próstata de machos filhos de mães expostas ao TBT na dose de 100ng (Figura 24L).

Figura 24 – Efeitos da administração materna de TBT, no peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole macho aos 45 dias



Legenda: gráfico A: peso da gordura retroperitoneal; gráfico B: peso da gordura gonadal; gráfico C: peso da gordura mesentérica; gráfico D: peso do tecido adiposo marrom (TAM); gráfico E: peso da tireóide; gráfico F: peso da adrenal direita; gráfico G: peso da adrenal esquerda; gráfico H: peso do pâncreas; gráfico I: peso do fígado; gráfico J: peso do baço; gráfico K: peso do coração; gráfico L: peso da próstata; gráfico M: peso do testículo direito; gráfico N: peso do testículo esquerdo. os dados foram expressos em gramas ou porcentagem relativa de 100g de massa corporal como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; \* $p < 0,05$  (Controle,  $n = 6$ ; TBT 100ng,  $n = 5$ ; TBT 1000ng,  $n = 8$ ).

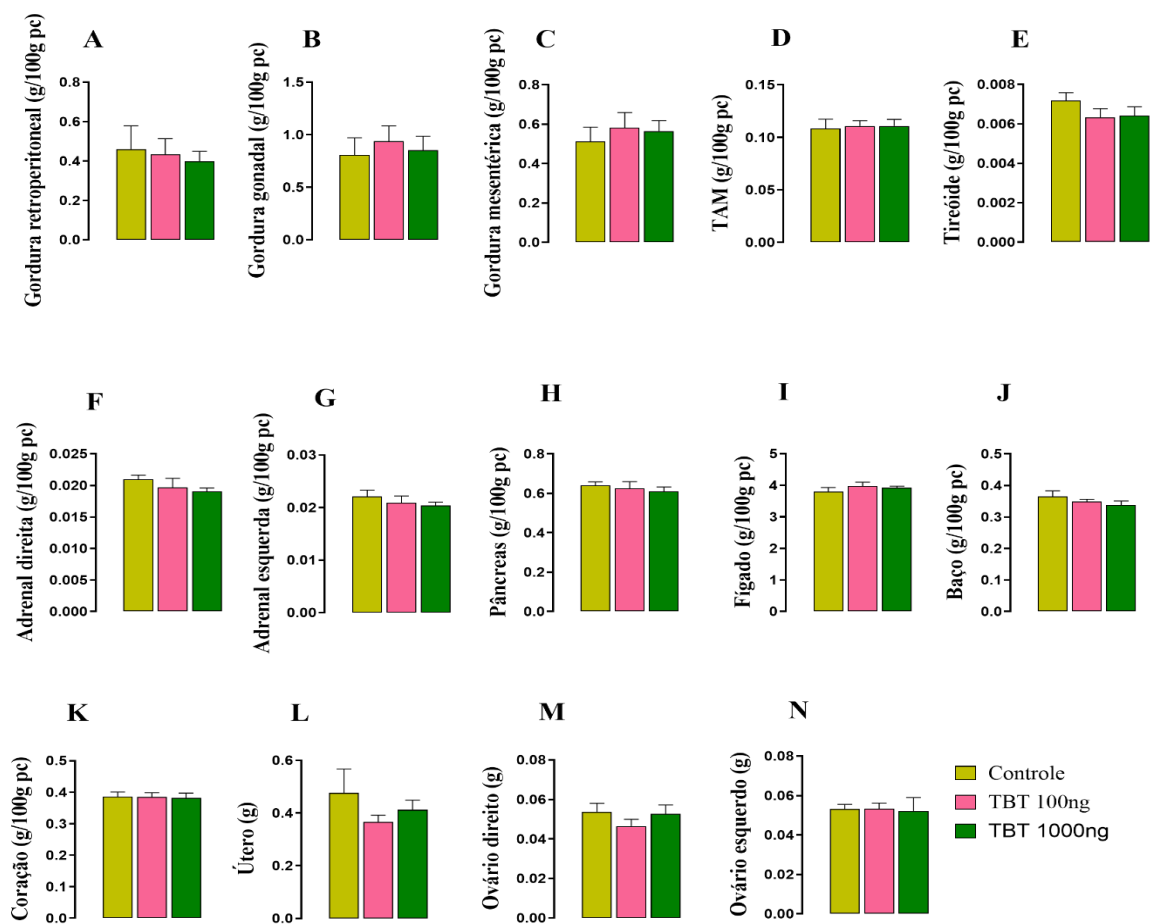
Fonte: O autor, 2021.



### 3.3.9 Avaliação do peso dos depósitos de gordura e dos órgãos da prole fêmea aos 45 dias de vida

No PN45, não verificamos diferenças significativas no peso dos principais estoques de gordura (Figuras 25A a 25C) nem no peso relativo dos órgãos das fêmeas filhas de mães expostas ao TBT em ambas as doses (Figuras 25D a 25N).

Figura 25 – Efeitos da administração materna de TBT, no peso dos órgãos e depósitos de gordura da prole fêmea aos 45 dias



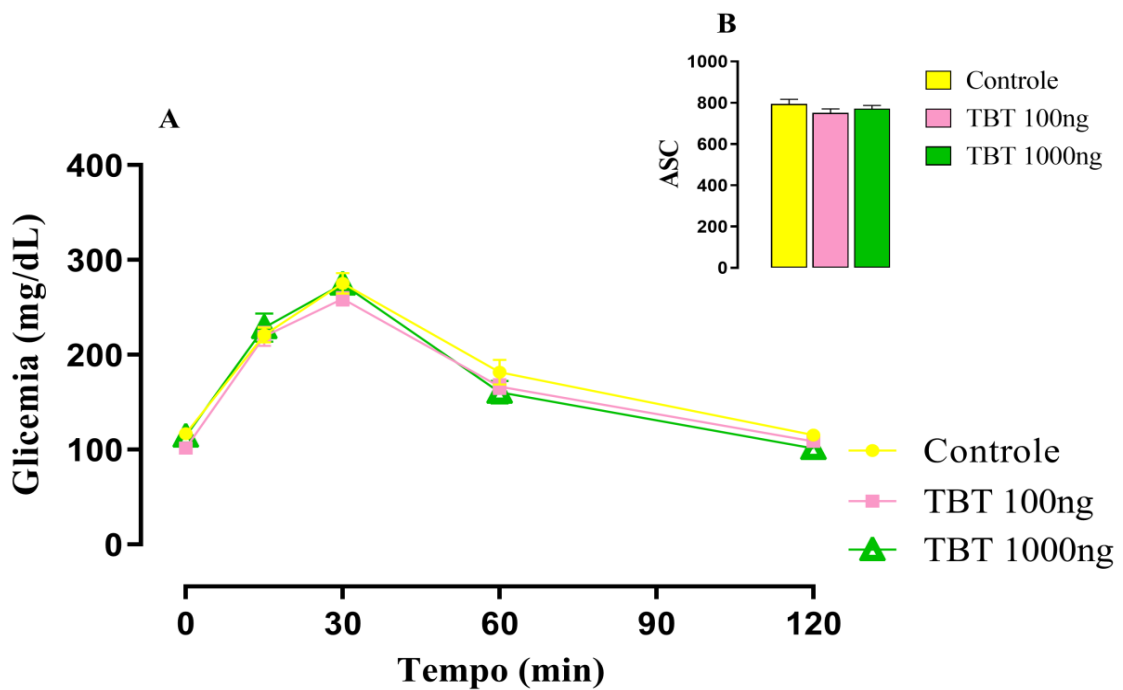
Legenda: gráfico A: peso da gordura retroperitoneal; gráfico B: peso da gordura gonadal; gráfico C: peso da gordura mesentérica; gráfico D: peso do tecido adiposo marrom (TAM); gráfico E: peso da tireoide; gráfico F: peso da adrenal direita; gráfico G: peso da adrenal esquerda; gráfico H: peso do pâncreas; gráfico I: peso do fígado; gráfico J: peso do baço; gráfico K: peso do coração; gráfico L: peso do útero; gráfico M: peso do ovário direito; gráfico N: peso do ovário esquerdo. os dados foram expressos em gramas ou porcentagem relativa de 100g de massa corporal e como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.10 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) na prole macho aos 45 dias de vida

Durante o TOTG em PN45, não verificamos diferenças na glicemia basal e nos tempos subsequentes a administração oral de glicose (15, 30, 60 e 120 min) na prole macho de mães expostas aos TBT em ambas as doses (Figura 26A). Da mesma forma, a ASC não foi alterada em nenhum dos grupos (Figura 26B).

Figura 26 – Efeitos da administração materna de TBT, na prole macho aos 45 dias



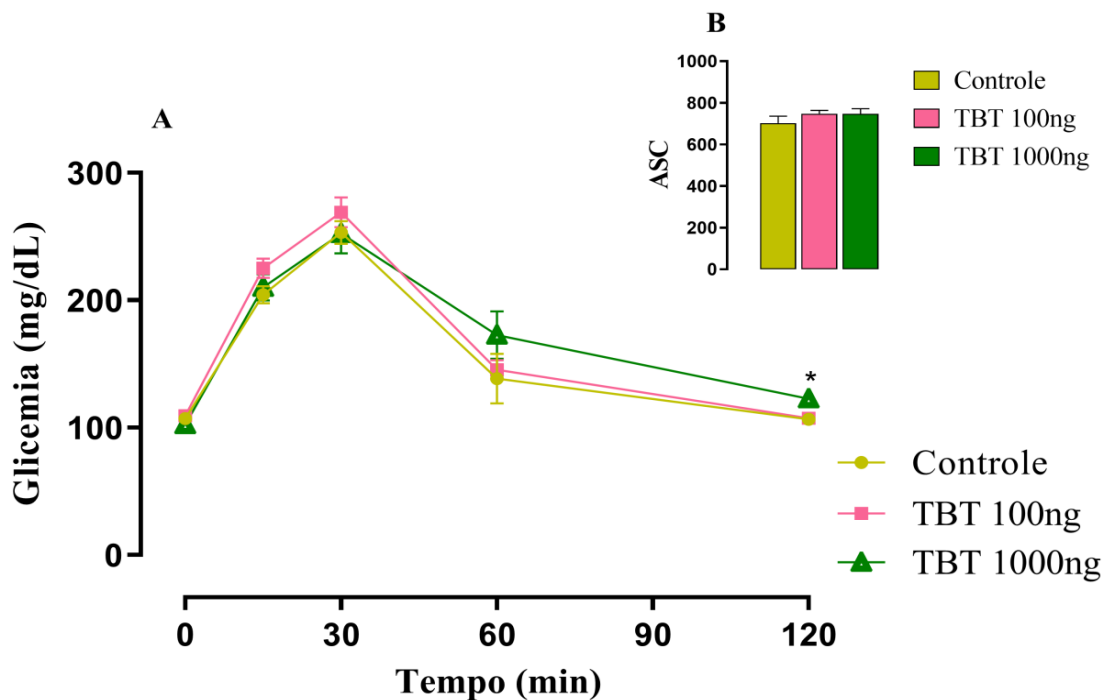
Legenda: gráfico A: glicemia durante o teste oral de tolerância à glicose na prole macho; Gráfico B: Área sob a curva (ASC) da glicemia da prole macho aos 45 dias de vida; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.11 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) na prole fêmea aos 45 dias de vida

Durante o TOTG da prole fêmea, detectamos aumento significativo da glicemia apenas 120 min após a administração oral de glicose no grupo TBT1000ng (Figura 27A). A ASC não foi alterada em nenhum dos grupos (Figura 27B).

Figura 27 – Efeitos da administração materna de TBT, na prole fêmea aos 45 dias



Legenda: gráfico A: glicemia durante o teste oral de tolerância à glicose da prole fêmea; Gráfico B: Área sob a curva (ASC) da glicemia da prole fêmea aos 45 dias de vida; dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc;  $p < 0,05$  (Controle,  $n = 6$ ; TBT 100ng,  $n = 5$ ; TBT 1000ng,  $n = 8$ ).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3.12 Avaliação do perfil metabólico da prole aos 21 e aos 45 dias de vida pós-natal

Em PN21 e PN45 não verificamos diferenças nos perfis glicêmico e lipídico das proles de mães expostas ao TBT em ambas as doses e ambos os sexos. Da mesma forma, não foram observadas alterações nos índices HOMA-IR e HOMA- $\beta$  (Tabela 4).

Em PN21, a prole fêmea de mães expostas ao TBT, em ambas as doses de 100 e 1000ng, apresentaram redução de 46% e 70%, respectivamente nos níveis de leptina plasmática ( $p < 0,01$ ). As mesmas alterações não foram observadas na prole de ambos os sexos em PN45 (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeitos da exposição materna ao TBT no perfil metabólico das proles de ambos os sexos aos 21 e aos 45 dias de vida pós-natal

Parâmetros	PN21						PN45					
	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
	Controle	TBT100ng	TBT1000ng	Controle	TBT100ng	TBT1000ng	Controle	TBT100ng	TBT1000ng	Controle	TBT100ng	TBT1000ng
Glicemia (mg/dL)	152,8±6,24	129,8±5,55	142,8 ± 6,1	135,3±5,84	135,6±1,29	139,9 ±5,06	108,5±3,2	101,3±4,0	107,3±4,9	105±5,91	102,2±2,56	106,6±3,8
Colesterol (mg/dL)	34,7±2,08	41,26±11,3	41,26±12,4	41,41±3,1	36,7±3,09	57,96 ±8,84	76,36±8,96	69,6 ± 7,46	64,19±10,49	45,95±8,17	61,08±6,66	60,71±3,66
TG (mg/dL)	198±27,72	309±146,1	150 ±10,2	178,4±9,8	175,7±18,9	188,8±37,6	66,19±16,11	48,42±5,05	73,82±13,49	46,73±7,52	61,49±9,35	77,51±10,72
Insulina (ng/mL)	1,70±0,90	1,43±0,82	0,97±0,30	1,63±0,59	0,91±0,12	1,24±0,41	1,16±0,23	0,83±0,38	0,81±0,13	0,64±0,24	0,63±0,18	0,66±0,16
Leptina (ng/mL)	2,01±0,47	1,47±0,46	1,25±0,22	1,79±0,33	0,97±0,11**	0,53±0,07***	0,50±0,09	0,36±0,1	0,43±0,1	0,34±0,12	0,56±0,12	0,33±0,16
HOMA-IR	12,31±7,26	10,72±6,22	7,16±2,49	10,46±5,25	7,06±0,82	9,95±4,37	6,91±1,59	4,93±2,09	4,78±1,23	3,86±1,86	3,62±0,91	4,28±0,90
HOMA-β	174,20±107,20	197,30±109,80	105,30±29,05	156,50±69,92	105,30±17,70	138,30±23,90	208,30±57,09	185,80±119,70	168,50±59,29	138,90±20,25	138,20±53,06	149,70±57,89

Legenda: valores apresentados como média ± erro padrão da média; TBT 100ng: ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; TBT 1000ng, ratas tratadas com o tributilestanho na dose de 100ng/kg de pc; as comparações e análises estatísticas foram realizadas dentro de cada idade; TG: triglicerídeos; \*\* p,0,01, \*\*\* p<0,001 (Controle, n= 6; TBT 100ng, n= 5; TBT 1000ng, n=8).

Fonte: O autor, 2021.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos que a exposição materna ao TBT nas fases de gestação e lactação, nas doses de 100 e 1000ng/kg pc/dia, não promove alterações no peso corporal, no consumo alimentar, no perfil glicêmico e lipídico das mães. No entanto, promove alterações específicas e de forma dose-dependente, tais como aumento da massa de gordura das mães no dia do parto (TBT 100ng), redução de gorduras gonadal e mesentérica no dia do desmame da prole (TBT 1000ng) e alterações na composição do leite, como aumento de proteínas e colesterol total, acompanhado de redução de lactose (TBT 100ng). Da mesma forma, observamos que a prole cujas mães foram expostas ao TBT no período perinatal apresentou alterações específicas dependentes da dose de exposição materna, do sexo e das idades estudadas.

Alguns trabalhos avaliaram as mães expostas ao TBT durante o período de gestação, porém em outras doses. Adekko et al. (2003) demonstraram que fêmeas Sprague-Dawley expostas ao TBT do 8º ao 20º dia de gestação na dose de 10mg/kg pc/dia apresentaram redução do peso corporal (ADEEKO et al., 2003). Da mesma forma, (COOKE et al., 2004) observaram redução no peso corporal das mães expostas a 10mg/kg pc/dia de TBT, tanto durante a gestação quanto na lactação. Em contrapartida, os mesmos autores observaram, na dose de 0,25mg/kg pc/dia, que as mães expostas apresentaram aumento de peso corporal durante a lactação, enquanto que a exposição na dose de 2,5mg/kg pc/dia não apresentou efeitos significativos. Esses achados indicam que alterações no peso corporal são dose-dependentes. No entanto, o aumento da concentração de TBT não necessariamente afeta de forma mais drástica o indivíduo, mostrando uma resposta não monotônica deste composto (ou seja, doses mais baixas produzem efeitos maiores), característica de muitos desreguladores endócrinos (XU et al., 2017).

Em relação às mães, nossos achados diferem da literatura provavelmente devido ao fato de que as dosagens utilizadas nesta Dissertação ainda não foram descritas em outros estudos de exposição materna ao TBT. Em contrapartida, a exposição ao TBT na dose de 100ng/kg pc/dia foi demonstrada em estudos com ratas nulíparas adultas expostas por 15 dias consecutivos. A exposição crônica ao TBT nestas fêmeas foi capaz de induzir aumento do peso corporal e da gordura retroperitoneal, aumentar a intolerância à glicose e à insulina durante testes de sensibilidade, aumentar o número de ilhotas pancreáticas e os níveis de insulina séricos (BERTULOSO et al., 2015). Além disso, a exposição ao TBT nesse modelo

experimental, prejudicou o curso normal do ciclo estral acompanhado de um desequilíbrio entre as concentrações de hormônios sexuais (redução de  $17\beta$ -estradiol e aumento de progesterona) e redução do peso dos ovários (PODRATZ et al., 2012). Apesar de não termos avaliado todos os parâmetros estudados por esses autores, podemos sugerir que a exposição ao TBT na mesma dosagem (100ng), pode divergir nos desfechos principalmente devido a diferenças hormonais decorrente dos períodos de gestação e lactação. Apesar de não termos detectado diferenças no peso corporal das mães, um aumento de massa de gordura foi observado no dia do parto em mães expostas ao TBT na dose de 100ng/kg, resultado similar ao estudo de Bertuloso et al. (2015).

O TBT já foi descrito como causador de efeitos importantes na fertilidade de roedores e como potencial influenciador do desenvolvimento anormal dos fetos. Adeeko et al. (2003) observaram que o tratamento materno com TBT na dose de 20mg/kg causou um aumento significativo na perda pós-implantação e diminuição do tamanho das ninhadas, além de diminuição do peso dos fetos, embora não tenham observado malformações na prole, nem mudanças na proporção entre fêmeas e machos. Apesar do TBT causar imposex em espécies de gastrópodes, a exposição *in utero* em roedores não é descrita como capaz de afetar a proporção sexual de fetos (EMA et al. 1995; HARAZONO; EMA; OGAWA, 1996, 1998; ADEKKO et al., 2003). Já foi descrito um aumento desproporcional de fetos machos quando as mães foram gavadas com uma dose única de 100 ou 200 mg/kg de TBT nos dias gestacionais 7 ou 9, sugerindo um efeito letal seletivo para os fetos fêmeas (EMA et al., 1997). Em nosso trabalho, não observamos esse efeito.

A exposição ao TBT nas doses de 0,25, 2,5 ou 10 mg/ kg, do dia 0 ao 19<sup>o</sup> de gestação resultou em um aumento significativo nas distâncias anogenitais em fetos machos, sendo que a exposição entre os dias gestacionais 8 e 19 não teve nenhum efeito. Houve também um aumento na incidência de fetos de baixo peso após exposição de TBT na dose de 20 mg/ kg, além de ossificação retardada do esqueleto fetal nas doses de 10 e 20 mg/kg de TBT (ADEKKO, 2003). Em nosso estudo, embora a prole macho de mães expostas a ambas as dosagens de TBT não tenha apresentado diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados ao nascimento, a prole fêmea de mães expostas ao TBT (100ng) apresentou baixo peso e redução do CNA, enquanto a prole fêmea de mães expostas ao TBT na dosagem de 1000ng apresentou redução do CNA e aumento da glicemia. É evidente que diferenças entre machos e fêmeas estão presentes mesmo antes do nascimento e essas continuam durante o desenvolvimento sob a influência de hormônios sexuais (DEARDEN; BOURET; OZANNE, 2018). De alguma forma, a prole macho parece ter sido protegida dos efeitos da exposição *in utero* ao TBT em

ambas as dosagens. Como já mencionado anteriormente, em doses muito elevadas de TBT *in utero*, a prole fêmea é seletivamente lesada. Considerando os efeitos não monotônicos do TBT, as doses baixas utilizadas no presente estudo poderiam estar afetando seletivamente a prole fêmea por mecanismos desconhecidos. No entanto, essa suposição é baseada em parâmetros analisados até o momento. É possível que a prole macho apresente outras alterações tanto em parâmetros hormonais quanto em metabólicos que poderão ser avaliados posteriormente.

No presente estudo, alterações na composição do leite, como aumento de proteínas e colesterol total, acompanhado de redução de lactose foram observados pela primeira vez no leite das mães expostas ao TBT (100ng). Também medimos o conteúdo de insulina no leite materno, porém este parâmetro não se mostrou diferente entre os grupos experimentais. Estudos avaliando os impactos da exposição ao TBT no período de lactação são escassos na literatura. Cooke et al. (2008) avaliaram o leite de mães expostas ao TBT nas doses de 0,25, 2,5 e 10 mg/kg pc/dia e concluíram que a transferência de TBT para os filhotes durante a lactação seria mínima, pois os níveis de TBT no leite materno foram praticamente indetectáveis (COOKE et al., 2008). Outros estudos dosaram os níveis de organoestanho no estômago de filhotes em fase de amamentação, onde as mães foram expostas ao TBT, e indicaram que a transferência através do leite foi também insignificante (ADEKKO et al., 2003; KIMURA et al., 2005). Apesar de terem dosado os níveis de TBT e metabólitos no leite de mães expostas, esses estudos não avaliaram a composição de macronutrientes ou hormonal no leite materno. Além disso, esses mesmos estudos assumem que quando se é avaliada a exposição ao TBT via mãe em ambos os períodos, gestação e lactação, quaisquer efeitos observados são devidos a exposição *in utero* em vez de um efeito direto do leite. Como neste estudo, observamos diferenças na composição do leite materno, sugerimos que tal conclusão não pode ser tomada com base apenas na dosagem dos níveis de TBT e seus metabólitos, visto que alterações em macronutrientes, que podem ser causadas por um efeito da exposição ao TBT, são extremamente importantes para o desenvolvimento da prole. Diversos estudos já demonstraram que alterações na composição do leite materno pode programar a prole para disfunções na vida adulta (BADILLO-SUÁREZ; RODRÍGUEZ-CRUZ; NIEVES-MORALES, 2017, ENSTAD et al., 2021; MIRANDA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017). Portanto, a dosagem de 100ng de TBT não é segura, pois causa alterações na composição do leite materno que podem promover alterações tanto a curto quanto a longo prazo na prole. Posteriormente, pretendemos estudar as concentrações de leptina e T3 no leite das mães tratadas com TBT na gestação e lactação.



Em dois trabalhos, Makita et al. (2003, 2004), demonstraram que a exposição durante gestação e lactação ao TBT retarda a abertura ocular da prole fêmea e macho, respectivamente. Em nosso estudo, observamos que o percentual de abertura ocular, no dia considerado normal (PN14), de machos e fêmeas expostos em ambas as doses foi baixo em relação a prole controle. Esses resultados indicam que a exposição ao TBT em baixas doses pode retardar o desenvolvimento do sistema nervoso da prole, embora marcadores moleculares devam ser futuramente analisados (MAKITA et al., 2003; MAKITA; OMURA; OGATA, 2004).

Ao desmame, a prole macho de mães expostas em ambas as doses de TBT continuou não apresentando alterações nos diferentes parâmetros avaliados. No entanto, ao desmame, a prole fêmea de mães expostas ao TBT (1000ng) apresenta redução dos depósitos de gordura retroperitoneal e do peso do útero. Uma redução significativa nos níveis séricos de leptina foi observada na prole fêmea de mães expostas em ambas as doses de TBT. A redução nos níveis de leptina acompanha de forma coerente a redução dos depósitos de gordura nesses animais. No entanto, alterações nos níveis de leptina durante períodos cruciais de desenvolvimento pode fornecer a base neurobiológica para metabolismo alterado e elevado risco de doenças não transmissíveis mais tarde na vida (DE OLIVEIRA et al., 2002). Reduções nos níveis de leptina nesse período também podem induzir a resistência à leptina a longo prazo na prole, tornando-a mais suscetível ao desenvolvimento de obesidade (ATTIG et al., 2008).

Na adolescência, a prole macho de mães expostas ao TBT na dose de 1000ng apresenta redução da massa magra, enquanto a prole de mães expostas ao TBT na dose de 100ng apresenta aumento do peso da próstata. Omura (2001), demonstrou que não houve diferença significativa no peso da próstata na prole macho adulta de camundongos expostos ao TBT nas doses de 25 e 125 mg/kg pc/dia durante gestação e lactação. Ao contrário, uma redução foi observada na 2ª geração subsequente a exposição. Sugerimos que o aumento do peso da próstata nesses animais se deva a um aumento de androgênios devido a programação pelo TBT sobre a enzima aromatase (OMURA et al., 2001).

Embora a prole fêmea apresente alterações em PN0 e PN21, em PN45 essas alterações não são mais observadas. Embora em PN21 encontramos redução do peso uterino apenas na prole de mães expostas na dose de 1000ng, em PN45 há uma tendência de redução no peso do útero em ambos os grupos, TBT 100 e 1000ng. Na literatura, não existem trabalhos que mostram a exposição materna ao TBT na dose de 1000ng/kg pc/dia. Contudo, a administração direta de TBT em fêmeas adultas, na dose de 100ng/kg pc/dia, foi capaz de promover atrofia e

morfologia anormal do útero (DE ARAÚJO, 2018). Sabemos que o TBT e seu metabólito DBT possuem efeito inibitório sobre a enzima aromatase, comprovado por estudos *in vitro* (COOKE et al., 2002; HEIDRICH; STECKELBROECK; KLINGMULLER, 2001). No entanto, não sabemos se ao desmame, a redução da conversão de androgênios a estrógenos pode explicar a redução do útero da prole fêmea, uma vez que os níveis hormonais são extremamente baixos antes da puberdade. Esse pode ser um efeito tóxico da exposição ao TBT que poderá induzir disfunções reprodutivas nesses animais. Já na adolescência, a estrogenemia pode estar reduzida, o que ajuda a justificar a tendência ao baixo peso uterino. Será fundamental a dosagem dos esteroides sexuais no plasma das proles para comprovar estas ideias. Toda e et al. (2001), observaram em camundongos nocautes para o gene da aromatase uma redução no tamanho do útero, assim como anormalidades morfofuncionais (TODA et al, 2001). Outras alterações, tais como adiantamento na idade de início da abertura vaginal (AV) e no primeiro estro vaginal, redução de peso corporal na AV e no primeiro estro e padrões alterados de ciclicidade estral na idade adulta foram observados por Si et al. (2012). Tendo em vista o efeito descrito na literatura, a exposição perinatal ao TBT pode resultar em puberdade precoce em ambas as proles macho e fêmea.

O efeito tóxico do TBT na homeostasia glicêmica já foi descrito em estudos toxicológicos. A exposição ao TBT nas doses de 0,5, 5 e 50 $\mu$ g/kg por um período de 60 dias em camundongos machos alterou a glicemia basal desses animais e intolerância à glicose foi observada no TOTG em todas as doses de exposição (ZUO et al., 2014). Outro estudo demonstrou que a exposição ao TBT na dose de 0,25mg/kg em camundongos CD-1 machos adultos causou hiperglicemia acompanhada de hipoinsulinemia. Níveis reduzidos de insulina podem ser explicados pelo aumento de estresse oxidativo associado a um aumento de apoptose nas células  $\beta$  pancreáticas desses animais. De forma interessante, eliminando a exposição ao TBT por 2 semanas, as alterações no metabolismo glicêmico desses animais foram revertidas (HUANG et al., 2018). Em nosso estudo, não observamos alteração da glicemia na prole macho de mães expostas ao TBT em ambas as doses e em todas as idades, assim como resistência à insulina. No entanto, a prole fêmea (TBT 1000ng) apresenta glicemia elevada no nascimento, o que pode ser explicado pela exposição direta ao TBT nessa fase. Após interromper a exposição desses animais, alterações na glicemia basal já não são observadas. Contudo, quando desafiadas com uma sobrecarga de glicose durante o TOTG, a prole fêmea (TBT 1000ng) não consegue restabelecer os níveis de glicemia quando comparadas as fêmeas controle. Esse resultado sugere que a exposição precoce ao TBT pode

programar alterações no perfil glicêmico da prole. Mais investigações deverão ser realizadas para comprovar essa hipótese.

## CONCLUSÕES

Em suma, a exposição ao TBT em baixas doses durante fases críticas do desenvolvimento, induz alterações dose, sexo, idade e tecido-específicas e parecem prejudicar de forma mais pronunciada a prole fêmea. Essas alterações podem ser um indício de que esses animais apresentarão, na vida adulta, maior risco de desenvolver obesidade e doenças associadas. No entanto, é necessário ainda o acompanhamento da evolução da prole até a idade adulta, além do desenvolvimento de estudos morfológicos e moleculares em todas as idades avaliadas, a fim de obtermos um rastreamento do fenótipo desses animais. Por fim, cabe ressaltar que estamos constantemente expostos por longos períodos a baixos níveis de TBT, seja pela ingestão de alimentos marinhos, água ou por diversas outras vias. Sendo assim, a exposição a esse contaminante ambiental não exclui períodos como gestação e lactação. Por isso, estudos toxicológicos nessas fases são de grande importância, pois auxiliam na compreensão dos possíveis impactos futuros nas gerações subsequentes, podendo minimizá-los ou auxiliar na criação de novos tratamentos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- ADEEKO, A. et al. Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 2, p. 407-415, 2003.
- AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS. **Integrated Risk Information System (IRIS), Tributyltin oxide (TBTO); CASRN 56-35-9**. Washington: A Agência, 1997.
- AIRAKSINEN, R. et al. Organotin intake through fish consumption in Finland. **Environmental Research**, v. 110, n.6, p. 544-547, 2010.
- ALDRIDGE, W.N. et al. Action on mitochondria and toxicity of metabolites of tri-n-butyltin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 26, n. 21, p. 1997-2000, 1977.
- ANDREOTTI, G. et al. Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2495-2500, 2009.
- ARREBOLA, J.P. et al. Historical exposure to persistent organic pollutants and risk of incident hypertension. **Environmental Research**, v. 138, p. 217-223, 2015.
- ASHRAF, M.W.; SALAM, A.; MIAN, A. Levels of Organotin Compounds in Selected Fish Species from the Arabian Gulf. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 98, n.6, p. 811-816, 2017.
- ATTIG, L. et al. Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 7, p. 1153-1160, 2008.
- BADILLO-SUÁREZ, P.A.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.; NIEVES-MORALES, X. Impact of metabolic hormones secreted in human breast milk on nutritional programming in childhood obesity. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 22, n. 3, p. 171-191, 2017.
- 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, 2002.
- BAKER, A.H. et al. Tributyltin engages multiple nuclear receptor pathways and suppresses osteogenesis in bone marrow multipotent stromal cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 6, p. 1156-1166, 2015.
- BARKER D.J. The fetal origins of adult hypertension. **Journal of Hypertension Supplement**, v. 10, n.7, p. 39-44, 1992.
- BARKER D.J.; MARTYN C.N.. The maternal and fetal origins of cardiovascular disease. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v.46, n.1, p. 8-11, 1992.

BARKER, D.J. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **The Lancet**, v. 341, n. 8850, p. 938-941, 1993.

BARKER, D.J. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 6, p. 1235-1239, 2002.

BARKER D.J. et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, n.1, p. 62-67, 1993.

BELFROID, A.C.; PURPERHART, M.; ARIESE, F. Organotin levels in seafood. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 226-232, 2000.

BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

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, 1970.

BORGES, C.L.L. et al. Organotin pollution from pleasure craft at Paraty, a tourist area of Southeastern Brazil: amelioration or interference?. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 3, p. 177-186, 2013.

BOUWMEESTER, M.C. et al. Zebrafish embryos as a screen for DNA methylation modifications after compound exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 291, p. 84-96, 2016. DOI: 10.1016/j.taap.2015.12.012

BRASIL. Marinha. Normas da autoridade marítima para o controle de sistemas antiincrustantes em embarcações. NORMAM-23/DPC. Rio de Janeiro: Marinha do Brasil, 2007.

CARSON, R. **Silent spring**. United States of America: Houghton Mifflin Harcourt, 2002.

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

CASTRO, I.B; RODRIGUES-QUEIROZ, L.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha-uma Revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.40, n. 1, p. 96-112 2007.

CASTRO, I. B. et al. How protected are marine protected areas: A case study of tributyltin in Latin America. **Journal of Environmental Management**, v. 278, p. 111543, 2021.

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.

CHAMP, M.A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the Total Environment**, v. 258, n. 1, p. 21-71, 2000.

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. 935-940, 2003.

CHAMP, M.A. The status of the treaty to ban TBT in marine antifouling paints and alternatives. In: UJNR (US/JAPAN) MARINE FACILITIES PANEL MEETING, 24., 2001, Hawaii. **Proceedings...** Hawaii: Advanced Technology Research Project Corporation, 2001.

CHAMP, M.A.; SELIGMAN, P.F. An introduction to organotin compounds and their use in antifouling coatings. In: CHAMP, M.A.; SELIGMAN, P.F. **Organotin**. Springer, Dordrecht, 1996.

CHOI, M.; MOON, H.; CHOI, H. Intake and potential health risk of butyltin compounds from seafood consumption in Korea. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n. 2, p. 333-340, 2012.

COHEN, O. et al. Longitudinal assessment of insulin sensitivity in pregnancy. Validation of the homeostasis model assessment. **Clinical Endocrinology**, v. 64, n. 6, p. 640-644, 2006.

COHN, B.A.; CIRILLO, P.M.; CHRISTIANSON, R. E. Prenatal DDT exposure and testicular cancer: a nested case-control study. **Archives of Environmental and Occupational health**, v. 65, n. 3, p. 127-134, 2010.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. **O futuro roubado**. Porto Alegre: L&PM, 2002. 354p.

COOKE, G. M. Effect of organotins on human aromatase activity in vitro. **Toxicology Letters**, v. 126, n. 2, p. 121-130, 2002.

COOKE, G. M. Toxicology of tributyltin in mammalian animal models. **Immunology, Endocrine and Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)**, v. 6, n. 1, p. 63-71, 2006.

COOKE, G. M. et al. Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague–Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 211-220, 2004.

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. 384-395, 2008.

COSTA, L. G. et al. A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 282-294, 2014.

DA GAMA, B. A .P.; RENATO, C. **Bioincrustação marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009.

DARBRE, P. D. (Ed.). **Endocrine Disruption and Human Health**. United States of America: Academic Press, 2015. E-book (304p).

DARBRE, P.D.; HARVEY, P.W. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 9, p. 925-938, 2014.

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. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.06.1068

DE OLIVEIRA, C.C. et al. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, n. 07, p. 400-405, 2002.

DEARDEN, L.; BOURET, S.G.G.; OZANNE, S.E. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. **Molecular Metabolism**, v. 15, p. 8-19, 2018. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.04.007

DECHERF, S. et al. Disruption of thyroid hormone-dependent hypothalamic set-points by environmental contaminants. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 2, p. 172-182, 2010.

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, n. 9, p. 958-965, 2011.

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**, v. 75, n. 16-17, p. 948-959, 2012.

DUBEY, S.K.; ROY, U. Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 3-8, 2003.

EGUÍA, E.; TRUEBA, A. Application of marine biotechnology in the production of natural biocides for testing on environmentally innocuous antifouling coatings. **Journal of Coatings Technology and Research**, v. 4, n. 2, p. 191-202, 2007.

EMA, M. et al. Effect of the day of administration on the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 90-96, 1997.

EMA, M. et al. Further evaluation of the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. **Toxicology**, v. 96, n. 3, p. 195-201, 1995.



ENSTAD, S. et al. The impact of maternal obesity and breast milk inflammation on developmental programming of infant growth. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 1, p. 180-188, 2021.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 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. **The EFSA Journal**, v.102, p.1-119, 2004.

EVERETT, C. J. et al. Association of a polychlorinated dibenzo-p-dioxin, a polychlorinated biphenyl, and DDT with diabetes in the 1999–2002 National Health and Nutrition Examination Survey. **Environmental Research**, v. 103, n. 3, p. 413-418, 2007.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 3-117, 1996.

FRANÇA, M.A. et al. Imposex and ecological quality status in *Stramonita brasiliensis* (Claremount & Reid, 2011): A temporal (2007 to 2018) and spatial evaluation on the southeastern coast of Brazil. **Journal of Sea Research**, p. 102080, 2021.

FUCIC, A. et al. Potential health risk of endocrine disruptors in construction sector and plastics industry: a new paradigm in occupational health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, p. 1229, 2018.

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, 2021.

GOKSOYR, A. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 69, n. 1-2, p. 175-184, 2006.

GOLDNER, W.S. et al. Hypothyroidism and pesticide use among male private pesticide applicators in the agricultural health study. **Journal of occupational and environmental medicine/American College of Occupational and Environmental Medicine**, v. 55, n. 10, p. 1171, 2013.

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

GRAY, B.H. et al. Tri-n-butyltin: a membrane toxicant. **Toxicology**, v. 47, n. 1-2, p. 35-54, 1987.

GROTE, K. et al. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, n. 3, p. 145-158, 2004.

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

GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. s50-s55, 2006.

GUIMARÃES, J.R.P.F. Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde. **Portal Associação de Combate aos Poluentes**. 2019. Disponível em: <https://acpo.org.br/arquivos/pagina-biblioteca/agenda-marrom/artigos-dissertacoes-teses-manuais/artigos/2-guimaraes-disruptores-endocrinos.pdf>. Acesso em: 08 fev. 2022.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, 1992.

HARAZONO, A.; EMA, M.; OGAWA, Y. Evaluation of early embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats: phase-and dose-dependent antifertility effects. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 34, n. 1, p. 94-99, 1998.

HARAZONO, A.; EMA, M.; OGAWA, Y. Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. **Toxicology letters**, v. 89, n. 3, p. 185-190, 1996.

HAYASHI, M. et al. Determination of Tributyltin and Triphenyltin in Fish and Shellfish Using Accelerated Solvent Extraction and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. **Shokuhin Eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 61, n. 6, p. 223-228, 2020.

HEIDRICH, D.D.; STECKELBROECK, S.; KLINGMULLER, D. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. **Steroids**, v. 66, n. 10, p. 763-769, 2001.

HEINDEL, J.J. et al. Developmental origins of health and disease: integrating environmental influences. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3416-3421, 2015.

HEINDEL, J.J. History of the obesogen field: looking back to look forward. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n.14,p. 1-8, 2019.

HEINDEL, J.J. et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. **Reproductive Toxicology**, v. 68, p. 3-33, 2017. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.10.001

HORIGUCHI, T. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. **Environmental Sciences**, v. 13, n. 2, p. 77-87, 2006.

HSU-LEBLANC, E. 2017. Are Toxins Fattening? **Portal Pure Inside Out**. 2017. Disponível em: <http://www.pureinsideout.com/are-toxins-fattening.html> Acesso em: 06 fev. 2022.

HU, J. et al. Trophic magnification of triphenyltin in a marine food web of Bohai Bay, North China: Comparison to tributyltin. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 10, p. 3142-3147, 2006.

HUANG, C. et al. Low-dose tributyltin exposure induces an oxidative stress-triggered JNK-related pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis and a reversible hypoinsulinemic hyperglycemia in mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

- IKEDA, K.; YAMADA, H. Changes in dietary bioaccumulation of tributyltin chloride (TBTCl) in red sea bream (*Pagrus major*) with the concentration in feed. **Water research**, v. 37, n. 7, p. 1497-1504, 2003.
- JORDÃO, R.M.G. **Integrative approach to characterize new mechanisms of toxicity of pollutants in *Daphnia magna***. Tese de Doutorado. Universidade de Aveiro (Portugal), 2016.
- KANNAN, K.; SENTHILKUMAR, K.; GIESY, J.P. Occurrence of butyltin compounds in human blood. **Environmental science & technology**, v. 33, n. 10, p. 1776-1779, 1999.
- KANNAN, K.; TANABE, S.; TATSUKAWA, R. Occurrence of butyltin residues in certain foodstuffs. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 55, n. 4, p. 510-516, 1995.
- 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, 1999.
- KIMURA, K. et al. Effect of lactational exposure to tributyltin chloride on innate immunodefenses in the F1 generation in mice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1104-1110, 2005.
- 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. 526-539, 2010.
- KISHTA, O. et al. In utero exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague–Dawley rat. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2007.
- KUBALLA, J. et al. Speciation and genotoxicity of butyltin compounds. **Analyst**, v. 120, n. 3, p. 667-673, 1995.
- LAUGHLIN R.B.; GUARD H.E.; COLEMAN W.M. Tributyltin in seawater: speciation and octanol-water partition coefficient. **Environ Sci Technology**, v.20, n.2, p. 201-204, 1986.
- LEIJS, M.M. et al. Effects of dioxins, PCBs, and PBDEs on immunology and hematology in adolescents. **Environmental Science and technology**, v. 43, n. 20, p. 7946-7951, 2009.
- LI, X.; YCAZA, J.; BLUMBERG, B. The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 9-15, 2011.
- 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.

LIU, Y.; PETERSON, K.E. Maternal exposure to synthetic chemicals and obesity in the offspring: recent findings. **Current Environmental Health Reports**, v. 2, n. 4, p. 339-347, 2015.

LIU, H. et al. Maternal exposure to tributyltin during early gestation increases adverse pregnancy outcomes by impairing placental development. **Environmental Toxicology**, v.36, n.7, p.1303-1315, 2021.

MAKITA, Y.; OMURA, M.; OGATA, R. Effects of Perinatal Simultaneous Exposure to Tributyltin (TBT) and p, p'-DDE (1, 1-Dichloro-2, 2-Bis (p-Chlorophenyl) Ethylene) on Male Offspring of Wistar Rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 67, n. 5, p. 385-395, 2004.

MAKITA, Y. et al. Effects of simultaneous administration of tributyltin (TBT) and p, p'-DDE on female offspring of Wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 66, n. 24, p. 2337-2347, 2003.

MARINOVICH, M.; VIVIANI, B.; GALLI, C.L. Reversibility of tributyltin-chloride-induced protein synthesis inhibition after ATP recovery in HEL-30 cells. **Toxicology Letters**, v. 52, n. 3, p. 311-317, 1990.

MARKAKIS, E.A. Development of the neuroendocrine hypothalamus. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 3, p. 257-291, 2002.

MARTÍNEZ, M. L. et al. Tributyltin bioaccumulation and toxic effects in freshwater gastropods *Pomacea canaliculata* after a chronic exposure: field and laboratory studies. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 5, p. 691-701, 2017.

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P.E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 37-43, 1998.

MCKINLAY, R. et al. Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. **Environment International**, v. 34, n. 2, p. 168-183, 2008.

MEANEY, M.J.; SZYF, M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 103, 2005.

MEEKER, J.D. et al. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 532-539, 2010.

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.

MERLO, E. et al. The obesogen tributyltin induces features of polycystic ovary syndrome (PCOS): a review. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 21, n. 3, p. 181-206, 2018.

MIRANDA, R.A. et al. Cross-fostering reduces obesity induced by early exposure to monosodium glutamate in male rats. **Endocrine**, v. 55,1, p. 101-112, 2017.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 9-10, p. 403-405, 2017.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1995 Annual Report. **The National Academies Press**. Washington, DC, 1985.

NISHIKIMI, A. et al. Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release. **Biochemical Journal**, v. 356, n. 2, p. 621-626, 2001.

NOMIRI, S. et al. A mini review of bisphenol A (BPA) effects on cancer-related cellular signaling pathways. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 9, p. 8459-8467, 2019.

NUNES-SILVA, A. et al. The pollutant organotins leads to respiratory disease by inflammation: a mini-review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 369, 2018. DOI: 10.3389/fendo.2017.00369.

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

OGATA, R. et al. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 63, n. 2, p. 127-144, 2001.

OHHIRA, S.; ENOMOTO, M.; MATSUI, H. In vitro metabolism of tributyltin and triphenyltin by human cytochrome P-450 isoforms. **Toxicology**, v. 228, n. 2, p. 171-177, 2006.

OHHIRA, S.; WATANABE, M.; MATSUI, H.. Metabolism of tributyltin and triphenyltin by rat, hamster and human hepatic microsomes. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 138-144, 2003.

OMURA, M. et al. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **Toxicological Sciences**, v. 64, n. 2, p. 224-232, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Concise International Chemical Assessment Document**. Genebra, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **International programme on chemical safety**. Genebra, 1990.

ORTIZ-VILLANUEVA, E. et al. Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 156-166, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.369

PACINI, G; MARI, A. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 305-322, 2003.

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, 2011.

PEREIRA, L.C. et al. Mitochondrial damage and apoptosis: Key features in BDE-153-induced hepatotoxicity. **Chemico-biological Interactions**, v. 291, p. 192-201, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.06.021.

PEREIRA-FERNANDES, A. et al. Evaluation of a screening system for obesogenic compounds: screening of endocrine disrupting compounds and evaluation of the PPAR dependency of the effect. **PloS One**, v. 8, n. 10, p. e77481, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0077481

PERRY, N.A.; DOAN, F.J. A picric acid method for the simultaneous determination of lactose and sucrose in dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 33, p. 176-185, 1950.

PETRAKIS, D. et al. Endocrine disruptors leading to obesity and related diseases. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 10, p. 1282, 2017.

PHILIPPEN, L.E. et al. Non-coding RNA in control of gene regulatory programs in cardiac development and disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 89, p. 51-58, 2015.

PODRATZ, P.L. et al. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology Center**, v. 57 p. 29-42, 2015. DOI: 10.1016/j.reprotox.2015.05.003

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

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. 1-9, 2014.

REITSEMA, T.J.; SPICKETT, J.T. Imposex in *Morula granulata* as bioindicator of tributyltin (TBT) contamination in the Dampier Archipelago, Western Australia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 280-284, 1999.

RODRIGUES, S.M.L. et al. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 3, p. 378-385, 2014.

RODRIGUES, V. et al. Supplementation of suckling rats with cow's milk induces hyperphagia and higher visceral adiposity in females at adulthood, but not in males. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 55 p. 89-103, 2017. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.12.001

ROSEBOOM, T.J. et al. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944–45. **Heart**, v. 84, n. 6, p. 595-598, 2000.

ROSEBOOM, T.J. et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Twin Research and Human Genetics**, v. 4, n. 5, p. 293-298, 2001.

SAITOH, M. et al. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 1, p. 198-204, 2001.

SAIYED, H. et al. Effect of endosulfan on male reproductive development. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 16, p. 1958-1962, 2003.

SAMSON, S.L.; GARBER, A.J. Metabolic syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 43, n. 1, p. 1-23, 2014.

SCHØYEN, M. et al. Levels and trends of tributyltin (TBT) and imposex in dogwhelk (*Nucella lapillus*) along the Norwegian coastline from 1991 to 2017. **Marine Environmental Research**, v. 144, p. 1-8, 2019. DOI: 10.1016/j.marenvres.2018.11.011

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. DOI: 10.1016/j.taap.2017.01.021

SHARAN, S.; NIKHIL, K.; ROY, P. Disruption of thyroid hormone functions by low dose exposure of tributyltin: an in vitro and in vivo approach. **General and Comparative Endocrinology**, v. 206, p. 155-165, 2014. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.07.027

SI, J. et al. Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride advances puberty and affects patterns of estrous cyclicity in female mice. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 662-670, 2012.

SI, J. et al. Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride reduces sperm count and quality in mice. **Environmental Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 44-52, 2015.

SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational inheritance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 2, p. 68-70, 2016.

SOUNDARARAJAN, A. et al. Novel insights of elevated systemic levels of bisphenol-A (BPA) linked to poor glycemic control, accelerated cellular senescence and insulin resistance in patients with type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 458, n. 1, p. 171-183, 2019.

SOUSA, A.C.A. et al. History on organotin compounds, from snails to humans. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12 p. 117–137, 2014. DOI: 10.1007/s10311-013-0449-8

SVENSSON, E. **The Regulation of Global SO<sub>x</sub> Emissions from Ships: IMO proceedings 1988-2008**. 2011. Thesis (Licentiate of Philosophy) – Chalmers University of Technology. Gothenburg, Sweden, 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, 1999.

TANG, C.; HSU, C.; WANG, W. Butyltin accumulation in marine bivalves under field conditions in Taiwan. **Marine Environmental Research**, v. 70, n. 2, p. 125-132, 2010.

TANG, M. et al. Assessing the underlying breast cancer risk of Chinese females contributed by dietary intake of residual DDT from agricultural soils. **Environment International**, v. 73, p. 208-215, 2014. DOI: 10.1016/j.envint.2014.08.001

TODA, K. et al. A loss of aggressive behaviour and its reinstatement by oestrogen in mice lacking the aromatase gene (Cyp19). **Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 2, p. 217-220, 2001.

TOSTE, R. et al. Organotin pollution at Arraial do Cabo, Rio de Janeiro State, Brazil: increasing levels after the TBT ban. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 59, n. 1, p. 111-117, 2011.

TRAVIS, C.C.; HESTER, S.T. Global chemical pollution. **Environmental science and Technology**, v. 25, n. 5, p. 814-819, 1991.

TRUHAUT, R. et al. Toxicologic and pharmacologic study of tributyltin oxide (TBTO). **European journal of toxicology and environmental hygiene**, v. 9, n. 1, p. 31-40, 1976.

TUNÇ, M. et al. Quantification of tributyltin in seawater using triple isotope dilution gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry achieving high accuracy and complying with European Water Framework Directive limits. **Journal of Chromatography A**, v. 1637, p. 461847, 2021. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461847

VOS, J.G. et al. Brominated flame retardants and endocrine disruption. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 11-12, p. 2039-2046, 2003.

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, n. 1, 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. Japanese Journal of Industrial Health**, v. 24, n. 1, p. 24-54, 1982.

XU, Z. et al. Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: a review. **Environmental Research**, v. 155, p. 199-207, 2017. DOI: 10.1016/j.envres.2017.02.018

YEBRA, D.M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 50, n. 2, p. 75-104, 2004.



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, p. 185-190, 2016. DOI: 10.1590/1519-6984.15115

ZHANG, J. et al. Lipid accumulation, oxidative stress and immune-related molecules affected by tributyltin exposure in muscle tissues of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 71, p. 10-18, 2017. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.09.066.

ZIV-GAL, A.; FLAWS, J.A. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007–2016). **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 4, p. 827-856, 2016.

ZUO, Z. et al. Chronic exposure to tributyltin chloride induces pancreatic islet cell apoptosis and disrupts glucose homeostasis in male mice. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 9, p. 5179-5186, 2014.

ZUO, Z. et al. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. **Environmental toxicology**, v. 26, n. 1, p. 79-85, 2011.

**ANEXO – Certificado de aprovação da Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (protocolo nº 010/2019)**



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)**



**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**EFEITOS DO TRIBUTIL ESTANHO NA PROGRAMAÇÃO METABÓLICA DURANTE ADOLESCÊNCIA**", registrada com o nº 010/2019, sob a responsabilidade de **Rosiane Aparecida Miranda** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 25/05/2019.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/05/2023
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	176
Peso/Idade	200-600 g / 60-180 dias
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 25 de Maio de 2019.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa  
Vice-Coodenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ