

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRIBUTILESTANHO LEVA A ANORMALIDADES NO TRATO
REPRODUTIVO DE RATAS**

VITÓRIA
2015

JULIA FERNANDEZ PUÑAL DE ARAÚJO

**TRIBUTILESTANHO LEVA A ANORMALIDADES NO TRATO
REPRODUTIVO DE RATAS**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr.
Jones Bernardes Graceli

VITÓRIA
2015

JULIA FERNANDEZ PUÑAL DE ARAÚJO

**TRIBUTILESTANHO LEVA A ANORMALIDADES NO TRATO
REPRODUTIVO DE RATAS**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Aprovada em 30 de Novembro de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientador

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santos – UFES

Profa. Gabriela Cavati Sena
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** pela dádiva da vida e por ter me iluminado e me abençoado, além de me dar forças e sabedoria nessa caminhada para alcançar meus objetivos e vencer as dificuldades ao longo dessa jornada.

A minha família, em especial, **meus pais Mercedes e Paulo**, que me proporcionaram uma infância feliz, passando os valores que me fizeram a pessoa que sou hoje, muitas vezes se sacrificando em benefício das filhas, além de todo o suporte que me deram durante minha vida acadêmica; **minha irmã Raquel**, que apesar das diferenças, sempre se mostrou uma grande amiga e grande companheira, me dando forças e me apoiando em muitos momentos difíceis ao longo desses anos.

Ao meu namorado **Douglas**, que nesses últimos seis anos me deu seu amor e apoio, me ajudando a seguir em frente nos momentos de dificuldade e ansiedade, além de aturar minhas reclamações e variações de humor, principalmente nesses últimos meses, sempre me incentivando a seguir em frente e correr atrás dos meus sonhos.

Aos grandes amigos que fiz na Biologia. Muito mais do que amigos de turma, me ensinaram a ver a vida de um modo diferente, me ajudando a crescer muito ao longo desses quatro anos, além de sempre me ajudarem a conciliar trabalhos e laboratório. Ao **Carlos e Lívia**, que foram os primeiros amigos que fiz no curso, e dividiram muitas alegrias comigo. A **Emanuela, Matheus e João Felipe**, que se mostraram grandes amigos nessa reta final, me apoiando e sempre oferecendo ajuda quando precisei.

A **Jessica e Talita**, pela amizade e carinho que sempre demonstraram por mim ao longo dos anos que estamos juntas, sempre entendendo quando não podia sair pois tinha que tratar rato ou fazer algum experimento.

Aos amigos de laboratório, por transformar as horas que passamos trabalhando em momentos descontraídos e divertidos. Ao **Bruno**, pelos ensinamentos e animação, mesmo fora do laboratório será sempre uma pessoa importante. A **Priscila**, por todos os ensinamentos, orientações, conversas e ajudas ao longo desses anos. A **Gabriela**, por sempre estar disposta a ajudar e por todas as conversas divertidas que tivemos. Ao **Eduardo**, que sempre foi um bom companheiro, mas que nessa reta final tem sido um amigo excepcional me dando muita força nesse final de curso, dividindo as angústias e ansiedades do TCC e do final de curso. A todos os demais alunos do laboratório: **Higor, João Vitor, Carolina, Ingrid, Ariane, Wesley...**

Ao **prof. Jones**, pela oportunidade, confiança, e todo o conhecimento repassado. Por ter me acolhido novamente no laboratório após um momento de indecisão. Por toda a compreensão e preocupação com a nossa formação, além da disposição em nos ajudar, independente do dia e horário que o procuramos. Por toda a alegria e ânimo que traz para o laboratório, além de todos os momentos de descontração.

A **UFES, CAPES, FAPES e CNPq**, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

RESUMO

O Tributilestanho (TBT) é um contaminante ambiental organometálico, amplamente utilizado em tintas anti-incrustantes para embarcações, o que proporciona grande contato com a biota marinha e, conseqüentemente, com o ser humano. Possui característica de desregulador endócrino e grande toxicidade para sistemas reprodutores de diferentes modelos de animais, como os gastrópodes. No entanto, esses efeitos não são muito bem estabelecidos para mamíferos. Dessa forma, o trato reprodutivo de ratas expostas ao TBT foi avaliado. Ratas Wistar com 12 semanas de idade, pesando aproximadamente 230g foram divididas em dois grupos: Controle (tratadas com veículo, 0,4% solução etanólica) e TBT (tratadas com tributilestanho, 100 ng/Kg/dia). Ao longo o tratamento, os ciclos estrais foram avaliados diariamente por 30 dias. O TBT alterou a regularidade do ciclo estral dos animais, aumentando sua duração e as fases de metaestro-diestro. Foi observado um aumento no ganho de peso na hipófise dos animais tratados com TBT, apesar não apresentaram alterações significantes nos níveis séricos basais de LH e FSH. O TBT também elevou os pesos ovarianos, uterinos e níveis séricos de progesterona, entretanto levou a redução significativa nos níveis séricos de estrogênio. Na análise histológica dos ovários expostos ao TBT houve redução nos números de corpos lúteos, aumento de folículos atrésicos e císticos. Na morfologia uterina, houve redução nas áreas de endométrio e miométrio dos animais tratados com TBT. Esses efeitos tóxicos reprodutivos do TBT levou as alteração histomorfológicas ovarianas e uterinas, bem como desequilíbrio dos hormônios sexuais, podendo se tornar um fator de risco reprodutivo.

Palavras-chave: Contaminação Ambiental. Tributilestanho. Toxicidade. Desregulação Endócrina. Ciclo Reprodutivo. Prejuízo Reprodutivo.

ABSTRACT

The Tributyltin (TBT) is an environmental organometallic contaminant, widely used in antifouling paints for boats, which provides large contact with the marine biota and, consequently, to humans. It features characteristic of endocrine disrupter chemical (EDC) and high toxicity to reproductive systems of different animal models, such as gastropods. However, these effects are not well established for mammals. Thus, the reproductive tract of female rats exposed to TBT was evaluated. Wistar rats at 12 weeks of age, weighing about 230g were divided into two groups: control (treated with vehicle, 0.4% ethanol) and TBT (tributyltin treated with 100 ng/kg/day doses). During treatment, the estrous cycles were evaluated for 30 days. The TBT led to abnormal estrous cyclicity of animals, increasing their length, due to increased metestrous-diestrous. A weight gain in the animal's pituitary treated with TBT, despite no significant changes in the basal levels of LH and FSH was observed. The TBT also raised the ovarian weight, uterine and serum progesterone levels, however led to significant reduction in serum levels of estrogen. Histological analysis showed an reduction in the number of corpora lutea, and an increase in cystic ovarian follicles and in atretic ovarian follicles. In uterine morphology, the areas of the endometrium and myometrium were decreased in TBT-treated animals. This toxic reproductive effect of TBT may be associated with histomorphological changes found in the ovaries, uterus and imbalance of sex hormones and can become a reproductive risk factor.

Keywords: Environmental Contamination. Tributyltin. Toxicity. Endocrine disruption. Reproductive cycle. Reproductive injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação do ciclo reprodutivo de ratas. (A) Representação do ciclo reprodutivo, demonstrado o número de dias em que o animal ficou em cada fase, sendo possível avaliar a regularidade do ciclo estral. Análise estatística feita com Test t. (B) Avaliação da duração de cada fase e comprimento do ciclo dos animais TBT e controle, onde P representa a fase de proestro, E a fase metaestro e M-D as fases de metaestro-diestro. Análise estatística feita com ANOVA 1 via. *p < 0,05 e **p < 0,01. N=8.....23

Figura 2: Avaliação biométrica do peso dos órgãos e níveis séricos dos hormônios sexuais. (A) Peso úmido da hipófise. (B) Concentrações séricas basais de FSH. (C) Concentrações séricas basais de LH. (D) Níveis séricos de estrogênio. (E) Níveis séricos de progesterona. (F) Peso úmido dos ovários. (G) Peso úmido dos úteros. **p < 0,01 e ***p < 0,001.....25

Figura 3: (A) Análise histológica de ovário de animal controle com aparência normal. (B) Análise histológica de ovário de animal tratado com TBT, presença de folículos atrésicos. Podemos observar folículos ovarianos antrais (seta), atrésicos (estrela), císticos (ponta de seta) e CL (asterisco). (C) Representação gráfica do número de folículos/área. *p < 0,05 e ** p < 0,01. (Barra: 200µm)29

Figura 4: (A) Histologia de útero de animal controle. (B) Histologia de útero de animal tratado com TBT. Sendo possível observar a área do endométrio (estrela) e área do miométrio (asterisco). (C) Avaliação morfométrica da área do miométrio uterino. (D) Avaliação morfométrica do endométrio uterino. (Barra: 200µm)31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação de peso corporal e úmido dos órgãos de TBT 30 e CON. Os valores reportados como média \pm E.P.M. **p < 0,01.....27

Tabela 2: Representação da ação do estrogênio e da progesterona nas fases de desenvolvimento uterino durante o ciclo sexual.....30

LISTA DE SIGLAS

BPA	Bisfenol-A
CL	Corpo lúteo
CON	Controle
D	Diestro
D-P	Diestro-Proestro
E	Estro
EPM	Erro padrão da média
ER- α	Receptor de estrogênio alfa
ER- β	Receptor de estrogênio beta
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HPG	Hipotálamo-hipófise-gônadas
HPO	Hipotálamo-hipófise-ovário
LH	Hormônio luteinizante
LOAEL	Nível do Menor Efeito Observado
M1	Metaestro 1
M2	Metaestro 2
M-D	Metaestro-Diestro
NOAEL	Nível de Efeito Adverso Não Observado
OTs	Organoestânico
P	Proestro
PBS	Tampão fosfato-salina
P-E	Proestro-Estro
PVC	Cloreto de polivinila
RP-A	Receptor de progesterona A
RP-B	Receptor de progesterona B
Sn	Estanho
TBT	Tributilestanho
TBTA	Acetato de tributilestanho
TBTCI	Cloreto de tributilestanho
TBTO	Óxido de tributilestanho

TBTOH	Hidróxido de tributilestanho
TPT	Trifenilestanho

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	12
2 – OBJETIVOS	18
2.1 - Objetivo Geral	18
2.2 – Objetivos Específicos	18
3 – METODOLOGIA	19
3.1 – Animais Experimentais	19
3.2 – Grupos Experimentais	19
3.3 – Avaliação do Ciclo Estral das Ratas	20
3.4 – Avaliação dos Pesos dos Ovários e dos Úteros	21
3.5 – Avaliação dos Níveis Séricos Hormonais	21
3.6 – Avaliação Histológica dos Ovários e Úteros	21
3.7 – Análise Estatística	22
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 – Ciclo Estral, Dosagem Hormonal e Pesos dos Órgãos	23
4.2 – Análise Histológica	28
5 – CONCLUSÕES	33
6 – REFERÊNCIAS	34

1 - Introdução

Os crescentes prejuízos em decorrência do aumento da poluição no planeta têm levado a um estado de alerta constante em grande parte da população mundial. Nunca foi tão evidente a necessidade de se adotar alternativas ao nosso modo de vida, buscando reduzir os danos ao nosso planeta e, conseqüentemente a nós mesmos. Além da preocupação com o aumento da destruição do ambiente terrestre, nos últimos anos, os oceanos tem sido foco dos debates sobre preservação, conservação e manejo. A maioria dos poluentes que entram no ambiente marinho é danosa à biota como um todo, trazem riscos à saúde humana e comprometem as atividades marinhas, incluindo a pesca, além de prejudicar a qualidade da água. Esses efeitos estão associados a substâncias tóxicas, fármacos, poluição térmica, patógenos, resíduos sólidos, particulados em suspensão, nutrientes e qualquer tipo de influência xenobiótica ao meio aquático (Patin, 1982). Outro exemplo de poluidor antrópico seria o uso de tintas anti-incrustantes em cascos de navios, cujo princípio ativo são compostos organoestânicos (OTs), como o Tributilestanho (TBT) ou o Trifenilestanho (TPT) (Godoi, 2003).

O primeiro estudo sobre OTs foi realizado por Sir Edward Frankland (1825-1899) entre 1853 a 1859. Por muitas décadas esses compostos despertaram apenas interesse científico, pois não revelavam nenhum potencial comercial (Blunden e Evans, 1990). Em 1925, foi feita a primeira aplicação prática com OTs, chamados de “agentes anti-traças”, porém nunca chegaram a ser usados com essa finalidade (Luijten, 1987). Por volta de 1940, começaram a ser utilizados na indústria do plástico, principalmente como estabilizantes na produção do cloreto de polivinila (PVC) (Blunden e Evans, 1990). Seu uso como biocida surgiu por volta de 1950, demonstrando ação sobre fungos, bactérias, organismos marinhos, vermes parasitas, caramujos aquáticos e insetos (Luijten, 1987). No final de 1960, alguns OTs começaram a ser utilizados como pesticidas, na preservação de madeira e em tintas anti-incrustantes (Blunden e Evans, 1990).

Os OTs são caracterizados por uma ou mais ligações carbono-estanho. Apresentam fórmula geral R_nSnX_{4-n} , sendo R um grupo alquila ou arila, X uma espécie aniônica e n variando de 1 a 4 (Blunden e Evans, 1990). Os efeitos tóxicos dependem da natureza química e do número de grupos orgânicos associados ao átomo de estanho, sendo a atividade tóxica máxima na série de OTs em que $n = 3$ (Hoch, 2001). Dessa forma, o TBT passou a ser amplamente utilizado como biocida em geral. Esse composto apresenta caráter hidrofóbico e sua solubilidade depende de fatores como pH, força iônica e temperatura (Fent, 1996; Hoch, 2001).

No ambiente marinho, o TBT está presente principalmente na forma TBTOH, tendo sua disponibilidade aumentada quando o $pH > 8$ (Fent, 1996; Alzieu, 1998;). Nesses ambientes, os triorganoestânicos podem ser facilmente adsorvidos ao material particulado em suspensão e na

superfície dos sedimentos marinhos (Langston; Pope, 1995; Hoch, 2001). Aproximadamente 95% do TBT presente na coluna d'água está ligado ao material particulado em suspensão, incluindo o plâncton (Gadd, 2000).

Por sua notável ação biocida, o TBT se tornou o principal composto no mundo utilizado em tintas anti-incrustantes. Acreditava-se ser o biocida ideal por possuir fácil degradação, podendo ocorrer pela ação de ácidos, microalgas e radiação solar na coluna d'água (Gadd, 2000; Hoch, 2001). No entanto, na década de 70, a França anunciou o primeiro relato de ação nociva do TBT em organismos não-alvos, que lhe conferiu o caráter de poluente/tóxico ambiental (Alzieu, 1998). A partir de então, muitos estudos passaram a ser realizados na tentativa de demonstrar a alta toxicidade desse composto. Na década de 90, cerca de 80 % das embarcações de grande porte utilizavam tintas anti-incrustantes a base de OTs em seus cascos (IMO, 1999). No Brasil, em 1992, foi adotado o “Princípio da Precaução”, que estabelecia a proibição total do uso de TBT a partir de 1º de janeiro de 2003.

OTs são poluentes organometálicos, com características de desreguladores endócrinos, ou seja, uma substância que causa uma modulação inapropriada do sistema endócrino por causa de dieta ou contaminantes ambientais (Colborn *et al.*, 1993). São compostos exógenos com potencial para alterar a modulação hormonal (direta ou indiretamente) do sistema endócrino como um todo, podendo afetar a função reprodutiva e/ou metabólica de mamíferos. Esses compostos podem promover uma alteração na produção, liberação, mecanismos de ação, metabolismo, eliminação, e podem mimetizar a ação de hormônios naturais (Tabb and Blumberg, 2006). Os desreguladores endócrinos podem ser derivados de compostos de origem animal, humana, vegetal ou sintéticos. Entretanto, a maior parte da preocupação está relacionada a toxicidade desses produtos químicos sintéticos, tanto os de ação pouco esclarecida, quanto os com potencial de desregulação endócrina já conhecido (Casals-casas; Desvergne, 2011). Essa preocupação se deve ao fato da expansão da indústria química ter atingido 400 milhões de toneladas de compostos desreguladores no mundo, causando grande impacto ambiental e à saúde humana.

Investigações toxicológicas demonstraram que os OTs possuem ações cito, neuro e genotóxicas em diferentes modelos animais de invertebrados e vertebrados. Essas ações são capazes de afetar alguns animais em seu *habitat* natural, causando alterações morfofuncionais macroscópicas, modificando seu comportamento ecológico, chegando a reduzir sua capacidade de adaptação ao meio (Kovalchuck *et al.*, 1998). Por essa razão, esses organismos são considerados bioindicadores ambientais da contaminação/poluição pelos OTs, como ocorre em gastrópodes (Ohhira *et al.*, 2003; Delgado Filho *et al.*, 2010; Graceli *et al.*, 2012).

Dentre os efeitos tóxicos causados pelo TBT, um dos mais notáveis foi o desenvolvimento sexual anormal, devido à desregulação endócrina, em algumas espécies de gastrópodes (Matthiessen *et al.*, 1995). Esse fenômeno, conhecido como “imposex” ou “Pseudohermafroditismo”, é caracterizado por uma superposição de órgãos genitais masculinos em fêmeas. Essa masculinização se dá pelo desenvolvimento de pseudo-pênis e canal deferente em fêmeas afetadas (Shi *et al.*, 2005). Fent (1996) relacionou o grau de desenvolvimento do pênis e a frequência de imposex em fêmeas de caramujo aos níveis de TBT, sendo esses efeitos mais intensos em áreas próximas a portos e marinas.

Desreguladores endócrinos podem atuar diretamente sobre uma glândula endócrina, alterando sua função, agir diretamente sobre a expressão de um receptor hormonal e alterar o metabolismo de determinado hormônio em seu órgão-alvo (Brown *et al.*, 2001). A exposição aos compostos organoestênicos induz modificações morfológicas, como perda de peso em órgãos reprodutivos (Omura *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2001; Grote *et al.*, 2004), e interferência no metabolismo de hormônios sexuais (Omura *et al.*, 2001; Grote *et al.*, 2004; Grote *et al.*, 2006; Kishta *et al.*, 2007) em ambos os gêneros de roedores. Trabalhos vêm demonstrando que o TBT altera funções em glândulas de mamíferos, como o pâncreas, pituitária, gônadas (masculina e feminina) e tireoide (Wada *et al.*, 1982; Oberdörster *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 2000; Podratz *et al.*, 2012; Bertuloso *et al.*, 2015).

A bioacumulação dos OTs ao longo de cadeias alimentares está relacionada a diferentes prejuízos funcionais em mamíferos, como modificações metabólicas *in vivo* e *in vitro* (Grün; Blumberg, 2006; Graceli *et al.*, 2012) e desenvolvimento de fatores de riscos cardiovasculares (Santos *et al.*, 2012). Somado a isso, sabe-se que OTs provocam disfunções reprodutivas (Delgado Filho *et al.*, 2011; Podratz *et al.*, 2012; Graceli *et al.*, 2013) como prejuízos no metabolismo dos hormônios sexuais em roedores (Omura *et al.*, 2001; Grote *et al.*, 2004; Kishta *et al.*, 2007). A exposição humana aos desreguladores endócrinos pode ocorrer pela transferência ao longo de cadeias alimentares, com a ingestão de peixes e mariscos contaminados (Kannan *et al.*, 1995; Chien *et al.*, 2002; Bila e Dezotti, 2007), e também por meio da água contaminada (Lo *et al.*, 2003).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997), a dose considerada segura ou aceitável para humanos em exposição ao TBT é de 250 ng/Kg por dia. Essa dose foi arredondada para 300 ng/Kg por dia pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990). Para se chegar a essa dose é feita a caracterização do risco, avaliando a toxicidade do composto e a relacionando com a exposição à qual o indivíduo é submetido. Dessa forma, estudos de dose-resposta são comumente realizados para se conhecer os parâmetros NOAEL

(Nível de Efeito Adverso Não Observado) e LOAEL (Nível do Menor Efeito Observado) de cada composto químico, ou seja, as doses de referências máxima e mínima, respectivamente, que podem ser administradas sem que haja efeitos adversos no indivíduo exposto ao contaminante. São utilizados, ainda, fatores de incerteza (FI), que são uma extrapolação de dados animais para humanos feita durante a avaliação do risco, fornecendo uma margem de segurança adicional (USEPA, 1997).

Estudos bioquímicos demonstraram que o TBT inibe competitivamente a aromatase, uma enzima da via do citocromo P450 responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos (Matthiessen e Gibbs, 1998; Saitoh *et al.*, 2001), aumentando assim os níveis de hormônios sexuais masculinos e, conseqüentemente, prejudicando o desenvolvimento sexual de ratos (Grote *et al.*, 2004). Além dessa via esteroidogênica, outras também são afetadas pelo TBT, podendo alterar o equilíbrio dinâmico dos níveis hormonais e aumentar os níveis séricos de progesterona. Dessa forma, pode-se ter como resposta a diminuição do peso uterino, da taxa de gravidez e do número de implantes em fêmeas pseudográvidas (Ema; Miyawaki, 2002).

A reprodução é um processo de fundamental importância para a perpetuação das espécies. Nos mamíferos, os gametas masculinos e femininos são produzidos pelos testículos e pelos ovários, respectivamente. Esse processo exige harmonia entre hipotálamo, hipófise e gônadas. Essa harmonia é orquestrada pelo cérebro, mais especificamente dos neurônios hipotalâmicos que produzem o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Esse hormônio, ao chegar à adeno-hipófise, estimula a produção/liberação de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Nas mulheres, esses hormônios vão estimular o crescimento dos folículos ovarianos, a produção do estrogênio, progesterona e inibina. Além disso, o LH induz a ovulação e iniciam a formação do corpo lúteo (Folicori *et al.*, 1986; Magiakou *et al.*, 1997).

O eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HPO), regula entre outros, o ciclo sexual mensal. Esse ciclo pode ser dividido em uma fase folicular, uma ovulatória e uma lútea. A fase folicular tem início logo após a fase lútea tardia do ciclo reprodutivo anterior, ocorrendo o início do crescimento folicular e aumento dos níveis séricos de FSH. Os níveis de LH sobem um ou dois dias depois, momento em que o ovário começa a secretar estradiol. Entre o sétimo e o oitavo dia anterior ao pico pré-ovulatório, a secreção do estradiol aumenta. Essa elevação nos níveis de estradiol é acompanhada pela redução do FSH. Paralelamente, ocorre uma pequena elevação nos níveis séricos de progesterona, seguido pelo pico de LH ovulatório, último estágio de maturação do folículo de Graaf, que se romperá entre a 16^a e 24^a hora seguinte (Magiakou *et al.*, 1997).

Na fase lútea, as células foliculares se encontram lutenizadas. Essas células se tornam hipertrofiadas, com capacidade de síntese hormonal aumentada, aumento de grânulos lipídicos, aumento do volume nuclear e do retículo endoplasmático liso. Dessa forma, o folículo pós-ovulatório se torna cada vez mais vascularizado. O LH é responsável pela sobrevivência e manutenção do corpo lúteo (CL). Nesse momento ocorre o aumento acentuado da progesterona secretada pelo CL. Ocorre também aumento no nível de estrogênio, aumento menor quando comparado com o da progesterona. Esse aumento da progesterona causa o declínio de LH e FSH durante grande parte da fase lútea. No entanto, o FSH começa a se elevar para iniciar o crescimento folicular do ciclo seguinte (Yen, 1978; Filicori *et al.*, 1986; Magiakou *et al.*, 1997).

Em roedores, como ratas, o ciclo estral ou ciclo reprodutivo regular tem duração média de quatro ou cinco dias (Freeman, 1988; Bianchi *et al.*, 2001) e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (Freeman, 1988). No ciclo desses animais, os níveis de LH e FSH se elevam no início da fase folicular, o proestro, que se caracterizam por ser uma fase curta, geralmente dura um dia, e pela predominância de células epiteliais nucleadas presentes na região mais externa vagina das ratas (Schwartz, 1964; Nelson *et al.*, 1982). A fase seguinte, estro, corresponde à fase ovulatória, com progesterona no nível máximo, e se caracteriza pela presença predominante de células epiteliais cornificadas. Essa fase pode ter duração de um a dois dias, dependendo do ciclo ser de quatro ou cinco dias, respectivamente. No metaestro, inicia-se o aumento no nível de estradiol que atingirá seu nível máximo no proestro do ciclo seguinte. Durante essa fase, a secreção de progesterona também se eleva, e volta a se reduzir após o diestro. A fase de metaestro é uma fase de transição de ciclos, não havendo ação máxima de apenas um hormônio. Dessa forma, é possível observar a presença de leucócitos, células nucleadas e cornificadas no esfregaço vaginal. No diestro, observa-se uma grande quantidade de leucócitos, visto que não há descamação na parede da vagina (Schwartz, 1964; Nelson *et al.*, 1982).

O controle do ciclo reprodutivo pela ação de esteróides sexuais é desempenhado principalmente pelo estrogênio e pela progesterona, normalmente via receptores hormonais nucleares específicos, como os receptores de estrogênio α (ER α) e β (ER β), e receptores de progesterona A (RP-A) e B (RP-B) (Kuiper *et al.*, 1996; Gustafsson, 2003; Lemale *et al.*, 2008). Quando esses receptores se ligam aos hormônios específicos, sofrem rearranjos conformacionais, levando a formação de homo ou heterodímeros de ER- α , ER- β , RP-A e RP-B. Quando em atividade, interagem diretamente com alta afinidade com regiões específicas do material genético da célula, chamados elementos responsivos do estrogênio ou da progesterona (Lemale *et al.*, 2008), levando a um estímulo positivo e/ou negativo na expressão gênica.

Embora existam muitas investigações demonstrando os efeitos tóxicos dos OTs em diferentes partes do sistema reprodutivo, como peso dos órgãos sexuais e diferentes fases do desenvolvimento, pouco se sabe sobre as possíveis ações no ciclo reprodutivo de ratas em idade fértil, em função das modificações nos níveis de hormônios sexuais causadas pelo TBT.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar as possíveis alterações no ciclo reprodutivo de ratas com exposição a baixas doses de TBT em um período de trinta dias, para melhor compreender seus efeitos sobre o trato reprodutor feminino.

2.2 - Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da exposição continuada diária ao tributilestanho, em baixas doses, sobre a ciclagem regular, duração das fases e do ciclo reprodutivo, após identificação no lavado vaginal;
- Analisar a histologia ovariana e a contagem dos folículos ovarianos (primordial, primário, pré-antral, antral e atrésico) e corpo lúteo;
- Analisar a histologia uterina pela morfometria das camadas uterinas (miométrio e endométrio);
- Analisar o índice de hipertrofia dos ovários, do útero e da hipófise;
- Analisar as concentrações séricas basais dos hormônios sexuais femininos (estrogênio e progesterona).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais experimentais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) pesando aproximadamente 230 g, com 3 meses de idade, fornecidas pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (43×30×15 cm) em ambiente com temperatura controlada (20-24 °C), iluminação artificial de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisas (FINEP), 12 horas de claro/escuro. As ratas tiveram livre acesso à água e comida durante todo o experimento. Os protocolos experimentais desenvolvidos durante esse projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA), com o registro 106/2011.

3.2 - Grupos experimentais

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em: Grupo Controle-sham (n=8), os animais foram submetidos à gavagem fictícia e mantidos durante 30 dias com veículo (solução etanólica 0.1 %), recebendo água e ração *ad libitum* até o sacrifício. O Grupo Tratado (n=8) por 30 dias com tributilestanho, recebeu uma dose de 100 ng/kg de peso corporal/dia de tratamento do TBT (Sigma, St. Louis, Mo., USA) diluído em solução de etanol 0,4%. Este grupo de animais foi submetido a gavagem com TBT, recebendo água e ração *ad libitum* até o dia de sacrifício.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) e a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), a dose considerada segura ou aceitável para humanos em exposição ao TBT é de 300 ng/Kg por dia. Para se chegar a essa dose é feita a caracterização do risco, avaliando a toxicidade do composto em relação à exposição à qual o indivíduo está submetido. A dose selecionada para o tratamento dos animais no presente trabalho é 3x menor do que a considerada segura para a ingestão diária. Essa seleção permite avaliar os possíveis efeitos tóxicos do TBT, mesmo sob exposição aparentemente segura.

3.3 – Avaliação do Ciclo Estral das Ratas

Para avaliar o ciclo reprodutivo (estral), foi coletada diariamente entre 8 e 9 horas da manhã, a secreção vaginal dos animais obtida após injeção de 10µL de salina (NaCl 0,9 %). Todas as ratas apresentavam ciclo estral regular, de quatro a cinco dias, sendo que o ciclo reprodutivo foi monitorado por análise do esfregaço vaginal recolhido diariamente durante por duas semanas consecutivas antes de iniciar os experimentos (Lisboa et al., 2001; Podratz et al., 2012). Este material foi depositado sobre lâminas, previamente limpas e secas, cada lâmina recebendo o esfregaço vaginal de 3 animais diferentes. Posteriormente, essas lâminas foram banhadas em metanol e coradas com eosina e hematoxilina. Depois de secas, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) para avaliação do ciclo. As fases do ciclo foram determinadas por citologia e pela consistência do muco vaginal: quando observamos muco pouco espesso com predominância de leucócitos, poucas células epiteliais nucleadas bem formadas, e muito pouca ou nenhuma célula cornificada, classificamos como transição de diestro-proestro (DP); muco com consistência média, predominância de células nucleadas, de nenhum a muito pouco leucócitos degenerando e muito pouco a nenhuma célula cornificada, classificamos como proestro (P); se não observamos leucócitos, presença de células nucleadas, predominância de células cornificadas e muco de consistência média, classificamos como transição proestro-estro (PE); muco com consistência média a muito denso e presença apenas de células cornificadas, classificamos o ciclo como estro (E); se o esfregaço apresentar de nenhum a pouco leucócito e predominância de células cornificadas maiores do que em estro, além de muco com densidade média a muito espessa, classificamos a fase como metaestro 1 (M1); na predominância de leucócitos, poucas células nucleadas e irregulares, poucas células cornificadas e muco com espessura de média para muito espesso, classificamos como metaestro 2 (M2); quando observamos predominância de leucócitos e pouquíssimas células nucleadas, muitas vezes irregulares, com muco pouco espesso, classificamos como diestro (D) (Nelson *et al.*, 1982). A frequência total de cada fase observada neste período, para cada animal, foi utilizada para a duração das fases de proestro, estro e metaestro-diestro (em dias), bem como a duração total do ciclo estral. Todas as quantificações foram realizadas por um único observador (Marcondes *et al.*, 2002; Podratz *et al.*, 2012).

3.4 – Avaliação dos pesos dos Órgãos

Após a exposição ao tributilestanho, os animais foram anestesiados com ketamina (30 mg/Kg, *im*) e xilazina (3 mg/Kg, *im*) (Souza *et al.*, 2004) e rapidamente decapitados. De cada rato, foram retirados: hipotálamo, hipófise, coração, pulmão, baço, pâncreas, rins, adrenais, fígado, ovários, útero, gordura parametrial, gordura perirrenal, gordura retroabdominal e gordura retroperitoneal. Esses órgãos foram pesados em balança de alta precisão. Além disso, os ovários e os úteros foram colocados em estufa à 100 °C por 24 horas para avaliação do peso seco e do índice de hipertrofia (razão entre o peso seco e o peso corporal). Todo procedimento de pesagem foi realizado pela mesma pessoa.

3.5 – Avaliação dos Níveis Séricos Hormonais

Após a decapitação, as amostras de sangue foram recolhidas e imediatamente centrifugadas a 3800 rpm, a 4 °C durante 15 minutos para se obter o soro, que foi acondicionado a -20°C para posterior medição dos níveis de estradiol e progesterona por ELISA (Moysés *et al.*, 2001; Podratz *et al.*, 2012). A técnica de ELISA foi utilizada para dosar LH (Kit DS-EIA-GONADOTROPIN-LH, Diagnostic Systems Ltd.) e FSH (DS-EIA-GONADOTROPIN-FSH, Diagnostic Systems Ltd.).

3.6 – Avaliação Histológica dos Ovários e Útero

Após a decapitação, os ovários e útero foram rapidamente removidos. Posteriormente, os órgãos foram fixados em PBS-formol com pH 7,4. Em seguida, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina 60 °C. Em seguida, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica RM 2125 RTS), obtendo 3 secções (5µm)/animal, com 50µm de distância entre elas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e avaliadas pelo Programa AxioVision Rel. 4.8, na Câmera AxioCam ERc5s acoplada ao Microscópio Olympus AX70.

Em cada ovário, os folículos e corpos lúteos foram contados em três cortes por animal e o número foi amostrado por unidade de área (mm²), como descrito por Guerra *et al.*, (2010) e Podratz *et al.* (2012). A classificação desses folículos foi feita de acordo com Borgeest *et al.*, (2002). Os folículos ovarianos foram caracterizados como: primordiais, circundado por uma

camada de células foliculares pavimentosas; primários, circundado por uma camada de células foliculares cúbicas; pré-antrais, apresentaram de duas a quatro camadas de células da granulosa, sem espaço antral; antrais, apresentaram três ou mais camadas de células da granulosa e um espaço antral bem definido; os folículos atrésicos apresentaram células da granulosa desorganizadas, com núcleos picnóticos, ovócitos degenerados e desorganizados, e deslocamento da membrana basal; corpo lúteo, altamente vascularizado, com células da granulosa e da teca modificadas. Para a morfometria uterina, 5 regiões diferentes foram analisadas em cada uma das 3 seções e foi mensurado a espessura do miométrio e endométrio.

3.7 - Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade e apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM). O teste de normalidade usado foi o D'Agostino & Pearson omnibus. Para valores Gaussianos, utilizamos o teste t Student (não pareado), para comparações entre dois grupos, e ANOVA (uma via), seguido pelo teste de Tukey, para comparações de mais de dois grupos e/ou variáveis (como a análise do ciclo e contagem dos folículos). Valores não Gaussianos foram analisados por teste t Student (não-paramétrico), seguido pelo teste Mann-Whitney. A significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$ (programa estatístico Prisma 5.0).

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Ciclo Estral, Dosagem Hormonal e Peso dos Órgãos

Antes do tratamento com o TBT, todos animais apresentaram ciclo estral regular, com duração aproximada de 5 a 6 dias. Após o início do tratamento com TBT, observamos desde o primeiro ciclo um padrão anormal de ciclagem (Figura 1A), com ciclos incompletos ou muito longos.

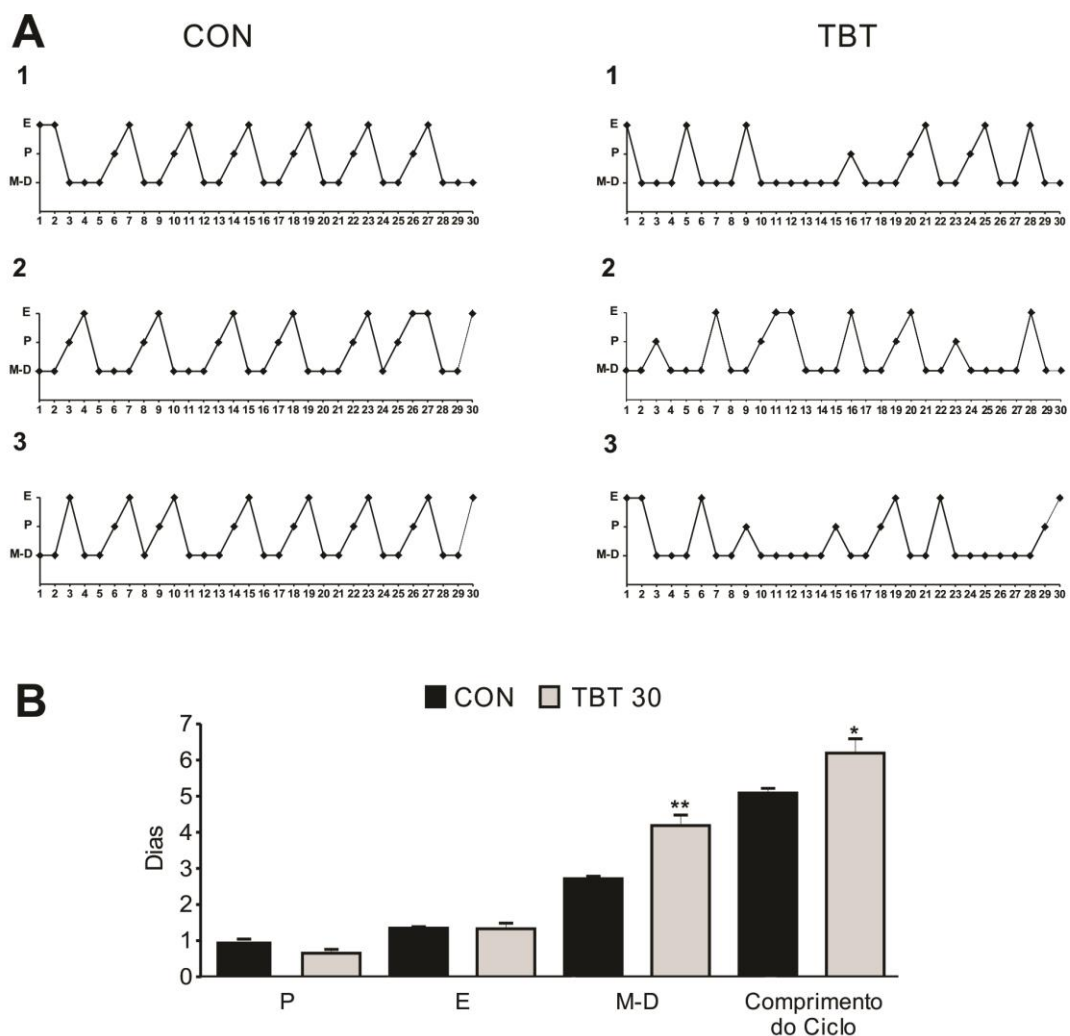


Figura 1: Avaliação do ciclo reprodutivo de ratas. (A) Representação do ciclo reprodutivo, demonstrado o número de dias em que o animal ficou em cada fase, sendo possível avaliar a regularidade do ciclo estral. Análise estatística feita com Test t. (B) Avaliação da duração de cada fase e comprimento do ciclo dos animais TBT e controle, onde P representa a fase de proestro, E a fase metaestro e M-D as fases de metaestro-diestro. Análise estatística feita com ANOVA 1 via. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. N=8

A exposição ao TBT alterou significativamente a regularidade do ciclo estral, durante os 30 dias de tratamento, os animais do grupo controle exibiram uma média de 6 a 7 ciclos, enquanto que os animais tratados com o TBT apresentaram uma média de 4 a 5 ciclos, demonstrando um possível prejuízo causado pelo tratamento. Na análise individual da duração das fases, foi observado que não houve alteração significativa na duração de estro e proestro, enquanto que, em metaestro-diestro (M-D) a fase ficou mais longa (CON: $2,71 \pm 0,07$; TBT: $4,18 \pm 0,29$), em alguns animais durando mais da metade dos dias de tratamento (Figura 1A – TBT 3). A fase M-D nesse trabalho, se caracteriza pela junção das fases de metaestro 1, metaestro 2 e diestro, devido à dificuldade encontrada na diferenciação dessas fases nos animais tratados, elas foram representadas juntas.

Devido a esse aumento na fase de M-D, e manutenção na duração das outras fases, foi observado aumento na duração do ciclo reprodutivo dos animais tratados, enquanto no grupo controle, a duração do ciclo se manteve normal (CON: $5,08 \pm 0,14$; TBT: $6,19 \pm 0,4$). Sportnitz *et al.*, (1999), demonstram que o nível de estrogênio inicia seu aumento na fase de metaestro, sendo o pico hormonal durante o proestro e retornando às concentrações basais na fase do estro. Já a progesterona aumenta durante a fase de metaestro e diestro, seguida pela redução nos níveis séricos, sendo seu pico na fase de proestro, esses resultados são reafirmados pela concentração hormonal demonstrada na Figura 2 (D e E), pois os níveis de estrogênio se encontram reduzidos (CON: $45,87 \pm 2,12$; TBT: $22,58 \pm 0,96$) e os de progesterona aumentados (CON: $4,85 \pm 0,26$; TBT: $18,56 \pm 2,54$). Nossos dados são corroborados com informações da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, 1997), que alega que alterações no peso ovariano podem estar relacionadas à presença de cistos, depleções de folículos ovarianos e ainda a modificações na modulação do hipotálamo e/ou hipófise. Trabalhos prévios de nosso grupo, utilizando tratamento com TBT 100 ng/kg por 15 também levaram a alteração a regularidade e duração das fases do ciclo reprodutivo dos animais em relação ao controle. Foi observado redução no comprimento do ciclo, com diminuição da fase de proestro e diestro, e aumento da fase de metaestro (Podratz *et al.*, 2012). Ao tratar animais por 15 dias (0,6 g/dia) com gastrópodes imposexados, observou-se que em 65 % do tempo de tratamento os animais permaneceram na fase metaestro/diestro. Ainda, estudos anteriores, com a exposição ao Bisfenol-A (BPA), demonstraram resultados semelhantes ao injetar dose de 50 $\mu\text{g/Kg}$ peso corporal dos animais, após duas semanas da abertura vaginal e do contato com BPA, 86% desses animais apresentaram ciclagem irregular, com persistência da fase de estro ou diestro (Adewale *et al.*, 2009).

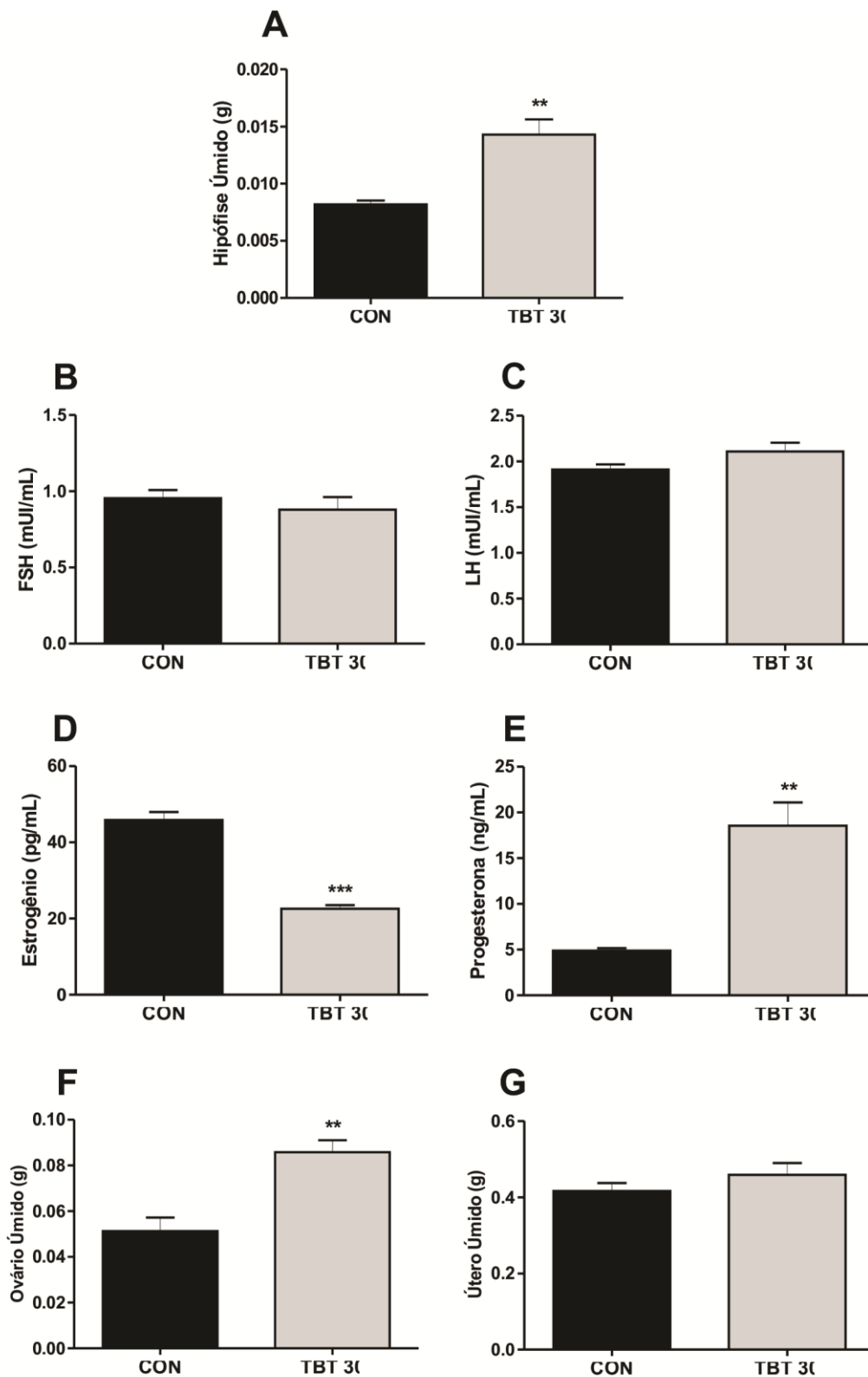


Figura 2: Avaliação biométrica peso dos órgãos e níveis séricos dos hormônios sexuais. (A) Peso úmido da hipófise. (B) Concentrações séricas basais de FSH. (C) Concentrações séricas basais de LH. (D) Níveis séricos de estrogênio. (E) Níveis séricos de progesterona. (F) Peso úmido dos ovários. (G) Peso úmido dos úteros. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Após análise do ciclo estral, avaliamos os níveis dos esteroides ovarianos. No tratamento por 30 dias com TBT, foi observado uma elevação na concentração sérica de progesterona e maior redução nos níveis de 17β -estradiol (Figura 2), como exposto anteriormente. Essas alterações nas concentrações dos hormônios sexuais são reafirmadas ao compará-las com os dados de Podratz *et al.*, 2012, em que houve diminuição nos níveis séricos de 17β -estradiol, bem como aumento nos níveis de progesterona. Uma vez que no ciclo estral regular, o estradiol tem atuação máxima na fase de proestro, pode-se inferir que a redução hormonal estaria influenciando na regularidade do ciclo estral (Figura 1). Somado a isso, o aumento nos níveis de progesterona (Figura 2) e o aumento da fase de metaestro-diestro (Figura 1), sugere que a ação máxima da progesterona em estro se estende ao metaestro, mantendo o nível de células cornificadas elevadas após o tratamento com TBT.

Estudos demonstraram que tratamento com 20ng/mL de TBT ou TPT por 7 dias em linhagens de células tumorais, como granulosa humana (KGC line), induz a diminuição das concentrações de estradiol (Saitoh *et al.*, 2001). Podratz *et al.*, 2015, ao tratar animais com gastrópodes contaminados com TBT, observou aumento significativo nos níveis de estrogênio e progesterona. Grote *et al.*, 2006, concluiu que após um tratamento com TBT com 6 mg/Kg, houve elevação no nível sérico desse hormônio, apesar de ter encontrado redução na atividade da aromatase ovariana. Esses dados de variação dos esteroides no sangue sugerem que uma disfunção ovariana esteja ocorrendo, podendo ser resultado do efeito do OTs diretamente na gônada, levando a prejuízos morfológicos, como apoptose celular das granulosa e/ou alteração no desenvolvimento folicular, ou por algum distúrbio no mecanismo de feedback ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (HPG) (Grote *et al.*, 2006).

Dessa forma, objetivando avaliar a ação do TBT nesse eixo, foi feita a pesagem da hipófise e a quantificação nos níveis séricos de LH e FSH (Figura 2). Como resultado, foi observado aumento no peso da hipófise, mostrando que a ação do TBT provoca alguma alteração anatomorfológica nessa glândula, com possíveis prejuízos no eixo HPG. Além disso, observamos redução considerável no peso do hipotálamo (Tabela 1), indicando que o TBT está exercendo algum efeito de forma direta e/ou indireta nessa região do cérebro. Sabe-se que, em humanos, o hipotálamo possui grande importância e sofre mecanismo inibitório do estrogênio por controlar os pulsos de GnRH (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1067), dessa forma, a redução do estrogênio causada pelo tratamento, pode estar interferindo no funcionamento do hipotálamo nesses animais. No entanto, os níveis séricos basais de LH e FSH não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Os níveis desses hormônios são modulados pelo estrogênio e pela progesterona, podendo ser diretamente nos gonadotrofos, ou

em neurônios do sistema nervoso que modulam direta ou indiretamente a ação do GnRH (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1068). Dessa forma, devido à alteração nos níveis de estrogênio e progesterona, esperávamos encontrar alterações nos níveis de LH e FSH. Como seus níveis basais não apresentaram irregularidades, focamos o estudo nas alterações relacionadas aos órgãos reprodutores. No entanto, esses dados deixam claro que a atuação do TBT no eixo HPG precisa ser melhor investigada em trabalhos futuros.

Tabela 1: Avaliação de peso corporal e úmido dos órgãos de TBT 30 e CON. Os valores reportados como média \pm E.P.M. **p < 0,01.

Pesos Órgãos (g)	COM	TBT
Peso corporal	220,9 \pm 1,75	244,83 \pm 2,93**
Hipotálamo	0,35 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01**
Coração	0,88 \pm 0,02	0,89 \pm 0,04
Pulmão	1,51 \pm 0,02	1,66 \pm 0,08
Baço	0,57 \pm 0,01	0,56 \pm 0,02
Pâncreas	0,46 \pm 0,03	0,54 \pm 0,04
Fígado	7,23 \pm 0,12	7,44 \pm 0,24
Adrenal	0,17 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02
Rim	1,52 \pm 0,05	1,46 \pm 0,04
Gordura Parametrial	3,59 \pm 0,5	6,08 \pm 0,52*
Gordura Retroabdominal	1,28 \pm 0,13	1,85 \pm 0,07
Gordura Perirrenal	2,42 \pm 0,09	3,0 \pm 0,39
Gordura Retroperitoneal	3,19 \pm 0,21	3,82 \pm 0,26

Visto que o TBT pode inibir a ação da aromatase, enzima envolvida na conversão de andrógenos em estrógenos durante a fase folicular, a diminuição do estradiol e o aumento da progesterona eram esperados. No entanto, se compararmos a trabalhos anteriores do nosso grupo, a manutenção dos pesos do fígado e algumas gorduras (Tabela 1) não eram esperadas, uma vez que já foi demonstrado que tratamento com TBT na dose de 100 ng/Kg peso corporal por 16 dias, promoveu aumento no peso corporal dos animais, além de aumento no peso das gorduras parametrial e retroperitoneal, bem como no peso do fígado (Bertuloso *et al.*, 2015). Foi observado também, aumento no peso úmido do ovário, enquanto que o peso do útero não

mostrou alteração significativa em relação ao grupo controle. Os dados publicados deste parâmetro são controversos. Enquanto Wester *et al.* (1990) observou a diminuição no peso ovariano ao administrar uma dose de 50mg de TBTO/kg. Grote *et al.* (2006) encontrou aumento no peso ovariano dos animais expostos a doses de 2 a 6 mg/Kg/dia de TPT. Por outro lado, Podratz *et al.* (2012), ao administrar a dose de 100 ng/Kg de peso corporal, por 16 dias, observou redução no peso do ovário, não encontrando alteração significativa no peso do útero. Provavelmente, estes dados conflitantes se relacionam com a dose, tempo de exposição, espécie e a via de ação específica de cada composto utilizado.

O aumento no peso ovariano pode sugerir que esse órgão seja mais suscetível à alterações do que os demais órgãos, como o útero por exemplo, podendo ser mais responsável à variações nos níveis de hormônios sexuais do que os órgãos representados na Tabela 1. Cooke *et al.* (2004) registraram diminuição de peso em órgãos como timo, baço e fígado de ratos que sofreram exposição ao TBTCI *in útero* e durante a lactação, com doses de 0,025; 0,25 e 2,5 mg/Kg. Por outro lado, doses mais elevadas, como demonstrado por Baroncelli *et al.* (1995) ao administrar doses de 40 mg/Kg de TBTO, Noda *et al.* (1991) ao administrar 16 mg/Kg de TBTA e Ema *et al.* (1995) ao administrar 25 e 100 mg/Kg de TBTCI, provocam efeitos tóxicos quem promovem alterações viscerais, comprometem a estrutura do esqueleto, e ainda apresentam potencial teratogênico tanto em ratos como em camundongos. Ogata e colaboradores (2001) observaram que ratas, após tratamento com doses variadas de TBTCI, apresentaram índice de fertilidade normal, mas com redução no número de fetos vivos, e diminuição no peso corporal dos filhotes. Além de comprometer o aumento de peso gestacional, esses animais apresentavam redução no peso dos ovários, aumento no peso uterino e irregularidades no ciclo estral.

4.2 – Análise Histológica

Além das alterações no peso, encontramos modificações morfológicas no tecido ovariano dos animais tratados com TBT em relação ao controle (Figura 3). As ratas do grupo controle apresentaram folículos primordiais, primários, pré-antrais, antrais e corpo lúteo com estruturas de aspecto normal. No entanto, os animais expostos ao TBT apresentaram aumento na quantidade de folículos císticos, atresícos e redução do CL. A presença do CL desenvolve um papel importante no comprimento do ciclo, pois somente depois de sua degeneração é que a concentração de esteroides no sangue diminui e o FSH passa a ser liberado em maiores quantidades, estimulando o desenvolvimento de um novo grupo folicular e, conseqüentemente,

um novo ciclo. A redução no número de corpo lúteo acarretaria em um ciclo mais curto, mas, como observado na Figura 1, o ciclo dos animais ficou mais longo. No entanto, como dito anteriormente, esse aumento no ciclo pode ser relacionado as alterações na regularidade dos picos de estrogênio e progesterona, que, segundo Boutin; Cunha (1997), pode provocar um efeito negativo sobre a proliferação e diferenciação celular durante o ciclo estral, caracterizando uma disfunção ovariana que é causada pelo OT. Mesmo com a diminuição de CL, os níveis de FSH basais não sofreram alterações (Figura 2).

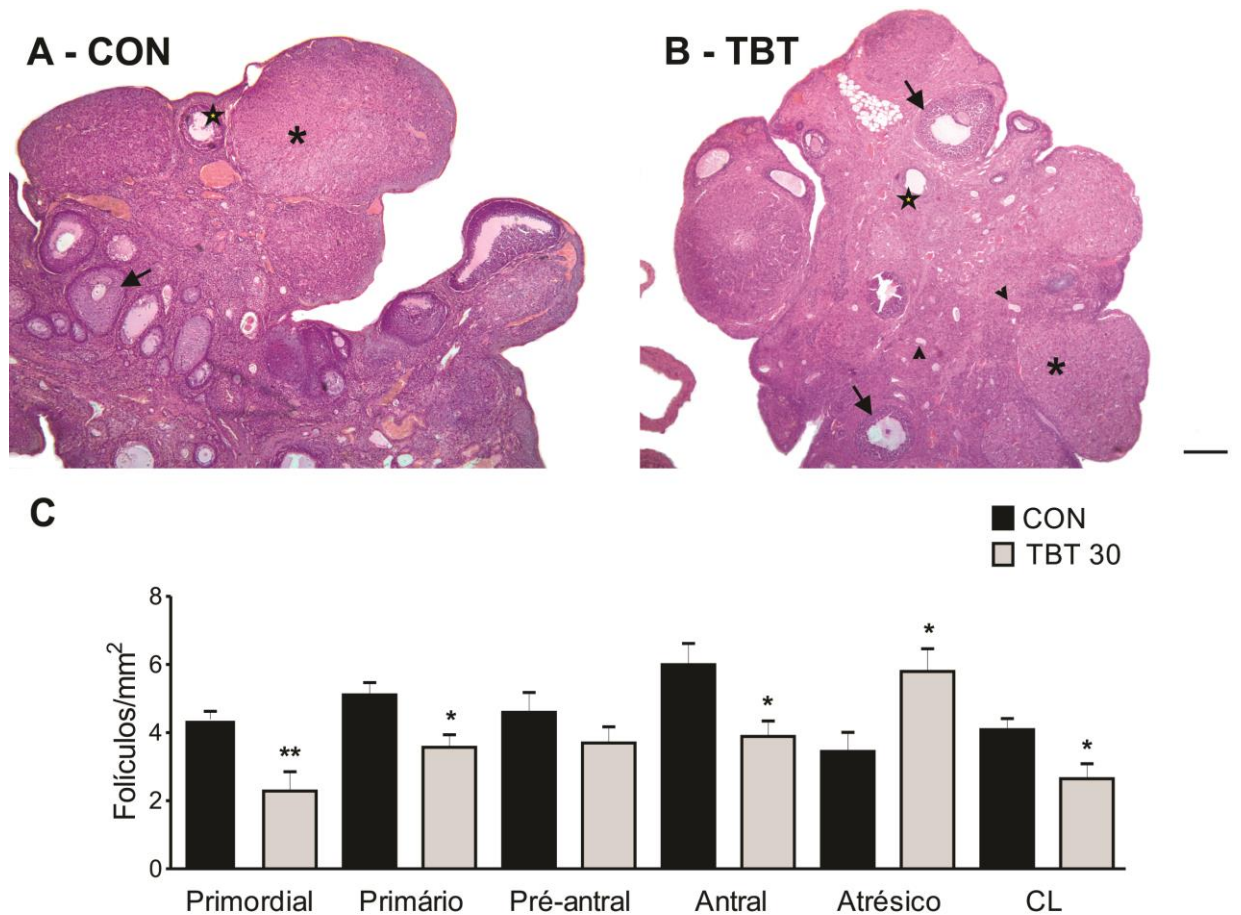


Figura 3: (A) Análise histológica de ovário de animal controle com aparência normal. (B) Análise histológica de ovário de animal tratado com TBT, presença de folículos atrésicos. Podemos observar folículos ovarianos antrais (seta), atrésicos (estrela), císticos (ponta de seta) e CL (asterisco). (C) Representação gráfica do número de folículos/área. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. (Barra: 200 μ m)

Como demonstrado na Tabela 2, o estrogênio participa da retroalimentação negativa com o FSH no processo de dominância folicular, esse processo é o responsável por selecionar um folículo que completará o seu desenvolvimento naquele ciclo, pois os folículos menos desenvolvidos são mais dependentes do FSH para se manterem viáveis (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1067). Dessa forma, as baixas concentrações de estrogênio prejudicam o desenvolvimento folicular, aumentando o número de folículos atrésicos presentes nesse ovário. A atresia folicular é o mecanismo de eliminação de folículos que iniciaram o desenvolvimento folicular, mas não conseguiram atingir a ovulação. A atresia ocorre desde a vida fetal, até a menopausa e pode ser causada pela inversão da relação estrogênio/androgênio no folículo, provocando hiperandrogenismo folicular (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1061). Esse processo pode ser potencializado pela redução da ação da Aromatase, pois essa enzima, quando estimulada pelo FSH, é responsável por converter os andrógenos provenientes da teca interna, em estrógenos (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1068). Dessa forma, a redução da ação da aromatase e níveis de estrogênio, são os responsáveis pelo aumento no número de folículos atrésico.

Tabela 2: Representação da ação do estrogênio e da progesterona nas fases de desenvolvimento uterino durante o ciclo sexual.

Estrogênio	Fase folicular	Aumento da musculatura uterina
		Proliferação celular
		Desenvolvimento da camada basal, vasos sanguíneos e glândulas endométricas
	Fase proliferativa	Secreção de muco fino
		Retenção de líquidos e eletrólitos
		Expressão dos receptores de progesterona
Estrogênio + progesterona	Fase secretora	Aumento do endométrio
		Desenvolvimento das artérias do endométrio

Foi observado também, redução nos folículos primordiais e primários, enquanto que os folículos pré-antrais não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, em relação ao controle. A partir da gráfico C da Figura 3, é possível observar um padrão na contagem de folículos dos animais tratados, pois a redução dos folículos primordiais é seguida pela redução dos primários e manutenção dos pré-antrais. Em seguida ocorre a redução dos folículos antrais e do CL, resultando no aumento dos folículos atresícos, além do aumento de folículos císticos, como explicado anteriormente pela retroalimentação estrogênio-FSH nos ovários. Esses dados evidenciam o desequilíbrio, significativo, do desenvolvimento folicular que resulta da exposição ao TBT. Trabalhos semelhantes demonstraram que o tratamento com TBTCI gera aumento no número de células germinativas degeneradas (Kishta *et al.*, 2007).

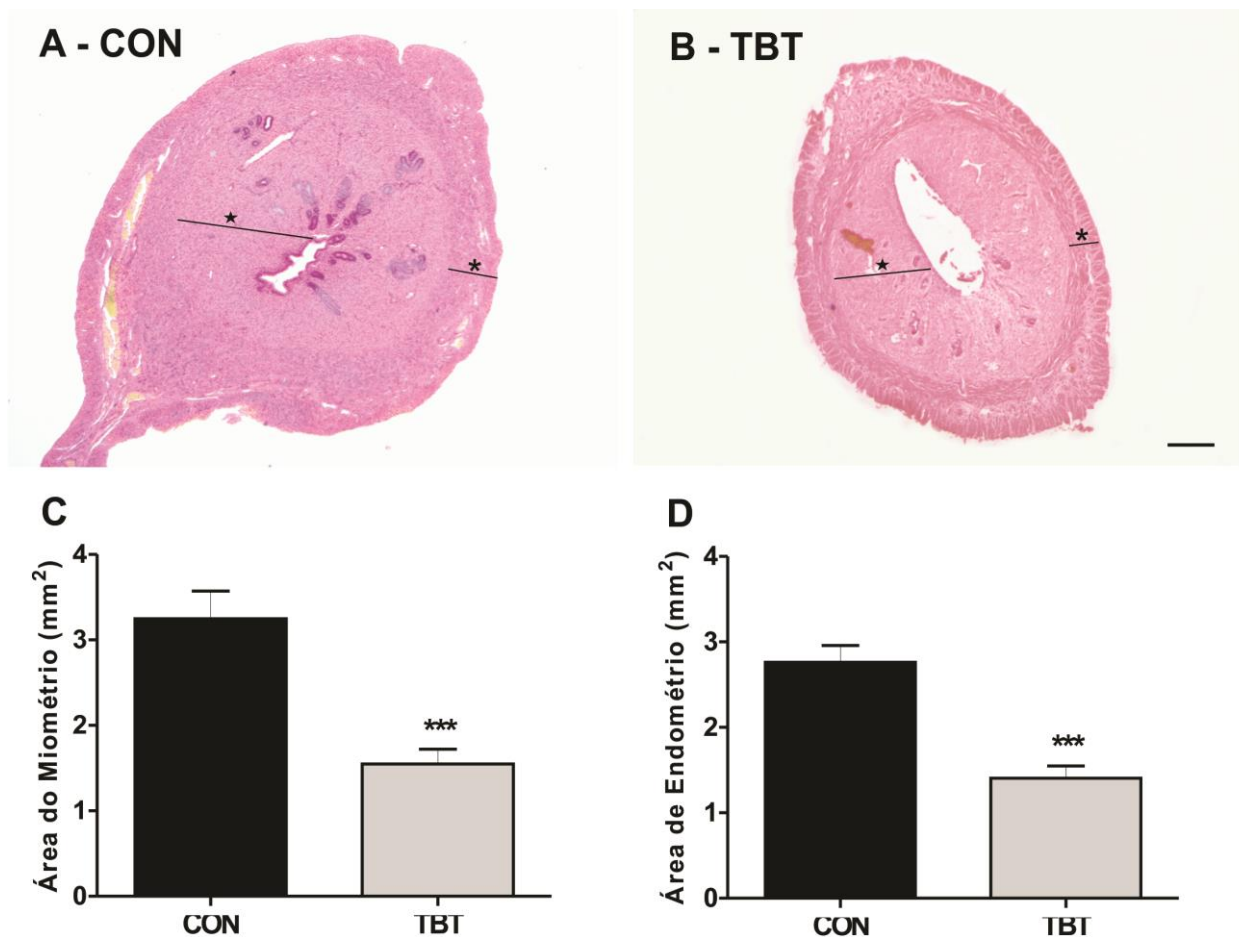


Figura 4: (A) Histologia de útero de animal controle. (B) Histologia de útero de animal tratado com TBT. Sendo possível observar a área do endométrio (estrela) e área do miométrio (asterisco). (C) Avaliação morfométrica da área do miométrio uterino. (D) Avaliação morfométrica do endométrio uterino. (Barra: 200µm)

A análise histológica (Figura 4 B) demonstrou que a área de endométrio e de miométrio, no grupo TBT, se encontram reduzidas. Esses dados são explicáveis, pois no início da fase folicular, o crescente nível de estrogênio promove aumento da musculatura uterina e proliferação das células do estroma e da camada epitelial. Os estrogênios também possuem efeito no desenvolvimento da camada basal, glândulas endométricas e vasos sanguíneos. Na fase proliferativa, essas glândulas se desenvolvem e passam a secretar muco fino, além de ocorrer aumento na retenção de líquidos e eletrólitos, o que torna o órgão edemaciado nessa fase. O estrogênio é responsável também por induzir a expressão dos receptores de progesterona. Na fase secretora, além do estrogênio que promoverá a continuação do aumento do endométrio, a progesterona passa a ser secretada e estimula o desenvolvimento completo das artérias responsáveis pela irrigação do endométrio. Com a redução dos níveis desses hormônios, o endométrio atrofia (Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A., 2008, p. 1070)

A redução nas áreas de miométrio e endométrio é dado coerente, uma vez que o estrogênio possui grande influência proliferativa nesse órgão (Kwekel *et al.*, 2005). Dessa forma, a redução nos níveis desse hormônio sexual prejudicaria o desenvolvimento das estruturas associadas ao aumento do endométrio. Apesar dos elevados níveis de progesterona, que também é um hormônio importante no processo, pois estimula o desenvolvimento das artérias que farão a irrigação do endométrio, sua ação é prejudicada pela redução do estrogênio, uma vez que ele é o responsável por prepara o útero para a ação da progesterona. Outro fator observado na histologia foi a redução na área de miométrio nos animais tratados, esse dado também se relaciona com a baixa do estrogênio, hormônio que, como dito anteriormente, é o responsável pelo aumento da musculatura uterina.

Em 2012, Podratz *et al.*, observou que o peso do útero/100g de peso corporal não mostrou alterações significantes, em um tratamento por 16 dias (100ng/Kg), resultado semelhante ao observado no presente estudo. Apesar das reduções do endométrio e miométrio, não foi observado aumento significativo no peso úmido dos úteros desses animais. Isso demonstra que o útero, assim como o ovário, sofre influência do TBT, uma vez que a morfofisiologia desses órgãos está intimamente relacionada às concentrações dos hormônios sexuais disponíveis nos organismos.

5 – Conclusão

Os resultados obtidos revelam uma interação entre a exposição a baixas doses de TBT e as alterações no trato reprodutivo feminino, talvez tempo dependente, exemplificados pelas mudanças na regularidade e duração ciclo reprodutivos, na morfofisiologia dos órgãos sexuais nos animais tratados, bem como nos níveis dos hormônios sexuais femininos. Dessa forma, a caracterização dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesses prejuízos, pode levar a uma melhor compreensão dos possíveis efeitos do TBT em mamíferos do sexo feminino. Além disso, nos possibilita entender a real situação da costa brasileira, e a necessidade do monitoramento eficiente do uso de poluentes que trazem risco a saúde humana e ambiental, e se necessário intervir nessas práticas a fim de evitar mais prejuízos futuros.

6 – Referências

1. Adewale, H.B., Jefferson, W.N., Newbold, R.R., Patisaul, H.B. Neonatal Bisphenol-A Exposure Alters Rat Reproductive Development and Ovarian Morphology Without Impairing Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. **Biology of Reproduction**. 81:690-699, 2009.
2. Alzieu, C. Tributyltin case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & coastal management**, v. 40, p. 23–36, 1998.
3. Baroncelli, S.; Karrer, D.; Turillazzi, P.G.; Oral bis (tri-n-butyltin) oxide in pregnant mice. I. Potential influence of maternal behavior on postnatal mortality. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 46, p. 355-367, 1995.
4. Bertuloso, D.B.; Podratz, P.L.; Merlo, E.; de Araújo, J.F.P.; Lima, L.C.F.; de Miguel, E.C.; de Souza, L.N.; Gava, A.L.; de Oliveira, M.; Miranda-Alves, L.; Carneiro, M.T.W.D.; Nogueira, C.R.; Graceli, J.B. Tributyltin Chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters.**, v. 235(1), p. 45-59, 2015.
5. Bianchi, F. J.; Tanno, A. P.; Marcondes, F. K. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à norepinefrina em ratas no proestro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 391–398, 2001.
6. Bila, D. M.; Dezotti, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 2007.
7. Blunden, S. J.; Evans, C. J. Organotin compounds In: Hutzinger, O (Ed) **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlin:Springer-Verlog, v.3, p.1-44, 1990.
8. Borgeest, C., Symonds, D., Mayer, L.P., Hoyer, P.B., Flaws, J.A. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. **Toxicological Sciences**. 68:473–478, 2002.
9. Boutin, E. L.; Cunha, G. R. Estrogen-induced epithelial proliferation and cornification are uncoupled in sinus vaginal epithelium associated with uterine stroma. **Differentiation**, v. 62, p. 171–178, 1997.
10. Brown, R. P.; Greer, R. D.; Mihaich, E. M.; Guiney, P. D. A critical review of the scientific literature on potential endocrine-mediated effects in fish and wildlife. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, p. 17-25. 2001.
11. Casals-Casas, C.; Desvergne, B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual review of physiology**, v. 73, p. 135–162. 2011.

12. Chien, L. C.; Hung, T.C.; Chaoang, K. Y. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd e As, for fishermen in Taiwan. **Science of the Total Environmental**, v. 285, p. 117-185, 2002.
13. Colborn, T.; Vom Saal, F. S.; Soto, A. M. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental health perspectives**, v. 101, p. 378–84, 1993.
14. Cooke, G. M; Tryphonas, H.; Pulido, O.; Caldwell, D.; Bondy, G. S.; Forsyth, D. 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, p. 211-220, 2004.
15. Delgado Filho, V. S.; Mancini, C. N.; Silva, I. V.; Pedrosa, D. F.; Destefani, A. C.; Samoto, V. Y.; Takiya, C. M.; Graceli, J. B. Endocrine disruption induced by triorganotin (iv) compounds: Impacts in the reproductive and genetic function. **Journal of medical genetics**, v.2, p. 29–37, 2010.
16. Delgado Filho, V. S.; Lopes, P. F.; Podratz, P. L.; Gracelli, J. B. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 958–965, 2011.
17. Ema, M.; Kurosaka, R.; Amano, H.; Ogawa, Y. Further evaluation of the development toxicity of tributyltin chloride in rats. **Toxicology**, v, 96, p. 195-201, 1995.
18. Ema, M.; Miyawaki, E. Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. **Reproductive toxicology**, v. 16, p. 309–317, 2002.
19. Fent, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. 26:1-117, 1996.
20. Filicore, M., Merriam, G.R., Crowley, W.F.Jr. Characterization of the physiological pattern o episodic gonodotropin secretion throughout the human menstrual cycle. **Journal Clinical Endocrinology Metabilism**. 62:1136-1144, 1986.
21. Franci, C.R.; Anselmo-Franci, J., A. Sistema reprodutor feminino. In: Aires, Margarida de Mello. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
22. Freeman, M. E. The ovarian cycle of the rat. E. KNOBIL and J. NEIL. (eds). In: **Physiology of reproduction**, New York: Raven Press Ltd, p. 1893-1928, 1988.
23. Gadd, G. M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **The Science of the Total Environment**, v. 258, p. 119-127, 2000.

24. Godoi, A. F. L.; Favoreto, R.; Santiago-Silva, M. Environmental contamination for organotin compounds. **Química Nova**, v. 26, p. 708-716, 2003.
25. Graceli, J. B.; Sena, G. C.; Lopes, P. F.; Zamprogno, G. C.; da Costa, M. B.; Godoi, A. F.; dos Santos, D. M.; de Marchi, M.R; dos Santos Fernandez, M. A. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 40-52, 2013.
26. Gracelli, J.B., Souza-Menezes, J., Barbosa, C.M., Ornellas, F.S., Takiya, C.M., Aalves, L.M., Wengert, M., Feltran GDA, S., Caruso-Neves, C., Móyses, M.R., Prota, L.F., Morales, M.M. Role of estrogen and progesterone in the modulation of CNG-A1 and Na/K⁺-ATPase expression in the renal córtex. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 160-172, 2012.
27. Grote, K.; Stahlschmidt, B.; Talsness, C. E.; Gericke, C.; Appel, K. E.; Chahoud, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p.145–158, 2004.
28. Grote, K., Andrade, A.J.M., Wichert, G.S., Kuriyama, S.N., Talsness, C.E., Appel, K.E., Chahoud, I. Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. **Toxicology** 222:17-24, 2006.
29. Grün, F.; Blumberg, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v. 147, p. S50–S55, 2006.
30. Guerra, M. T.; Scarano, W. R.; de Toledo, F. C.; Franci, J. A.; Kempinas, W. DE G. Reproductive development and function of female rats exposed to di-*o*-cresyl-*o*-phthalate (DBP) *in utero* and during lactation. **Reproductive toxicology**, v. 29, p. 99–105, 2010.
31. Gustafsson, J. A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p.479 –485, 2003.
32. Hoch M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Applied geochemistry**, v. 16, p. 719–743, 2001.
33. IMO. **Sistemas anti-incrustantes: hacia una solución no tóxica** [on line]. London: International Maritime Organization. 1999. Disponível em: <http://www.imo.org/blast/blastDataHelper.asp?data_id=2319&filename=Antifoulingspanish.pdf> Acessado em: 01 de agosto de 2015.
34. Kishta, O., Adeeko, A., Li, D., Luu, T., Brawer, J.R., Morales, C., Hermo, L., Robaire, B., Hales, B.F., Barthelemy, J., Cyr, D.G., Trasler, J.M. 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**. 23(1), 1-11, 2007.

35. Kannan, K.; Tanabe, S.; Iwata, H.; Tatsukawa, R. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. **Environmental pollution**, v. 90, p. 279-290, 1995.
36. Kuiper, G. G. J. M.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5430-5925, 1996.
37. Kovalchuck, O.; Kovalchuck, I.; Arkipov, A.; Telyuk, P.; Hohn, B.; Kovalchuck, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test realibly measures genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v. 415, p. 47-57, 1998.
38. Kwekel, J.C., Burgoon, L.D., Burt, J.W., Harkema, J.R., Zacharewski, T.R. A cross-species analysis of the rodent uterotrophic program: elucidation of conserved responses and targets of estrogen signaling. **Physiological Genomics**; 23: 327-342, 2005.
39. Langston, W.J.; Pope, N.D. Determinants of TBT Adsorption and Desorption in Estuarine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**. v.31, n1-3, p.32-43, 1995.
40. Lemale, J.; Bloch-Faure, M.; Grimont, A.; El Abida, B.; Imbert-Teboul, M.; Crambert, G. Membrane progestin receptors alpha and gamma in renal epithelium. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, p. 2234-40, 2008.
41. Lisbôa, P. C.; Curty, F. H.; Moreira, R. M.; Oliveira, K. J.; Pazos-Moura, C. C. Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. **Hormone and metabolic research**, v. 33, p. 532–535, 2001.
42. Lo, S.; Allera, A.; Albers, P.; Heimbrecht, J.; Jantzen, E.; Klingmuller, D.; et al. Dithioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 84, p. 569-576, 2003.
43. Luijten, J. G. A. Applications and Biological Effects of Organotin Compounds. IN: Sawyer, A. K., (ed). Organotin Compounds. **New York: Dekker**, v.3, p.931-974, 1987.
44. Magiakou, M. A.; Mastorakos, G.; Webster, E.; Chrousos, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 17, p. 42-56, 1997.
45. Marcondes, F.K., Bianchi, E.J., Tanno, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats:some helpful considerations. **Brazilian Journal Biology**. 62:609-614, 2002.

46. Matthiessen, P.; Waldock, R.; Thain, J. E.; Waite, M. E.; Scrope-Howe, S. Changes in periwinkle (*Littorina littorea*) populations following the ban on TBTbased antifoulings on small boats in the United Kingdom. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 30, p. 180–194, 1995.
47. Matthiessen, P., and Gibbs, P.E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 17(1):37-43, 1998.
48. Moysés, M. R.; Barker, L. A.; Cabral, A. M. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 949–958, 2001.
49. Noda, T.; Morita, S.; Yamano, T.; Shimizu, M.; Kakamura, T.; Saitoh, M.; Yamada, A. Teratogenic study of tri-*n*-butyltin acetate in rats by oral administration. **Toxicology Letters**, v. 55, p. 109-115, 1991b.
50. Nelson, J.F.; Felicio, L.S.; Randall, P.K.; Sims, C.; Finch, C.E. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of reproduction**, v. 27, p. 327-339, 1982.
51. Oberdorster, E.; Rittschof, D.; Leblanc, G. A. Alteration of [14C]-testosterone metabolism after chronic exposure of *Daphnia magna* to tributyltin. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, p. 21–25, 1998.
52. Ogata, R., Omura, M., Shimasaki, Y., Kubo, K., Oshima, Y., Aou, S., Inoue, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. **J. Toxicol. Environmental Health A**. 63:127–144, 2001.
53. Ohhira, S.; Watanabe, M.; Matsui, H. Metabolism of tributyltin and triphenyltin by rat, hamster and human hepatic microsomes. **Archives of toxicology**, v. 77, p. 138-144. 2003.
54. Omura, M.; Ogata, R.; Kubo, K.; Shimasaki, Y.; Aou, S.; Oshima, Y.; Tanaka, A.; Hirata, M.; Makita, Y.; Inoue, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 64, p. 224–232, 2001.
55. Patin, S. A; Pollution and the Biological Resources of the Oceans, **Butterworth Scientific: London**, 1982.
56. Podratz, P. L.; Delgado Filho, V. S.; Lopes, P. F. I.; Sena, G. C.; Matsumoto, S. T.; Samoto, V. Y.; Takiya, C. M.; de Castro Miguel, E.; Silva, I. V.; Graceli, J. B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, p. 1035-46, 2012.

57. Podratz, P. L.; Merlo, E.; Sena, G.C.; Morozesk, M.; Bonomo M.M.; Matsumoto, S. T.; da Costa, M. B.; Zamprogno, G.C.; Brandão, P.A.; Carneiro, M. T.; Miguel Ede, C.; Miranda-Alves, L.; Silva, I. V.; Graceli, J. B. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 29-42, 2015.
58. Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 289:198-204, 2001.
59. Schwartz, N. B. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. **American Journal of Physiology**, v. 107, p. 1251–1259, 1964.
60. Shi, H. H.; Huang, C. J.; Zhu, S. X.; Yu, X. J.; XIE, W., Y. Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters in mainland China. **Marine Ecology Progress Series**, v. 304, p. 179-189, 2005.
61. Souza, D.R., Mill, J.G., Cabral, A.M. Chronic experimental myocardial infarction produces antinatriuresis by a renal nerve-dependent mechanism. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**. 37(2):285-293, 2004.
62. Spornitz, U. M.; Socin, C. D.; Dravid, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **The Anatomical Record**, v. 254, p. 116–126, 1999.
63. Tabb, M.; Blumberg, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. **Molecular endocrinology**, v.20, p. 475–82, 2006.
64. USEPA (Environmental Protection Agency). Tributyltin oxide [Online] 1997. Toxicological review. <<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0349tr.pdf>> acessado em Maio de 2013.
65. Vos, J. G.; Dybing, E.; Greim, H. A.; Ladefoged, O.; Lambre, C.; Tarazona, J. V.; Brandt, I.; Vathaak, A. D. Health effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000.
66. Wada, O.; Manabe, S.; Iwai, H.; Arakawa, Y. Recent progress in the study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. **Sangyo Igaku**, v. 24, p. 24-54, 1982.
67. Wester, P. W.; Krajnc, E. I.; Van Leeuwen, F. X.; Loeber, J. G.; Van Der Heijden, C. A.; Vaessen, H. A.; Helleman, P. W. Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in the rat. **Food and chemical toxicology**, v. 28, p. 179-196, 1990.

68. World Health Organization (WHO), 1990. IPCS, environmental health criteria 116, tributyltin compounds. WHO Offset Publication No. 38. WHO, Geneva.
69. Yen, S. S. C. The human menstrual cycle. S. S. C. YEN & R. B. JAFFE (eds). In **Reproductive Endocrinology**. Saunders. Philadelphia, PA, 1978, 126 p.