

**NADYELLEM GRACIANO DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO BENZOATO DE TRIBUTILESTANHO E DO  
IODETO DE TRIBUTILESTANHO EM RECEPTORES ATIVADOS POR  
PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS E RECEPTORES DE GLICOCORTICOIDE**

**BRASÍLIA**

**2015**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**NADYELLEM GRACIANO DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO BENZOATO DE TRIBUTILESTANHO E DO  
IODETO DE TRIBUTILESTANHO EM RECEPTORES ATIVADOS POR  
PROLIFERADORES PEROXISSOMAS E RECEPTORES DE GLICOCORTICOIDE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Angélica Amorim Amato**

**BRASÍLIA**

**2015**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Catlogração da Publicação

d586 da Silva, Nadyellem Graciano  
INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO BENZOATO DE  
TRIBUTILESTANHO E DO IODETO DE TRIBUTILESTANHO EM  
RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAI  
E RECEPTORES DE GLICOCORTICOIDE / Nadyellem Graciano  
da Silva; orientador Angélica Amorim Amato. --  
Brasília, 2015.  
92 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências  
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. Desreguladores endócrinos. 2. Obesidade. I.  
Amato, Angélica Amorim, orient. II. Título.

Nadyellem Graciano da Silva

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO BENZOATO DE TRIBUTILESTANHO E DO IODETO DE TRIBUTILESTANHO EM RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS E RECEPTORES DE GLICOCORTICOIDE.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 07 de Agosto de 2015.

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Amorim Amato- Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Borin- Universidade de Brasília

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Michella Soares Coelho

---

Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra

A Deus por me dar a oportunidade de adquirir novos conhecimentos. A meus pais Alpin (*in memoriam*) e Margarida pelo incentivo, amor e apoio prestado. A minha irmã Nayara, pela cumplicidade e alegria.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, me dando saúde, me fortalecendo e me iluminando todos os dias para que eu pudesse realizar mais este sonho.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Angélica, um anjo de Deus em minha vida, por me apontar os caminhos com tanta sabedoria, por ser tão competente e extraordinária, por ser tão humilde e compreensiva, por ser a melhor orientadora que eu poderia ter tido. Uma mãe, uma amiga e uma fonte diária de inspiração.

Ao meu pai, Alpin, que mesmo não estando mais fisicamente ao meu lado, me deixou o grande exemplo de perseverança e de honestidade e por sempre me proteger.

À minha mãe, Margarida, que sempre foi meu alicerce de amor e conforto, meu exemplo de força, e que mesmo com grande dificuldade sempre me permitiu sonhar e realizar todos os meus ideais.

À minha irmã, Nayara, que em todos os momentos foi minha melhor amiga, minha fonte incansável de alegria e por nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Ao meu namorado, João Paulo, que sempre esteve ao meu lado entendendo os momentos em que eu precisei estar ausente e não pude dedicar-lhe toda a atenção que merece e por fazer dos momentos mais difíceis, mais brandos com suas palavras de amor constante e apoio.

À minha amiga e irmã de coração, Carol, por ser meu alicerce constante nesta fase e por sempre ser a palavra de calma e pensamentos positivos nos momentos mais difíceis. Você estará sempre em minhas orações!

À Fernanda, uma amiga verdadeira, pessoa que contagia a todos com sua alegria e humildade, por ser meu exemplo de amor a profissão.

Aos meus amigos do Farmol Cinthia, Janice, Bruna, Camila, Pedro, Sidney, Martin, Yasmin, Bel, Cibele, Sônia, Henrique, Érica, Isadora e Dileesh por serem tão especiais e por tornar os dias de experimentos mais divertidos.

À Mariella, Simone e Flora, em especial, por me auxiliarem com os experimentos e pelos ensinamentos. Sem vocês esta etapa teria sido muito mais difícil.

À Michella e à Carol, por me ajudarem com as PCRs. Vocês espalham doçura por onde passam. Obrigada por me ensinar com tanto carinho e paciência.

À Carol Taveira, minha PIBIC mais que especial, que se faz presente em outro plano, por se tornar inesquecível, por me ajudar na realização dos experimentos e por me fazer enxergar a vida de uma forma mais leve e feliz.

À Alana e ao Kenzo, meus PIBICS queridos por estarem sempre ao meu lado, me auxiliando nos experimentos, por serem tão curiosos e atenciosos. Vocês foram essenciais!

À Rilva, pela disposição e paciência em ajudar e orientar.

A todos os estagiários do Farmol, em especial a Hanna, por sempre me ajudar com os materiais e sempre tornar os nossos dias mais alegres com seu sorriso incansável.

Aos professores do “Farmol” Francisco, Fátima, Luiz, Djane, Marie, Guilherme, Carime e Adriana por me receberem tão bem e por serem exemplo de amor a pesquisa.

Aos meus avós, tios e primos que mesmo sem compreender inteiramente a importância desta etapa em minha vida, sempre se orgulharam e me apoiaram.

Aos meus amigos, que compreenderam durante todos esses anos as minhas ausências, que sempre me acalentaram com palavras de incentivo e mesmo diante das dificuldades sempre incentivaram a seguir em frente.

Aos meus amigos e colegas da UPA/Sam, que sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando foi necessário deixar a chefia para me dedicar a este trabalho. Sem o apoio e as palavras de incentivo de vocês esta etapa, sem dúvidas, seria mais árdua. .

"Se Deus disse que eu posso, então eu posso.

Irei e não temerei mal algum"

*(Filipenses 4:13)*



## RESUMO

A incidência e a prevalência de sobrepeso e obesidade têm aumentado bastante nas últimas décadas, em quase todos os países. Este fenômeno não é explicado apenas por mudanças do estilo de vida, o que levou a considerar a influência de outros fatores, como os chamados desreguladores endócrinos, e mais especificamente os obesogênicos ambientais. O tributilestanho (TBT) é um produto químico tóxico utilizado para vários fins industriais, tais como desinfecção de águas de refrigeração industrial, preservação de madeira, agentes anti-incrustantes em tintas de barcos e, portanto, está amplamente presente, e em níveis consideráveis, no ecossistema marinho e na água doce. O cloreto de TBT já é conhecido por desempenhar atividade desreguladora endócrina e influencia, inclusive, a diferenciação de adipócitos *ex vivo* e *in vivo*; no entanto, os demais compostos da família dos organoestânicos são pouco estudados. Diante disso, a proposta deste trabalho foi investigar a ação do benzoato e do iodeto de TBT nos receptores nucleares mais relevantemente envolvidos na adipogênese, o PPAR $\gamma$ , o RXR $\alpha$  e o GR $\alpha$ , e também sobre a diferenciação de adipócitos em cultura, com a utilização de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 e células mesenquimais murinas C3H10T1/2. A influência do benzoato e iodeto de TBT sobre a atividade transcricional dos receptores nucleares estudados foi investigada por meio de ensaios de gene repórter em células HeLa. Para a investigação de seu efeito sobre a adipogênese, células 3T3-L1 foram induzidas a diferenciar-se em adipócitos com insulina e tratadas por 10 dias com veículo, rosiglitazona ou os DEs testados, e as células C3H10T1/2 foram induzidas a diferenciar-se em adipócitos com isometilbutilxantina, insulina e dexametasona e tratadas por 10 dias com veículo, rosiglitazona ou com os DEs testados. A diferenciação em adipócitos foi determinada pela coloração de lipídeos intracelular com óleo vermelho O e pela expressão do RNAm do gene que codifica a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária (*Fabpa*). Foi observado que o benzoato e iodeto de TBT induziram a atividade transcricional do PPAR $\gamma$  e do RXR $\alpha$  nas maiores concentrações testadas, de forma comparável ao organoestânico já descrito como agonista destes receptores, o cloreto de TBT. Não houve indução da atividade transcricional do GR $\alpha$  por nenhum dos TBTs testados. Consistentemente com sua atividade agonista parcial em PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$ , o benzoato e iodeto de TBT induziram aumento do acúmulo lipídico intracelular e da expressão de *Fabpa* nos pré-adipócitos 3T3-L1, nas menores concentrações testadas, em comparação com as células tratadas com veículo, porém menos acentuado em relação ao observado nas células tratadas com rosiglitazona. Nas células mesenquimais C3H10T1/2, foi observado aumento do acúmulo lipídico intracelular e da expressão de *Fabpa* em resposta às maiores concentrações testadas de benzoato e iodeto de TBT, também menos acentuado em comparação com o observado nas células tratadas com rosiglitazona. Em conjunto, os resultados sugerem que o benzoato e o iodeto de TBT apresentam potencial adipogênico fraco, por mecanismos dependentes de PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$ .

**Palavras-chaves:** Desregulador endócrino, adipogênese, obesogênicos ambientais, benzoato de tributilestanho, iodeto de tributilestanho.

## ABSTRACT

The incidence and prevalence of overweight and obesity have increased dramatically over the last decades, almost in every country. Because this is not solely explained by changes in lifestyle, it is considered that other factors, such as endocrine disruptors that act as environmental obesogens may play a role. Tributyltin (TBT) is a toxic chemical used for varied industrial purposes, such as disinfection of industrial refrigeration water, wood preservation, as anti-incrusting agents in boats and is therefore widely present in the marine ecosystem and sweet water at significant levels. TBT chloride is known for its endocrine disrupting activity and has been shown to influence adipocyte differentiation both *ex vivo* and *in vivo*. However, other organostannic compounds have been poorly studied. Therefore, the aim of this work was to investigate the activity of TBT benzoate and iodide on nuclear receptors which play a major role on adipocyte differentiation, PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  and GR $\alpha$ , and also on adipocyte differentiation in culture, by using murine 3T3-L1 preadipocytes and murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. The influence of TBT benzoate and iodide on the transcriptional activity of nuclear receptors was investigated with reporter gene assays in HeLa cells. For the investigation of their effect on adipogenesis, 3T3-L1 were induced to differentiate in adipocytes with insulin and treated for 10 days with vehicle, rosiglitazone and the endocrine disruptors. C3H10T1/2 cells were induced to differentiate with isomethylbutylxanthine, insulin and dexamethasone and treated for 10 days with vehicle, rosiglitazone and the endocrine disruptors. Adipocyte differentiation was assessed by oil red O staining of intracellular lipid and by the expression of adipocyte fatty acid binding protein mRNA (*Fabpa*). Both TBT benzoate and iodide induced the transcriptional activity of PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  at the higher concentrations tested, comparably to TBT chloride, the organostannic compound that was previously described as a partial PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  agonist. Neither compounds induced GR $\alpha$  transcriptional activity. In keeping with their partial agonist activity on PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$ , TBT benzoate and iodide increased intracellular lipid accumulation and *Fabpa* expression in 3T3-L1 preadipocytes, at the smaller concentrations tested, when compared to vehicle-treated cells, although to a lesser extent than in rosiglitazone-treated cells. In C3H10T1/2 mesenchymal cells, both endocrine disruptors induced an increase in intracellular lipid accumulation and *Fabpa* at the higher concentrations tested, also to a lesser extent than in rosiglitazone-treated cells. Taken together, these findings suggest that TBT benzoate and iodide have a weak adipogenic potential, possibly by PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$ -dependent mechanisms.

**Palavras-chaves:** Endocrine disruptor, adipogenesis, environmental obesogen, tributyltin benzoate, tributyltin iodide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Obesogênicos e suas fontes.....	27
Figura 2. Estrutura química do cloreto, benzoato e iodeto de TBT.....	28
Figura 3. Ilustração diagramática da regulação negativa da atividade da aromatase no citocromo P450.....	33
Figura 4. Interação dos organoestânicos com o PPAR $\gamma$ e RXR desencadeando a adipogênese.....	34
Figura 5. Estrutura primária e terciária dos receptores nucleares.....	36
Figura 6. Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio de viabilidade celular.....	43
Figura 7. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico induzido pelos DEs testados em células HeLa.....	54
Figura 8. O benzoato de TBT e o iodeto de TBT induzem a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ . .....	55
Figura 9. O benzoato de TBT e do iodeto de TBT induzem a atividade transcricional do RXR $\alpha$ .....	56
Figura 10. O benzoato de TBT e do iodeto de TBT não induzem a atividade transcricional do GR $\alpha$ .....	57
Figura 11. Efeito do benzoato de TBT sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1 em ensaio piloto.....	59
Figura 12. Efeito do iodeto de TBT sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1 em ensaio piloto.....	60
Figura 13. Efeito do benzoato de TBT sobre a adipogênese de células 3T3-L1.....	62

Figura 14. Efeito do iodeto de TBT sobre a adipogênese de células 3T3-L1.....	63
Figura 15. Efeito do benzoato de TBT sobre a adipogênese de células mesenquimais C3H10T1/2.....	65
Figura 16. Efeito do iodeto de TBT sobre a adipogênese de células mesenquimais C3H10T1/2.....	66
Figura 17. Expressão relativa de <i>Fabpa</i> em células 3T3-L1.....	67
Figura 18. Expressão relativa de <i>Fabpa</i> em células C3H10T1/2.....	68
Figura 19. Estrutura química do ácido 9-cis retinóico; cloreto, benzoato e iodeto de TBT.....	72
Figura 20. Mecanismo de ação do organoestânicos.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos reagentes utilizados neste estudo, com seus respectivos pesos moleculares e fabricantes.....	41
Tabela 2. Reagentes utilizados na reação da cadeia da polimerase e suas respectivas quantidades.....	51
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc: Adenosina 3',5'- monofostato cíclico

AR: Receptor de andrógenos

BFRs: Retardadores de chama bromados

BPA: Bisfenol A

C/EBP - Proteína de ligação ao acentuador CCAAT

cDNA: DNA complementar

CNPq: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

COUP-TF: Fator I de transcrição a montante do promotor de ovalbumina de galinha

CT: *Cycle threshold*/ ciclo limiar

DAX1: *Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*

DBD: Domínio de ligação ao DNA/ *DNA binding domain*

DDTs: Diclorodifeniltricloroetanos

DEHP: Di-2-etil-hexil ftalato

DEPC: Dietilpirocarbonato

DEs: Desreguladores endócrinos

DES: Dietilestilbestrol

DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsufóxido

DR1-TK-LUC: Construção contendo o gene repórter luciferase dirigido pelo promotor mínimo da quinase de timidina do vírus herpes simples e pela sequência DR-1.

EDTA: Etilenodiamino tetra-acético

EPA: Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency*)

EPM: Erro padrão da média

ER: Receptor de Estrógeno

ERR: Receptor relacionado ao estrógeno

FABP-A ou aP2: Proteína adipocitária ligadora de ácidos graxos

FXR: Receptor farnesóide X

GAL4: Fator de transcrição de leveduras

GAPDH: Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GCNF: Fator nuclear de células germinativas

GR: Receptor de glicocorticoide

GR $\alpha$ : Receptor alfa de glicocorticoides

GR $\beta$ : Receptor beta de glicocorticoides

GR $\gamma$ : Receptor gama de glicocorticoides

HBMC: Células de medula óssea (*human bone marrow cells*)

HNF4: Fator nuclear hepatocitário 4

HSP: Proteína de choque térmico

IMBX: Isometilbutilxantina

INCHEM: Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations

IPCS: Programa Internacional de Segurança Química

LBD: Domínio de ligação ao ligante

LRH1: Receptor homólogo 1 hepático

LUC: Luciferase

LXR: Receptor hepático X

MEHP: Mono-2-ftalato de etil-hexilo

Milli-Q: Água deionizada pelo sistema milli-Q fornecido pela *Millipore Corporation*

MR: Receptor mineralocorticóide

MSC: Células estaminais multipotentes mesodérmicas

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil-2-il]-2,5-difeniltretazólio]

NH<sub>2</sub>-T: Região amino-terminal

NP-4: 4-nonilfenol

NR4A: Receptor nuclear 4A

PBDES: Éteres difenil polibromados

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PCBs: Bifenilas policloradas

PPAR: Receptores ativados por proliferadores peroxissomais

PPAR $\alpha$ : Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais

PPAR $\beta/\delta$ : Receptor beta/delta ativado por proliferadores peroxissomais

PPAR $\gamma$ : Receptore gama ativado por proliferadores peroxissomais

PPRE: Elemento responsivo ao PPAR

PR: Receptor de progesterona

PRN: Receptor nuclear fotorreceptor célula específico

PVC: Cloreto de polivinila

PXR: Receptor pregnano X

RN: Receptor nuclear

RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro

ROR: Receptor órfão relacionado ao retinoóide

RT: Transcrição reversa

RT-PCRq: Transcrição reversa e amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa

RXR: Receptor retinoóide X

SF1: Fator esteroideogênico 1

SFB: Soro fetal bovino

SHP: Parceiro heterodímero curto

SNB: Soro neonatal bovino

TBE 1x: Tris-borato-EDTA

TBT: Tributilestanho



TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TF: *Tolylfluanid*;

TFZ: *Triflumizole*

TLL: Homólogo do gene sem cauda de *Drosophila*

TM: Temperatura de dissociação/ *melting temperature*

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TPT: Trifenilestanho

TR: Receptor do hormônio tireoidiano

TR: Receptor testicular

UnB: Universidade de Brasília

UV: Luz ultravioleta

WHO: World Health Organisation

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

$\mu\text{g}$ : Micrograma

$\mu\text{L}$ : Microlitro

mg: Miligrama

mL: Mililitro

M: Molar

nm: Nanômetro

nM: Nanomolar

IU: Unidade Internacional

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
1.1 OBESIDADE.....	21
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	24
<b>1.2.1 Desreguladores Endócrinos Como Obesogênicos</b> .....	26
1.3 TRIBUTILESTANHO.....	28
<b>1.3.1 Considerações Gerais</b> .....	28
<b>1.3.2 Tributilestanho Como Desregulador Endócrino</b> .....	32
1.4 RECEPTORES NUCLEARES.....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	40
2.1 GERAL.....	40
2.2 ESPECÍFICOS.....	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	41
3.1 REAGENTES.....	41
3.2 CULTURA DE CÉLULAS.....	41
3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	42
3.4 PLASMÍDEOS.....	44
3.5 TRANSFORMAÇÃO.....	44
3.6 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	44
3.7 ENSAIO DE GENE REPÓRTER.....	45
3.8 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS 3T3-L1 EM ADIPÓCITOS.....	46
3.9 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS C3H10T1/2 EM ADIPÓCITOS.....	48
3.10 COLORAÇÃO COM ÓLEO VERMELHO.....	48
3.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE CULTURA DE CÉLULAS.....	49
3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA.....	50
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>4 RESULTADOS</b> .....	53
4.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	53
4.2 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO INDUZEM A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO PPAR $\gamma$ EM CÉLULAS HELA.....	54
4.3 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO INDUZEM A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO RXR $\alpha$ EM CÉLULAS HELA.....	55

4.4 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO NÃO INDUZEM A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO GR $\alpha$ EM CÉLULAS HELA.....	57
4.5 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO APRESENTAM ATIVIDADE ADIPOGÊNICA FRACA EM PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1 .....	58
4.6 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO APRESENTAM ATIVIDADE ADIPOGÊNICA FRACA EM CÉLULAS MESENQUIMAIS C3H10T1/2. ....	64
4.7 EFEITO DO BENZOATO DE TRIBUTILESTANHO E DO IODETO DE TRIBUTILESTANHO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA ADIPOGÊNESE.....	67
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 OBESIDADE

A obesidade é um problema crescente de saúde definida como um distúrbio metabólico crônico ocasionado pela incapacidade do organismo em compensar adequadamente as escolhas da vida moderna, com ingestão excessiva de calorias e atividade física inadequada (NEEL, 1962; IOSSA et al., 1999; NEWBOLD et al., 2008). Entretanto, outros mecanismos parecem estar envolvidos do desenvolvimento a obesidade, incluindo disbiose intestinal (alterações qualitativas e quantitativas das comunidades microbianas que habitam o trato gastrointestinal), sono inadequado, infecções virais e aspectos ambientais, que tem sido implicados no aumento da massa gordurosa (TURNBAUGH et al., 2009; CAPPuccio et al., 2008; VASILAKOPOULOU e LE ROUX, 2007; BAILLIE-HAMILTON, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, desde 1980 a prevalência da obesidade dobrou e, em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos, que tinham 18 anos ou mais, estavam acima do peso e destes mais de 600 milhões eram obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). No Brasil, duas pesquisas realizadas com dados de peso e estatura demonstraram que a prevalência de sobrepeso e obesidade aumentou de 43% para 48,1% e de 11% para 15 %, respectivamente (VIGITEL 2006 e 2010). Já em 2013, quando se observa a população acima de 18 anos de idade, a prevalência da obesidade aumentou para 17,5% e a taxa do sobrepeso para 50,8% (ABESO, 2015).

Algumas das implicações clínicas relevantes da obesidade, como as comorbidades a elas relacionadas, a fragilidade somática, podem afetar seriamente o bem estar, a independência e a qualidade de vida da população (GARCÍA et al, 2012). Entre as comorbidades relacionadas à obesidade, destacam-se o diabetes tipo 2 (DM2), hiperinsulinemia, resistência insulínica, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral, doenças hepáticas e renais, câncer, dentre outras (WANG e LOBSTEIN, 2006; GESTA, TSENG e KAHN, 2007).

O DM2 é uma relevante doença relacionada à obesidade (KAHN, HULL e UTZSCHNEIDER, 2006). Em 2012 o diabetes afetava próximo de 371 milhões de pessoas e a previsão é que em 2030 esse número atinja 552 milhões de pessoas (FEDERAÇÃO

INTERNACIONAL DE DIABETES, 2012). No Brasil a prevalência também é bastante preocupante, já que em 2014, cerca de 11,6 milhões de pessoas já eram diabéticos (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2015).

O tecido adiposo tem papel fundamental na manutenção da homeostase energética (KAHN e FLIER, 2000) e é composto por adipócitos que se encontram circundados por fibroblastos, pré-adipócitos e ainda células endoteliais, do sistema imune e nervosas (CINTI, 2005). Outras funções também são desempenhadas pelo tecido adiposo, como atuar como órgão endócrino por meio da secreção de diversos fatores, como as adipocinas, que regulam a sensibilidade insulínica, a saciedade, o gasto energético e a inflamação (KAHN e FLIER, 2000). As principais adipocinas, implicadas na regulação da homeostase energética e no desenvolvimento de obesidade e diabetes são a adiponectina e a leptina, assim como os fatores adicionais, como resistina, TNF $\alpha$  e interleucina-6 (KAHN e FLIER, 2000; BERGMAN e ADER, 2000).

Evolutivamente, a obesidade poderia ser explicada como uma proteção contra a escassez de alimentos, e assim alguns genes poderiam promover resistência insulínica periférica e o armazenamento de gordura. Genes cuja desregulação pode estar associada à obesidade são aqueles que codificam a leptina e os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR). Os produtos destes genes também estão relacionados à regulação da ingestão de alimentos, à eficiência metabólica e ao armazenamento energético (AUWRX, 1999).

O estado resultante da ingestão excessiva de nutrientes e o baixo gasto energético pode desencadear respostas em vários tipos celulares tais como os adipócitos, hepatócitos, miócitos, células endoteliais e células que compõe o sistema imunológico, originando, desta forma, a disfunção metabólica (HOTAMISLIGIL, 2006; LOWELL e SHULMAN, 2005). Cada uma destas respostas é capaz de ativar as vias de sinalização que promovem a inflamação, parecendo esta ser a resposta final comum na obesidade humana (WISSE, KIM e SCHUWARTZ, 2007). Muitos fatores pró-inflamatórios encontram-se elevados na obesidade e no diabetes, principalmente causados pelo estresse oxidativo, advindo do excesso de ácidos graxos extracelulares e de glicose, ocasionando a disfunção de células endoteliais, fator relevante para o desenvolvimento e complicações da síndrome metabólica (BONDIA-PONS, RYAN e MARTINEZ, 2012).

Atualmente já se sabe que o excesso do consumo de calorias associado ao sedentarismo, não explicam, isoladamente a atual epidemia mundial da síndrome metabólica,

advinda da obesidade (THAYER et al, 2012). Novas hipóteses estão surgindo a fim de explicar a deterioração na saúde metabólica humana. Desta forma, a atenção voltou-se para se identificar os fatores adicionais que podem alterar o metabolismo energético (CASAL-CASAS e DESVERGNE, 2011). Neste contexto, encontram-se relacionados o estresse, alterações imunológicas, déficits de micronutrientes, microbiota intestinal e diversas substâncias químicas ambientais (HANY et al., 1999; LILIENTHAL et al., 2006).

Algumas modificações genéticas podem estar relacionadas com a predisposição à obesidade, entretanto, o genoma humano não apresentou alterações tão significativas ao longo dos últimos anos. Muito diferente do que se pensa, ao se estabelecer uma correlação entre o aumento da taxa de obesidade e a acumulação de produtos químicos sintéticos, observa-se que pode não se tratar de um evento aleatório. Esta mudança considerável levou ao surgimento da hipótese de que alguns poluentes ambientais possam interferir em processos fisiológicos, atuando como desreguladores endócrinos, beneficiando vias de sinalização hormonal ativadas por ligantes lipofílicos, sendo capazes de interferir em diversos aspectos do metabolismo e balanço energético (BAILLIE-HAMILTON, 2002; NILSSON, 2000; WARING e HARRIS, 2005).

O processo de adipogênese se dá numa série de passos, tendo início a partir de células progenitoras pluripotentes das quais se formarão as células estaminais multipotentes mesodérmicas (MSC). Estas, por sua vez, comprometem-se para a formação de células onipotentes pré-adipocíticas e, caso sejam estimuladas apropriadamente, podem chegar a adipócitos maduros (GESTA, TSENG e KAHN, 2007; PEIRCE, CAROBBIO e VIDAL-PUIG, 2014).

É possível a reprodução do processo adipogênico *ex vivo*, permitindo um grande avanço na compreensão dos mecanismos moleculares que estão envolvidos na transição de fibroblastos não diferenciados até a fase de adipócito maduro (GREGOIRE, SMAS e SUL, 1998). O estudo pode ser realizado com tipos celulares diferentes: os fibroblastos que possuem a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares, chamadas de células multipotentes, e as células que já estão comprometidas com a linhagem adipocitária (NTAMBI e YOUNG-CHEUL, 2000). Fisiologicamente, este processo se dá sob controle hormonal e, assim sendo, pode ser suscetível à interferência de desreguladores endócrinos, podendo este ser um modelo aplicado para os estudos *in vitro e ex vivo* que visam investigar a associação de fatores ambientais com a adipogênese e, assim, com o desenvolvimento de excesso de tecido adiposo observado na obesidade (TANG e LANE, 2012).

## 1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os desreguladores endócrinos estão entre as influências ambientais relacionadas ao desenvolvimento da obesidade. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency*, EPA), são definidos como “agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturalmente presentes no corpo e que são responsáveis pela homeostase, reprodução e desenvolvimento” (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) em conjunto com alguns países adotam como definição de desreguladores endócrinos uma substância ou composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e possui, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações (CEC, 1999).

Os desreguladores endócrinos podem ser de origem natural ou sintética e são agrupados em (i) substâncias sintéticas utilizadas na agricultura (pesticidas);(ii) substâncias sintéticas utilizadas na indústria (dioxinas, compostos orgânicos de estanho, bisfenol, etc); (iii) substâncias naturais (fitoestrogênios e estrogênios naturais); ou ainda (iv) compostos farmacêuticos (17  $\alpha$ -etinilestradiol) (BILA E DEZOTTI, 2007).

A exposição aos desreguladores endócrinos vem de diversas fontes e varia amplamente em todo mundo. Áreas industrializadas são comumente caracterizadas por contaminação por inúmeros produtos químicos industriais, que podem contaminar o solo e águas subterrâneas, podendo ser introduzidas na cadeia alimentar, por meio da ingestão de água e alimentos contaminados, contato transdérmico ou transplacentário, inalação de ar contaminado ou contato com o solo (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; DE COSTER E VAN LAREBEKE, 2012). Pessoas que trabalham com pesticidas, fungicidas e produtos químicos industriais apresentam risco particularmente elevado de exposição e, assim, de desenvolvimento de uma anormalidade endócrina (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Muitos desreguladores endócrinos são apolares, assim, altas concentrações podem ser detectadas em carnes, peixes, ovos e derivados do leite, havendo relatos, inclusive, do aumento das concentrações de hormônios sexuais (17  $\beta$ -estradiol, estrona, testosterona e progesterona) nestes alimentos. A contaminação também poder ser advinda do fato de que hormônios são aplicados na criação de animais e consumidos na alimentação humana (HARTMANN, LACORN E STEINHART, 1998).



Os desreguladores endócrinos, utilizados na indústria são produtos químicos como solventes ou lubrificantes e seus subprodutos (bifenilas policloradas (PCB) e dioxinas), plásticos, plastificantes como o bisfenol A (BPA) e ftalatos, pesticidas como os diclorodifeniltricloroetanos (DDT), fungicidas (vinclozonila), herbicidas (atrazina) e antibacterianos (triclosan). Existe uma relação direta entre a poluição por PCB e dioxinas e a manifestação em glândula endócrina, imunológica ou ainda disfunção metabólica nos seres humanos e em animais selvagens (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Alguns desreguladores endócrinos apresentam meia-vida longa, sendo esta característica um benefício para a utilização industrial, no entanto, torna-se consideravelmente prejudicial para a vida selvagem e dos seres humanos (CALAFAT E NEEDHAM, 2007). O fato de não se deteriorarem com facilidade, implicam na não metabolização; além disso, podem ser metabolizados em compostos mais tóxicos que a molécula de origem. Mesmo substâncias que foram proibidas há algum tempo, permanecem em concentrações elevadas no meio ambiente, podendo ainda ser detectadas por muito tempo (PORTE et al., 2006).

A ação dos desreguladores, de acordo com a dose de exposição, nem sempre é linear, dose-dependente ou tradicional. São frequentes as curvas dose-resposta ou concentração-efeito não tradicionais, ou seja, as curvas em forma de U ou U invertido. Assim, qualquer intensidade de exposição pode levar ao aparecimento de anomalias metabólicas ou endócrinas, principalmente se a exposição se der durante um período crítico do desenvolvimento, e doses baixas podem se tornar mais potentes do que doses mais elevadas (VOM SAAL et al., 2007).

Os desreguladores endócrinos (DE) podem promover fenótipos anormais ou doenças por diferentes mecanismos de ação. Podendo modificar os fatores que regulam a expressão de genes, como a metilação do DNA e a acetilação de histonas. A maioria dessas substâncias desreguladoras não altera a sequência do DNA, ou seja, não promove mutações genéticas (SKINNER, MANIKKAM E GUERRERO-BOSAGNA, 2010; HANSON E GLUCKMAN, 2008).

Vários receptores nucleares (RN) podem ser alvos dos desreguladores endócrinos, que se ligam e ativam um ou mais receptores, e, desta forma, efeitos aditivos ou sinérgicos podem ser observados (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Os receptores de estrogênio (ER) são responsáveis pela regulação de muitos aspectos do metabolismo, nos quais estão inclusos o transporte de glicose, metabolismo lipídico e atividade mitocondrial. É ainda provável que

os ER modulem redes neuronais que controlam a ingestão de alimentos e a fisiologia do tecido adiposo (CHEN E RUSSO, 2009).

Além dos ER, os desreguladores endócrinos podem modular outros receptores nucleares como o receptor do hormônio tireoidiano (TR) e o receptor de glicocorticoide (GR). O BPA age como um antagonista de TR (ZOELLER, BANSAL E PARRIS, 2005) ou como agonista de ER (SCHECTER et al., 2010). Os retardadores de chama bromados (BFR) também agem interrompendo a via de sinalização do TR, enquanto os éteres difenil polibromados (PBDE), além de atuarem em TR alterando a ação da deiodinase, podem também alterar a função do GR (LEGLER, 2008). Já os organoestânicos podem agir em GR inibindo a atividade da 11-beta-hidroxiesteroide-desidrogenase tipo 1, potencializando a ação dos glicocorticoides *in vivo* (SARGIS et al., 2010).

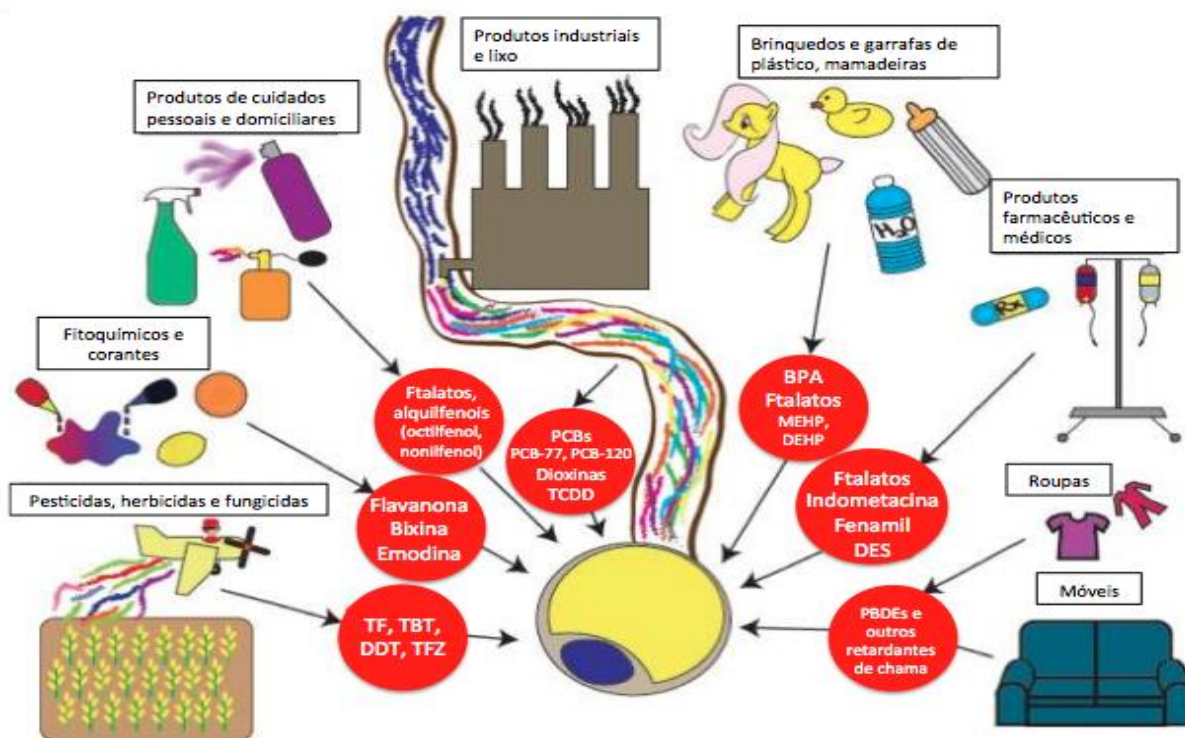
Os PPARs são também membros da superfamília de receptores nucleares com importante papel na regulação da adipogênese. Existem evidências que os PPAR, são alvos moleculares de diversos desreguladores endócrinos, entre eles o cloreto de TBT e o TPT (trifenilestanho), compostos largamente utilizados na agricultura e indústria. No estudo realizado por Kanayama e colaboradores (2005) ficou elucidado que tanto o TBT quanto o TPT agem como agonistas de PPAR $\gamma$  e RXR (Receptor retinoide X), com afinidade comparável à dos ligantes endógenos já identificados. A exposição de camundongos C57Bl/6J aos desreguladores endócrinos 4-nonilfenol (NP-4) (HAO et al., 2012 A) e ao mono-2-ftalato de etil-hexilo (MEHP) (HAO et al., 2012 B) resultou em aumento da expressão de genes alvo do PPAR $\gamma$ , entre eles a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária ou proteína do adipócito 2 (aP2) e lipoproteína lipase.

Em humanos também existem estudos que demonstram que a presença dos ftalatos, produtos químicos orgânicos presentes no plástico como cloreto de polivinila (PVC), na urina ou ainda a presença dos seus metabólitos, estão correlacionados com uma maior circunferência da cintura e elevação do índice de massa corporal em adultos do sexo masculino (STAHLHUT et al., 2007). Além disso, que alguns destes ftalatos agem ativando o PPAR $\gamma$  em células 3T3-L1 (HURST E WAXMAN, 2003).

### 1.2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS COMO OBESOGÊNICOS

A teoria da desregulação endócrina, proposta em 1922, postula que produtos químicos exógenos atuam interferindo na ação de eixos hormonais por serem capazes de modularem a

homeostase endógena. Desde que essa teoria foi proposta, diversos DE foram identificados, incluindo produtos industriais e resíduos, retardadores de chama, fitoquímicos, produtos farmacêuticos, pesticidas, aditivos alimentares e produtos de higiene pessoal (Figura 1). As vias de exposição também são as mais variáveis, incluindo a ingestão, inalação, injeção, transdérmica e até transplacentária (COLBORN e CLEMENTE, 1992).



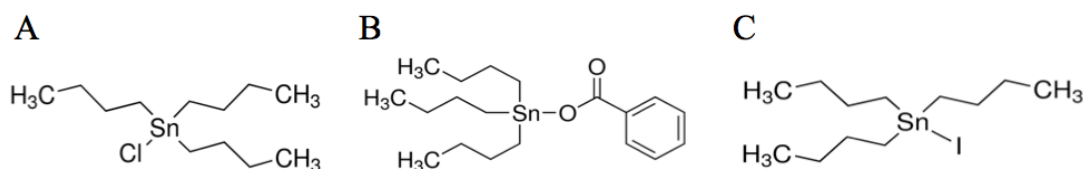
**Figura 1:** Obesogênicos e suas fontes. BPA, bisfenol A; DDT, diclorodifeniltricloroetano; DEHP, di-2-etil-hexil ftalato; DES, dietilestilbestrol; MEHP, mono-etil-hexil ftalato; 4-NP, 4-nonilfenol; PBDEs, éteres difenil-polibromados; PCB, bifenilos policlorados; TF, tolylfluanid; TBT, tributilestanho; TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; TFZ, triflumizole. Adaptado de Regnier e Sargis, 2014.

Paula Baillie-Hamilton (2002) foi a primeira a propor que os DE poderiam alterar o metabolismo energético, contribuindo assim para o desenvolvimento de doenças metabólicas. Esta proposição se deu pela observação do aumento das taxas de sobrepeso e obesidade e o aumento da produção de substâncias químicas sintéticas nos Estados Unidos. Em 2006, Blumberg e Grün desenvolveram a “hipótese obesogênica ambiental”, segundo a qual elucidava que os efeitos do ganho de peso e a epidemia da obesidade estariam relacionados ao uso de determinados produtos químicos denominados “obesogênicos”. Essa hipótese foi fundamentada em estudos em que foram testados diversos desreguladores endócrinos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, e também em dados de estudos epidemiológicos.

## 1.3 TRIBUTILESTANHO

### 1.3.1 Considerações Gerais

Os compostos pertencentes à família dos organoestânicos possuem como principal característica a presença de uma ou mais ligações covalentes que se dá entre os átomos de carbono e estanho (Sn-C), conferindo a eles a fórmula geral  $R_nSnX_{4-n}$ , onde o R é um grupo alquila ou arila, X é uma espécie aniônica (como cloreto, óxido, hidróxido ou outros grupos funcionais) com n que pode variar de 1 a 4 (HOCH, 2001). A Figura 2 apresenta a estrutura química de 3 destes compostos, o cloreto, o benzoato e o iodeto de TBT.



**Figura 2.** Estrutura química cloreto (A), benzoato (B) e iodeto de TBT (C). Fonte: Pubchem.

O processo de degradação da molécula do TBT se dá progressivamente, pela quebra da ligação estabelecida entre o estanho e o carbono, dando origem a novas moléculas como o dibutilestanho, monobutilestanho e estanho inorgânico. Os fatores responsáveis pelo processo de degradação são a radiação (luz visível, ultravioleta e gama), processos biológicos e processos químicos (RADKE et al., 2008).

A meia vida dos TBT, tanto em águas doces como salgadas, geralmente esta é de seis dias a até algumas semanas. No entanto, em sedimentos e em condições anaeróbicas, a persistência é estimada entre dois anos a várias décadas (RÜDEL, 2003). Em algumas localidades os TBTs estão em elevada concentração e a degradação biológica é inibida pela elevada toxicidade para estes organismos (CEULEMANS, SLAETS e ADAMS, 1998).

Edward Flankland foi quem primeiro sintetizou em laboratório uma molécula organoestânica, produzindo o diiodeto de diestilestanho ( $C_2H_5)_2SnI_2$ ) no ano de 1849. No entanto, a aplicação industrial ocorreu somente no século XX, primeiramente em 1936 quando o composto dilaurato de dibutilestanho foi utilizado a fim de estabilizar o PVC contra

a ação da luz e do calor e como catalisador de reações químicas (MULLER, RENBERG e RIPPEN, 1989).

Os compostos organoestânicos foram utilizados também como estabilizadores em borrachas, nylon, hidrocarbonetos clorados, peróxido de hidrogênio e óleos lubrificantes (PIVER, 1973), na preservação da madeira, como agente fungicida em produtos têxteis e em torres de resfriamento e sistema de água de refrigeração em sistemas de águas industriais, sistemas de fábricas de cerveja e papel (HOCH, 2001). A partir da década de 1960, a atividade biocida dos compostos organoestânicos começou a ser explorada, sendo estes compostos utilizados como microbicidas, fungicidas, molusquicidas e anti-incrustantes (OLIVEIRA e SANTELLI, 2010).

O registro das propriedades biocidas do tributilestanho foi feito na segunda metade da década de 1950 e este registro foi responsável por direcionar as futuras aplicações deste composto (YEBRA, KILL e DAM-JOHANSEN, 2004). A primeira aplicação dos compostos de tributilestanho como biocidas ocorreu no continente africano, como molusquicidas contra caramujos de água doce, vetores da esquistossomose (WHO, 1990). A partir da década de 1960, o tributilestanho foi introduzido como princípio ativo de tintas anti-incrustantes em embarcações melhorando a velocidade destas, e foi usado ainda em cais e gaiolas de peixes (WHO, 1990) para solucionar o problema da bioincrustação. Esta foi definida por Kirschner e Brennan (2012) como o recobrimento de superfícies submersas no oceano por moléculas orgânicas e por organismos marinhos. O uso do TBT como agente incrustante apresentou impacto econômico relevante.

Em 2001, cerca de 70-80% dos navios, o que corresponde entre 56.000-64.000 navios da frota global, possuíam no seu sistema anti-incrustante tintas à base de TBT, o que os tornou fontes relevantes de poluição do ambiente marinho (CHAMP, 2001). A produção mundial dos organoestânicos foi mensurada em cerca de 40.000 t / ano em 1985 (ALZIEU, 1998), e em 1996 essa produção já alcançava 50.000 t / ano (OCDE, 2001). A quantificação dos TBT na água do mar requer técnicas altamente sensíveis, já que a concentração dos mesmos se dá em ng/L

A utilização industrial dos compostos organoestânicos resultou em toxicidade considerável, fator este que leva a uma reavaliação da aplicação dos TBT, que mesmo apresentando eficácia comprovada como agente anti-incrustante possuem alta persistência em organismos vivos e alta capacidade de transferência ao longo das cadeias tróficas (CHAMP, 2001). Grandes esforços tem sido empreendidos em resposta aos impactos indesejáveis dos

TBTs, assim requisitos legais foram reforçados a fim de proteger o meio ambiente e os seres que nele habitam. Em 1980, a utilização do TBT como substância anti-incrustante, é proibida em barcos com até 25 metros de comprimentos em muitos países, e isto se traduziu posteriormente em um aumento na produção de ostras (KONSTANTINOU E ALBANIS, 2004).

O primeiro país que adotou ações regulatórias quanto ao uso de tintas anti-incrustantes que tinha como base compostos organoestânicos foi a França em 1982, seguida pela Inglaterra em 1985 (ALZIEU et al., 1986) Estas ações foram fundamentadas na avaliação que demonstrou o impacto do TBT sobre ostras da espécie *Crassostrea gigas*, comercializadas na costa atlântica da França. Foi evidenciado que houve uma redução considerável destes animais e ainda, má formação das conchas, afetando de 80 a 100% da população e acarretando uma perda financeira da ostreicultura na região de aproximadamente 147 milhões de dólares (ALZIEU, 2000).

A maioria dos países europeus após 1988 adotaram também ações regulamentadoras comparáveis às implementadas na França. Com os resultados obtidos em estudos sobre os impactos ecotoxicológicos do TBT, a IMO (Organização Marítima Internacional) adota em 1999 a Resolução A.895 recomendando aos países membros que adotassem medidas restringindo o uso de TBT em tintas anti-incrustantes. A IMO, na convenção em 2001, proibiu a aplicação ou reaplicação de tintas que tivessem como base o TBT em navios até 1º de Janeiro de 2003, e a proibição total da presença dos sistemas anti-incrustantes a base de TBT nos cascos de navios até Janeiro de 2008 (CD Commission Directive 2002/62/EC of 9 July 2002, 2002; IMO- International Marine Organisation, 2001). O Brasil assinou a convenção em 13 de novembro de 2002 (NORMAM-23/ DPC, 2007).

Apesar das metas propostas pela IMO serem ditas urgentes a adesão pelas partes foi lenta. Oficialmente a convenção entrou em vigor em 17 de setembro de 2008 e 63 países tornaram-se parte da mesma, representando 81% da frota mercantil (IMO, 2012). No Brasil, foi aprovada a convenção através do Decreto Legislativo nº 797/2010, que começou a vigorar apenas em 20/05/2012.

A Portaria 76 da Diretoria de Portos e Costas, da Marinha do Brasil, era até então o que vigorava no País em novembro de 2007, aprovando as Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações (NORMAM-23/DPC). O objetivo destas normas é estabelecer procedimentos referentes ao controle do uso de tintas ou outros sistemas com atividade anti-incrustantes prejudiciais ao meio ambiente

marinho ou ainda à saúde humana. Estão inclusos tanto embarcações brasileiras que utilizam o sistema anti-incrustante como embarcações que atraquem em nossos portos com AIT (Atestado de Inscrição Temporária).

Entretanto, a convenção estabelecida pela IMO não abrange navios de guerra, embarcações sem fins comerciais, estruturas utilizadas na agricultura e todas as demais aplicabilidades do TBT como biocida. Desta forma, o TBT permanece presente no ambiente (FITRIDGE et al., 2012).

Em trabalhos realizados posteriores à proibição do uso do TBT como substância anti-incrustante, há relatos da redução das concentrações de tributilestanho em águas, sedimento e biota e as concentrações marinhas raramente excedem  $100 \text{ ng l}^{-1}$  (BHOSLE et al., 2004), refletindo melhora parcial após as medidas anteriormente impostas (EU-SCOOP, 2006). Ainda assim, a exposição aos TBTs ainda se dá por meio de plastificantes, conservantes de madeira e pesticidas agrícolas. Os compostos organoestânicos são lipofílicos, detectáveis em alimentos e em muitos tecidos humanos e persistentes (NIELSEN E STRAND, 2002).

Os possíveis efeitos nocivos da exposição humana ao TBT é motivo crescente de preocupação pública. As principais vias de exposição se dão pelo consumo de qualquer água contaminada ou bebidas e alimentos que possam vir da pesca marinha (AZENHA et al., 2004; EU-SCOOP, 2006).

Foram coletadas e analisadas amostras de frutos do mar advindas de supermercados de cidades asiáticas, norte-americanas e europeias e identificaram cerca de  $185 \text{ ng/g}$  de peso seco do cloreto de TBT. A absorção através de alimentos é uma fonte importante desta substância, já que observou-se ainda que organismos de níveis tróficos superiores apresentavam concentração mais elevada de organoestânicos quando comparados aos demais (ROULEAU, GOBEIL E TJALVE, 1999).

O espectro de efeitos adversos sistêmicos crônicos que podem ser desencadeados pela exposição aos TBT foram sugeridos por diversos estudos em modelos animais e vão desde possível atividade carcinogênica até efeitos neurotóxicos, atividade enzimática, teratogenia, potencial cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, reprodutivos, desenvolvimento do fígado e rim, e efeitos endócrinos (EU-SCOOP, 2006)

Ainda que a quantidade de informação disponível sobre a toxicidade aguda do TBT seja extensa, quando se trata da toxicidade crônica poucos dados estão disponíveis. Em estudos utilizando o mosquito *Chironomus riparius* a fim de investigar os efeitos tóxicos do TBT, observou-se concentração relevante do composto no desenvolvimento de mais de 11

gerações a partir da exposição da geração parental. Observou-se ainda que o peso dos machos foi maior em todas as gerações quando comparados com o controle (VOGT et al., 2007)

Segundo a INCHEM (*Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations*) o benzoato de tributilestanho, que apresenta como fórmula química  $C_{19}H_{132}O_2Sn$ , é utilizado como anti-incrustante e microbicida. É uma substância irritante para pele e olhos, além de atuar inibindo a fosforilação oxidativa e a função mitocondrial (INCHEM, 1999).

O iodeto de tributilestanho apresenta como fórmula química  $C_{12}H_{27}ISn$ , é utilizado como intermediário na síntese orgânica e é considerado extremamente tóxico para a vida marinha (LOOKCHEM, 2015). Grün e colaboradores (2006), em estudo realizado com compostos organoestânicos, demonstraram que o iodeto de TBT é capaz de ativar o receptor  $RXR\alpha$ , mas o mecanismo adipogênico não foi elucidado.

### 1.3.2 Tributilestanho Como Desregulador Endócrino

Todo o esforço mundial envolvido na tentativa da proibição da utilização dos organoestânicos foi fundamentado nos resultados de diversos estudos que demonstraram que tanto tributilestanho (TBT) quanto o trifenilestanho (TPhT) são capazes de desencadear alterações no sistema endócrino de organismos marinhos em concentrações a partir 1 ng/L (RAINBOW, 1995).

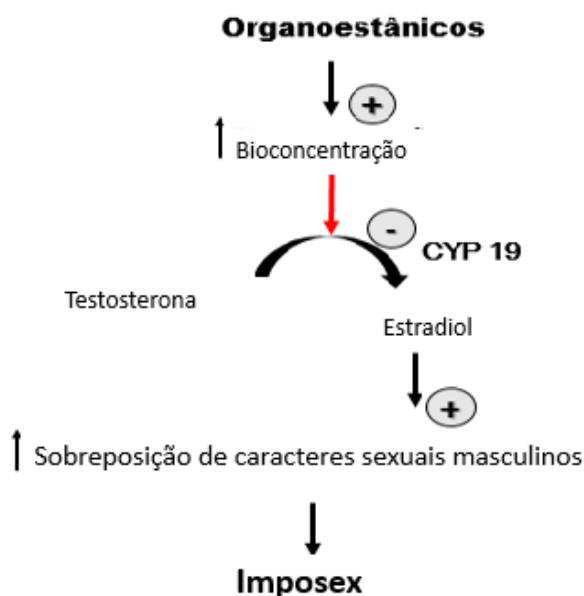
Os primeiros indícios de que a presença dos TBTs estavam relacionados ao declínio do número de moluscos marinhos datam da década de 1970, quando foi relatado o fenômeno imposex em *Nucella lapillus* no Reino Unido (ALZIEU, 2000). Este fenômeno foi descrito quando se observou a sobreposição de características masculinas, como o aparecimento de pênis, crescimento e proliferação de vasos deferentes, em gastrópodes fêmeas normais (ALZIEU, 2000; LEUNG et al., 2006). A concentração do TBT presente no meio é que determina a intensidade da virilização em fêmeas, podendo desencadear até a esterilidade animal. As implicações apresentam resultados diretos na função reprodutiva, através do bloqueio da abertura do canal do oviduto, pelo desenvolvimento do canal deferente, impossibilitando que os ovos sejam postos ou até mesmo a espermatogênese ovariana, ocasionando a redução da população e até possivelmente a extinção da espécie em locais onde a contaminação por estes compostos é extensa (LEUNG et al., 2006).

Outros relatos de exposição aos compostos organoestânicos demonstraram que os organismos marinhos apresentaram taxas reduzidas de crescimento e de fotossíntese, assim



como houve morte celular correlacionada com o tipo do composto organoestânico e a suas concentrações. Corais adultos de *A. formosa* foram expostos a sedimentos concentrados com 160 mg/kg de tributilestanho e foi observado que houve um índice de mortalidade significativo (SMITH et al., 2003).

Ainda que já se tenha estabelecido uma relação do aparecimento do imposex e a exposição aos organoestânicos, o mecanismo pelo qual esse fenômeno se dá não está bem elucidado (LYSSIMACHOU, BACHMANN e PORTE, 2008). Algumas hipóteses sugerem que haja uma inibição específica da enzima aromatase da citocromo P450 pelos organoestânicos (NAKANISHI, 2008), uma vez que esta enzima é responsável pela conversão da testosterona em 17 $\beta$ -estradiol, implicando na elevação da concentração de testosterona nas fêmeas, como mostrado na Figura 3 (LEUNG et al., 2006). É possível, no entanto, que este mecanismo seja um pouco mais complexo (GRACELI et al., 2013).



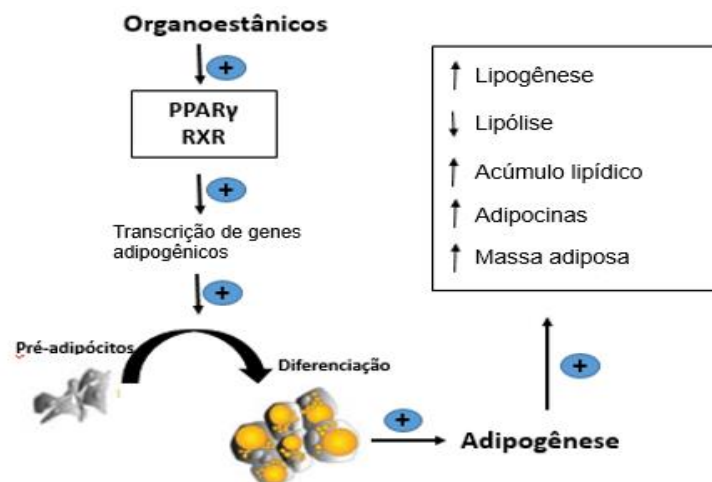
**Figura 3.** Ilustração diagramática da regulação negativa da atividade da aromatase no citocromo P450, na CYP19, mediada por organoestânicos, induzindo o imposex. A seta vermelha indica o efeito inibitório e a seta preta indica o efeito estimulatório. Adaptado de LEUNG et al., 2006

O cloreto de TBT pode desencadear efeitos de desregulação endócrina em mamíferos, pela transferência que se dá nas cadeias alimentares marinhas, por meio do consumo de frutos do mar contaminados que acumulam-se no tecido adiposo (NORMAM-23/DPC). O cloreto de TBT foi o composto obesogênico que primeiro teve seu mecanismo de ação, pelo menos em parte, elucidado, na medida em que foi caracterizado como ativador do heterodímero RXR/PPAR $\gamma$ , e acredita-se que promova a obesidade aumentando o número de adipócitos,

alterando os padrões de armazenamento de gordura nos mesmos, modificando o gasto energético em repouso ou ainda alterando os mecanismos de controle do apetite e da saciedade (KANAYAMA et al., 2005). Alguns destes efeitos do TBT estão esquematizados na Figura 4.

Grün e colaboradores (2006) expuseram camundongos ainda na vida intra-uterina ao TBT e demonstraram que estes animais, no período neonatal, apresentaram acúmulo excessivo de lipídeos nos tecido adiposo, fígado e testículos. Na vida adulta apresentaram aumento da massa adiposa no epidídimo (visceral). Estes dados sugerem que o TBT altera a homeostase metabólica, o que é consistente com os dados de outros estudos que indicam que este composto induz a diferenciação de adipócitos em cultura e o aumento da massa adiposa *in vivo* (KIRCHNER et al., 2010).

Quando pré-adipócitos murinos 3T3-L1 foram expostos a concentrações do cloreto de TBT entre 10 e 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas, observou-se aumento da diferenciação de adipócitos, do acúmulo de lipídeos, e expressão de RNAm de aP2 (em torno de 5 vezes). Ressalta ainda, que a concentração sérica de TBT encontrada em seres humanos, que é em média 27 nM, já é suficiente para ativar o heterodímero RXR/PPAR $\gamma$  (GRÜN et al., 2006).



**Figura 4:** Interação dos organoestânicos com o PPAR $\gamma$  e RXR desencadeando a adipogênese. PPAR $\gamma$ : Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais. RXR: Receptor de retinóide X.

Carfí e colaboradores (2008) demonstraram que quando se expõem as células de medula óssea (*human bone marrow cells*, HBMC) ao cloreto de TBT por 14 dias, a expressão do RNAm da aP2 aumenta de modo concentração dependente. Ainda, observa-se um aumento das gotículas de lipídeos nos adipócitos e elevação dos níveis de RNAm do PPAR $\gamma$ , da

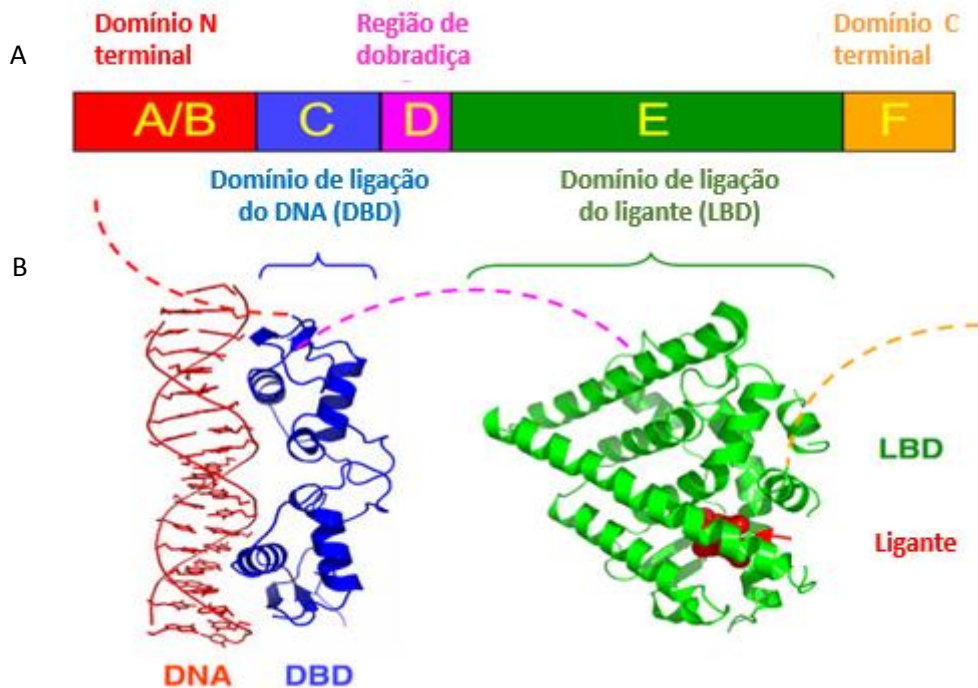
mesma forma há uma redução do RNAm do RXR $\alpha$  dependente da dose e do tempo de exposição.

Embora o TBT seja descrito como agonista de PPAR $\gamma$ , não está claro se seus efeitos sobre a adipogênese são dependentes de sua atividade no receptor. Um estudo mostrou que apesar de se administrar um antagonista seletivo de PPAR $\gamma$  numa cultura de células 3T3-L1 tratada com TBT, o processo adipogênico não foi bloqueado, sugerindo que o TBT induz adipogênese por diferentes vias em baixas doses (LI, YCAZA E BLUMBERG, 2011). A adipogênese em células estromais mesenquimais da medula óssea, desencadeada por tratamento com TBT, também ocorre mesmo quando a sinalização do PPAR $\gamma$  é inibida, assim o efeito adipogênico pode não se dar, nesta fase, por meio do heterodímero RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  (YANIK et al., 2011; BIEMANN et al., 2014).

#### 1.4 RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares (RN) constituem uma superfamília dos receptores protéicos intracelulares que se relacionam estruturalmente e em sequência, introduzidos na classe dos fatores transcricionais. Os RN estão envolvidos na regulação de processos biológicos importantes como crescimento, desenvolvimento e homeostase (ROBINSON, ESCRIVA E LAUDET, 2003).

Já foram identificados 48 receptores nucleares em humanos e geralmente possuem a mesma estrutura modular que apresenta domínios funcionais distintos, sendo principalmente divididos em: (i) região amino-terminal (NH<sub>2</sub>-t) ou domínio A/B, (ii) região de ligação ao DNA ou região carboxi-terminal (DBD) ou ainda região C, (iii) região de ligação ao ligante (LBD) ou região E, (iv) a região que faz a ligação entre os domínios DBD e LBD denominada de região de dobradiça (*hinge*) ou região D, e em alguns receptores nucleares o domínio F18 ou carboxiterminal, cuja função ainda está sob investigação (ARANDA E PASCUAL, 2001). A estrutura primária e terciária dos RN está apresentada na Figura 5.



**Figura 5.** Estrutura primária e terciária dos receptores nucleares. **A:** Estrutura comum aos receptores nucleares, com representação dos domínios funcionais. Estrutura primária, domínio amino-terminal (A/B), domínio de ligação ao DNA (DBD), domínio D onde se encontra a região da dobradiça, região carboxi-terminal onde o ligante se liga (LBD) e o domínio F. **b:** Estrutura tridimensional da organização dos RN. Adaptado de: <http://www.nptel.ac.in/courses/102103012/module5/lec2/3.html>

Baseado nas funções fisiológicas exercidas pelos receptores nucleares e os seus ligantes, fez-se uma divisão em 3 classes. A primeira classe é composta por receptores de alta afinidade por hormônios lipossolúveis e vitaminas. Incluem-se nesta classe os receptores de hormônio glicocorticoide (GR), mineralocorticoide (MR), de progesterona (PR), de andrógeno (AR) e de estrógeno (ER) (SONODA, PEI E EVANS, 2008).

A segunda classe é composta por receptores ditos órfãos adotados, já que no momento de sua identificação, não possuíam ligantes conhecidos que posteriormente tem sido descobertos. Esta classe de receptores está envolvida com aspectos do metabolismo de lipídeos e homeostase de glicose, sendo denominados de receptor retinoide X (RXR), receptor hepático X (LXR), receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR), receptor farnesóide X (FXR) e receptor pregnano X (PXR) (SONODA, PEI E EVANS, 2008). Existem ainda os receptores adotados em que o mecanismo de regulação ainda não foi totalmente elucidado, que são o receptor androstano constitutivo (CAR), fator nuclear hepatocitário 4 (HNF4), o fator esteroidogênico 1 (SF1), receptor homólogo 1 hepático

(LRH1), receptor órfão relacionado ao retinóide (ROR) e o receptor relacionado ao estrógeno (ERR) (SONODA, PEI E EVANS, 2008).

Na terceira classe estão os receptores verdadeiramente órfãos, cujo ligante ainda não foi descoberto. Nesta classe estão: parceiro heterodímero curto (SHP), o sexo reverso dosagem 14 sensível região crítica de hipoplasia adrenal, gene 1 (Gene 1 - DAX1), o homólogo do gene sem cauda de *Drosophila* (TLL), o receptor nuclear fotoreceptor célula específico (PRN), o fator nuclear de células germinativas (GCNF), o receptor testicular (TR), o receptor nuclear 4A (NR4A), o Rev-erb (Rev-erb) e o fator I de transcrição a montante do promotor de ovalbumina de galinha (COUP-TF) (SONODA, PEI E EVANS, 2008).

Os RNs em sua forma não ligada, denominada de apo, são encontradas no citoplasma ou ainda no núcleo celular, local aonde encontram-se ligados ao DNA reprimindo a transcrição de genes-alvo regulados positivamente. Nos dois casos (localização citoplasmática ou nuclear) aparecem ligados a proteínas com atividade repressoras (PRIVALSKY, 2004). Esta ligação pode ser modificada, no entanto, pela presença do ligante, o que desencadeia um processo de modificações estruturais e funcionais do receptor (SONODA, PEI E EVANS, 2008).

A ativação da transcrição de genes-alvo regulados positivamente pelos RN se dá por meio da ligação de uma substância agonista, que por sua vez induzirá uma mudança conformacional no LBD, alterando a hélice 12 localizada na região C-terminal. Desta forma, ocorrerá dissociação dos correpressores e interação com proteínas co-ativadoras (Co-A) com o LBD. Já a supressão da expressão de genes-alvo regulados negativamente se dá quando uma substância com ação antagonista se liga ao RN, não permite que a hélice 12 se reoriente e mantém a interação com correpressores (ARANDA E PASCUAL, 2001).

Existem três isotipos, PPAR $\alpha$ , - $\beta/\delta$  e - $\gamma$ , sendo cada um codificado por um gene distinto. A nomenclatura é advinda da identificação do primeiro isotipo clonado que foi o PPAR $\alpha$ , como alvo de compostos xenobióticos que induzem proliferação de peroxissomos hepáticos em roedores (MICHALIK et al., 2006).

Os PPAR agem controlando uma rede de genes-alvo envolvidos na regulação da homeostase metabólica (EVANS, BARISH E WANG, 2004). Predominantemente, o PPAR $\alpha$  é expresso no fígado, mas pode aparecer ainda no coração, rins e músculos onde exerce papel crucial controlando o processo de oxidação de ácidos graxos (REDDY E HASHIMOTO, 2001). O PPAR $\beta/\delta$  age como potente regulador da homeostase energética e no catabolismo, encontra-se distribuído por todo corpo e em baixos níveis no fígado (KIM et al., 2003).

O PPAR $\gamma$  é um regulador chave da adipogênese e relevante quando se trata da obesidade e do diabetes tipo II (JANESICK E BLUMBERG, 2011. A). Com relação aos DE, o PPAR $\gamma$  talvez seja o receptor nuclear mais suscetível, já que a região de ligação do ligante pode acomodar uma diversidade de estruturas químicas (MALONEY E WAXMAN, 1999).

Os mecanismos pelos quais os obesogênicos atuam tendo como alvo o PPAR $\gamma$  podem envolver ação direta no receptor, e é possível que atuem também por mecanismos independentes, como por meio de modificação pós-traducional do PPAR $\gamma$  e, assim, de alguns aspectos da ação do receptor. Outras possibilidades são modificação da estrutura da cromatina, que pode influenciar a atividade do promotor do gene que codifica o PPAR $\gamma$ , ou efeitos sobre a capacidade de ligação dos receptor aos seus genes alvo. As substâncias obesogênicas podem atuar de ambas as formas aumentando os níveis da proteína de PPAR $\gamma$ , ou aumentando o recrutamento deste para os promotores de genes-chave na via adipogênica (JANESICK E BLUMBERG, 2011. A).

Outro receptor relacionado à regulação da homeostase metabólica e, assim, ao desenvolvimento da obesidade, é o RXR, que desempenha um papel essencial nos processos transcricionais mediados pelos RN, por meio da sua capacidade de heterodimerizar-se com diversos membros da superfamília dos receptores nucleares, inclusive os PPAR. Quanto ao modo de ação, podem atuar tanto como homodímeros quanto como heterodímeros com outros RN (YAMADA E KAKUTA, 2014).

O RXR apresenta 3 subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e isso lhe permite uma variabilidade de dimerizações com outros RN. Desempenham um papel fundamental na integração de vias reguladas por RN, indicando que os ligantes específicos de RXR podem modular os processos de transcrição dos genes-alvo predominantemente em heterodímeros permissivos com o PPAR, receptores X do fígado, receptor pregnano X, receptor farnesóide X, receptor de androstano constitutivo, como heterodímero não permissivo com receptor de vitamina D, heterodímeros condicionais com receptores de retinóides e receptores do hormônio da tireóide (BRTKO E DVORAK, 2015).

O receptor de glicocorticoide (GR) possui 5 isoformas, sendo elas o GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A e GR-P. Destas, o GR $\alpha$  é a isoforma de maior expressão tecidual e que é mais extensamente estudada. Tanto o GR $\alpha$  quanto o GR $\gamma$  podem regular a expressão gênica por meio da ligação aos glicocorticoides. Em contraste, o GR $\beta$  não apresenta capacidade de ligação do hormônio, exercendo, desta forma, impacto negativo sobre a atividade do GR $\alpha$ . As

isoformas GR-A e GR-P não são capazes de estabelecer ligação com os glicocorticoides, uma vez que apresentam a porção LBD truncada (OAKLEY E CIDLOWSKI, 2011).

Na ausência do ligante, o GR nativo está presente principalmente no citoplasma, integrando um grande complexo multiprotéico onde está contido também proteínas chaperonas, proteína de choque térmico (HSP) e imunofilina. O GR ao se ligar ao ligante esteroide, sofre uma alteração conformacional, substituindo a imunofilina FKBP51 pela FKBP52, sendo encaminhado pela HSP90 para o núcleo regulando a transcrição (VANDEVYVER et al., 2012).

No núcleo, o GR ativado é capaz de modular a expressão de genes-alvo por meio da ligação a uma sequência na região promotora destes genes denominada elemento responsivo aos glicocorticoides (*glucocorticoid responsive element*, GRE), ou pela interação física com outros fatores de transcrição (KINO, CHARMANDARI e CHROUSOS, 2011). Diversos fatores influenciam a atividade do GR incluindo identidade do ligante, a isoforma dos GR, os co-fatores que encontram-se disponíveis, outros fatores de transcrição ou de modificação de proteínas celulares e ainda, o gene alvo (OAKLEY E CIDLOWSKI, 2011).

O PPAR $\gamma$ , GR $\alpha$  e RXR $\alpha$  apresentam importante papel na adipogênese, na medida em que fazem parte da complexa cascata transcricional envolvida na diferenciação de células e precursoras em adipócitos maduros (GREGOIRE, SMAS E SUL, 1998). O aumento alarmante da frequência de obesidade e sua associação com graves comorbidades deu ao adipócito um papel de importante alvo de investigações que visam determinar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade e de suas complicações. Desta forma, muitos fatores com potencial obesogênico apresentam, como mecanismo de ação plausível, efeito sobre a adipogênese, o que inclui efeitos plausíveis sobre fatores envolvidos na cascata transcricional da diferenciação dos adipócitos.

O processo adipogênico desencadeado por alguns compostos da classe dos organoestânicos por meio da interação com o complexo RXR/PPAR $\gamma$  já foi descrito. Alguns compostos desta mesma classe, embora amplamente presentes no ambiente, não foram ainda investigados com relação à sua atividade sobre o RXR/PPAR $\gamma$  ou sobre a adipogênese. Desta forma, a proposta deste trabalho foi investigar a atividade do benzoato de tributilestanho e do iodeto de tributilestanho sobre o receptor de glicocorticoide e sobre o receptor ativado por proliferadores peroxissomais, além do efeito adipogênico em cultura de células.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Investigar o efeito dos organoestênicos benzoato de tributilestanho e iodeto de tributilestanho sobre a atividade do GR e do PPAR $\gamma$  e sobre a adipogênese.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar o efeito citotóxico do benzoato de tributilestanho e do iodeto de tributilestanho em células HeLa por meio do ensaio colorimétrico de redução do MTT.
- ✓ Investigar a atividade do benzoato de tributilestanho e do iodeto de tributilestanho nos receptores PPAR $\gamma$  e GR $\alpha$  por meio de ensaio de gene repórter em células HeLa.
- ✓ Estudar o potencial adipogênico do benzoato de tributilestanho e do iodeto de tributilestanho por meio de ensaio de adipogênese em cultura em células mesenquimais murinas C3H10T1/2 e pré-adipócitos murinos 3T3-L1.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados neste estudo estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos reagentes utilizados neste estudo, com seus respectivos pesos moleculares e fabricantes.

Reagentes	Peso Molecular	Fabricante
Benzoato de tributilestanho	411,17	Sigma-Aldrich®
Iodeto de tributilestanho	416,96	Sigma-Aldrich®
Rosiglitazona	357,43	Sigma-Aldrich®
Dexametasona	39246	Sigma-Aldrich®
Isometilbutilxantina	222,24	Sigma-Aldrich®
Insulina	5807,57	Sigma-Aldrich®
Lipofectamina	-	Invitrogen®
Óleo vermelho O	408,49	Sigma-Aldrich®
MTT	335,43	Sigma-Aldrich®

As soluções de benzoato de tributilestanho e do iodeto de tributilestanho utilizadas foram preparadas por diluição em DMSO (dimetil sulfóxido) para a obtenção de diferentes faixas de concentrações e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegidas da luz. A faixa das concentrações utilizadas nos ensaios de gene repórter e adipogênese em cultura foi determinada pelos resultados obtidos a partir do teste de viabilidade celular.

O kit utilizado para realização da PCR (Reação em cadeia da polimerase) foi adquirido da *Applied Biosystems*®.

#### 3.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células HeLa, utilizadas neste estudo para o ensaio de viabilidade celular e de gene repórter, foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), contendo 10% de soro fetal bovino, 2 nM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, em placas de 150 mm para cultura de células (Corning®).

Pré-adipócitos murinos 3T3-L1 e células mesenquimais murinas C3H10T1/2, utilizados para o ensaio de adipogênese, foram cultivados em meio de cultura DMEM contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro neonatal bovino, em placas para cultura de tecidos de 150 cm<sup>2</sup> (Corning®) até atingirem confluência em torno de 70 a 80% para serem plaqueadas em placas de 6 poços para o processo de diferenciação.

Todas as culturas celulares foram mantidas em incubadora a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para investigar a citotoxicidade dos compostos benzoato de TBT e do iodeto de TBT foi feito o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). Neste ensaio o anel tetrazólico presente no sal do brometo de MTT, que possui coloração amarelada, é clivado principalmente pela enzima succinato desidrogenase presentes na mitocôndria de células que estão viáveis, resultando na formação de cristais de formazana, que apresentam coloração azulada; assim considera-se que a quantidade de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazana formados (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio utilizou-se uma placa de 96 poços, na qual foram plaqueadas cerca de 30.000 células HeLa por poço, em meio de cultura DMEM, com exceção do poço utilizado como branco de reação que continha apenas o meio de cultura. Em todos os poços o volume final era de 100µL, conforme apresentado na Figura 6. As células foram incubadas por 24 horas, para que as mesmas ficassem aderidas à placa e então foram adicionados os tratamentos do benzoato de TBT e do iodeto de TBT, ambos nas concentrações de 10<sup>-11</sup> M a 10<sup>-4</sup> M (concentrações crescentes, com intervalos de 10 vezes), e o DMSO:EtOH (Dimetilsulfoxido:etanol) (2:3), utilizado como solvente para os compostos (controle negativo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
B	DMEM	Veículo	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	DMEM
C	DMEM	Veículo	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	DMEM
D	DMEM	Veículo	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	DMEM
E	DMEM	Veículo	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	DMEM
F	DMEM	Veículo	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	DMEM
G	DMEM	Veículo	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Conc. 7	Conc. 8	Conc. 9	DMEM
H	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	Branco

**Figura 6.** Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio de viabilidade celular. Em vermelho, as células com o meio DMEM; em amarelo, as células com o DMEM e o veículo (DMSO), em branco as células com o DMEM e as concentrações testadas e poço Branco com apenas o meio DMEM.

Após 24 horas de exposição ao benzoato de TBT e ao iodeto TBT, o meio com os compostos foi aspirado e posteriormente foi adicionado 100  $\mu$ L do meio de cultura DMEM e 10  $\mu$ L (10%) de MTT (Sigma) na concentração de 5 mg/mL em cada poço. As células foram mantidas por 4 horas à 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L da solução reveladora (13 mL de isopropanol e 52  $\mu$ L de HCl) e a mistura foi homogeneizada, para que os cristais formados chegassem à dissolução completa e assim fosse viável realizar a leitura no espectrofotômetro (*Shimadzu*) no comprimento de onda de 570 nm.

Os experimentos foram realizados três vezes e em triplicata. Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade celular em relação ao controle utilizado no experimento (DMSO), e obtidos da seguinte forma:

- (i) Do valor da absorbância obtida em cada poço da placa, contendo células, foi subtraído o valor da absorbância no poço da placa contendo apenas meio de cultura (branco).
- (ii) O valor obtido a partir do cálculo descrito no item 1, nos poços da placa que receberam veículo ou os diferentes compostos, foi dividido pelo valor obtido a partir do cálculo descrito no item 1, nos poços da placa contendo apenas células, sem tratamento.
- (iii) O valor obtido no item 2, nos poços da placa contendo células tratadas com cada concentração de cada um dos 3 compostos testados, foi dividido pelo valor obtido no item 2 das células tratadas com veículo.

### 3.4 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram utilizados no ensaio de gene repórter com o objetivo de investigar a atividade agonista dos desreguladores endócrinos estudados, o benzoato de TBT e iodeto de TBT (FORMAN et al., 1995). Foram utilizados os plasmídeos de expressão de RN de interesse (LBDPPAR $\gamma$ /DBDGAL4, GR $\alpha$  e RXR $\alpha$ ), e a construção contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo (sequência -32 a +45) da quinase de timidina (TK) do vírus herpes simples e pela sequência DR-1 (DR1-TK-Luc), para o RXR $\alpha$ , ou pela sequência contendo o elemento responsivo ao GR (GRE-Luc), para o GR $\alpha$  (AMBROSIO et al., 2007), ou pela sequência contendo o elemento responsivo do GAL4 (UAS<sub>5x</sub>-Luc). Para obtenção de quantidade suficiente de DNA plasmidial, estes foram introduzidos em células procarióticas para sua amplificação e, em seguida, extraídos destas células.

### 3.5 TRANSFORMAÇÃO

Com o objetivo de introduzir um plasmídeo em célula procariótica, foi utilizado o processo de transformação. Este processo consiste em utilizar cepas da bactéria *E.coli* DH5 $\alpha$  para que estas então repliquem os plasmídeos que serão utilizados no ensaio de gene reporter.

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, 50  $\mu$ L de *E. coli* foram incubados com 100 ng do plasmídeo de interesse, durante 30 minutos, no banho de gelo. Posteriormente, foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos em banho de água a 42°C. Com esse processo é possível promover a abertura de poros na parede celular bacteriana e assim, viabilizar a entrada do plasmídeo na bactéria. Em seguida, adicionou-se 500  $\mu$ L do meio de cultura LB sem antibiótico e incubou-se durante 1 hora a 37°C, no agitador rotatório (*shaker*). Em seguida 50  $\mu$ L da suspensão, com bactérias já transformada, foram semeados em placa de Petri contendo o meio LB adicionado de 15% de ágar e 0,1 mg/mL de ampicilina, e mantida durante 16 horas a 37°C para o crescimento bacteriano.

### 3.6 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Este é um processo que ocorre depois da transformação das bactérias. Para tanto, uma colônia resistente à ampicilina (que foi transformada com o plasmídeo) foi selecionada e cultivada em 5 mL de meio LB, contendo 5  $\mu$ L de ampicilina (100 mg/mL), durante 4 a 6

horas em temperatura constante de 37°C, sob agitação. Posteriormente, as bactérias foram transferidas para outro recipiente que continha 400 mL de LB e então foram incubadas por 12 horas a 37°C, sob agitação.

Ao final do período de crescimento, utilizou-se o processo de centrifugação a 5059 x g por 20 minutos a 4°C, afim de isolar o *pellet*, correspondente às bactérias. Os plasmídeos foram purificados a partir do pellet bacteriano, utilizando o método de cromatografia por troca iônica, com a utilização do kit o *Quiagen Plasmid Maxi Kit*®, de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.7 ENSAIO DE GENE REPÓRTER

Este ensaio foi utilizado para avaliar a atividade dos RN de interesse, PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  e GR $\alpha$  sobre a transcrição, por meio de uma construção contendo o gene repórter luciferase dirigido pelo elemento responsivo a estes receptores. Com a cotransfecção do vetor de expressão do RN e do plasmídeo repórter, espera-se a expressão dos RN de interesse nas células transfectadas e, na presença de um ligante que atue como agonista, o aumento de sua atividade transcricional. Considerando que o gene repórter da luciferase (enzima que na presença de seu substrato luciferina catalisa uma reação que converte energia química em energia luminosa, podendo esta ser quantificada em um luminômetro) é dirigido por um promotor contendo o elemento responsivo aos RN de interesse, a avaliação da atividade da enzima luciferase representa a medida da atividade transcricional do receptor.

Existem diferentes formas de se introduzir o material genético na célula. Neste trabalho foi utilizada a lipofectamina, que é uma formulação de lipossomas com características catiônicas que são capazes de se complexar ao DNA plasmidial, ultrapassando a repulsão eletrostática da membrana celular carregada negativamente, permitindo a entrada do DNA plasmidial nas células (DALBY et al., 2004).

As células utilizadas foram as HeLa, uma linhagem comumente utilizada em laboratórios desde 1951, por se tratar de uma linhagem derivada de tumor cervical uterino de fácil cultivo e com excelente capacidade de proliferação (MASTERS, 2002). No dia anterior à transfecção, as células foram plaqueadas em placas de 48 poços e foram mantidas em meio de cultura DMEM até que atingissem confluência entre 70 a 90% de confluência.

O protocolo seguido foi determinado pelas instruções do fabricante do reagente utilizado, Lipofectamine® 2000 (Invitrogen), e constituiu na cotransfecção de 60 ng do

plasmídeo que continha o DNA complementar (cDNA) dos receptores estudados (RXR $\alpha$ , GR $\alpha$  ou, no caso do PPAR $\gamma$ , o receptor quimérico contendo o LBD do PPAR $\gamma$  e o DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4) e 240 ng do plasmídeo que continha o respectivo elemento responsivo (DR1-Luc, GRE ou GAL4<sub>5x</sub>-Luc/UAS<sub>5x</sub>-Luc), que estava fusionado ao gene repórter da luciferase, por poço.

Passadas 6 horas da incubação com lipofectamina e DNA plasmidial, as células foram tratadas com DMSO (veículo, controle negativo), rosiglitazona 10<sup>-5</sup> M (controle positivo para os ensaios com PPAR $\gamma$ ), dexametasona 10<sup>-5</sup> M (controle positivo para os ensaios com GR $\alpha$ ), e os DEs de interesse, o benzoato de TBT ou iodeto de TBT, ambos nas concentrações de 10<sup>-11</sup> M a 10<sup>-7</sup> M (concentrações crescentes, com intervalos de 10 vezes) pré-determinadas pelo resultado da viabilidade celular, por 24 horas. Logo em seguida, as células foram lisadas para que fosse mensurada a atividade das enzimas luciferases em luminômetro, utilizando o kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Cada experimento foi realizado em triplicata, e repetido no mínimo por 3 vezes.

### 3.8 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS 3T3-L1 EM ADIPÓCITOS

Alguns tipos celulares, quando induzidos, podem diferenciar-se em adipócitos podendo ser utilizados como modelo *ex vivo* para a avaliação do processo de adipogênese. As células que primeiramente foram utilizadas para este fim foi a subcepa da linhagem 3T3 do camundongo Swiss, que já apresentam comprometimento com a diferenciação adipocitária, e é denominada de pré-adipócito 3T3-L1 (GREEN E MEUTH, 1974).

Os pré-adipócitos, habitualmente apresentam morfologia de fibroblastos, no entanto, se cultivados com componentes que ativam vias celulares específicas e determinantes para a diferenciação adipocitária, as células adquirem um novo formato, desta vez mais arredondado e em torno de cinco dias iniciam o processo de acúmulo de gotículas lipídicas (ROSEN et al., 2000).

Para o ensaio de diferenciação, cerca de 30.000 células 3T3-L1 foram plaqueadas em placas de 6 poços, mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em meio DMEM contendo soro neonatal bovino a 10%, penicilina e estreptomicina, que foi trocado a cada 2 dias até que as células atingissem 100% de confluência.

Ao alcançarem 100% de confluência, as células foram mantidas sob as mesmas condições por mais 48 horas para que houvesse a parada do crescimento. Após esse período, foi iniciada a indução da diferenciação com o emprego de dois protocolos:

Protocolo 1:

- Indução da diferenciação com meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10%, insulina 167 nM (1 µg/mL), dexametasona 1 µM e isometilbutilxantina 0,5 nM, durante 4 dias.
- Manutenção com meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10% e insulina 167 nM (1 µg/mL) durante 6 dias.

Protocolo 2:

- Indução da diferenciação com meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10%, insulina 10 µg/mL, durante 4 dias.
- Manutenção com meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10% e insulina 5 µg/mL durante 6 dias.

Nos dois casos, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos tratamentos com os compostos benzoato de TBT e iodeto de TBT, desde o dia da indução da diferenciação até o dia da coleta ou fixação das células. Em todas as placas havia também um poço com células não diferenciadas (células mantidas apenas com o meio de cultura DMEM, sem o estímulo para a diferenciação), um poço de controle negativo (células com o DMEM, o estímulo para a diferenciação e tratadas com o solvente utilizado nos compostos, o DMSO) e um poço com o controle positivo (células com o DMEM, o estímulo de diferenciação e a rosiglitazona  $10^{-6}$  M).

Com o protocolo 1, foi observada diferenciação adipocitária significativa no grupo induzido e tratado com o veículo (DMSO), por meio da coloração com óleo vermelho O (descrito na seção 3.10), comparável à observada no tratamento com rosiglitazona. Com este achado foi considerado um indicativo de limitação à avaliação do efeito dos compostos testados sobre a diferenciação de adipócitos, assim foi selecionado o protocolo em que a indução era realizada apenas com insulina 10 µg/mL e a manutenção com insulina 5 µg/mL. Os experimentos de diferenciação foram repetidos pelo menos 3 vezes.

### 3.9 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS C3H10T1/2 EM ADIPÓCITOS

As células C3H10T1/2 são pertencentes à linhagem de células mesenquimais, isoladas de embriões de camundongos C3H e assim como as 3T3-L1 também apresentam morfologia de fibroblastos. Funcionalmente, as células C3H10T1/2 são semelhantes a células tronco mesenquimais, no entanto, se induzidas podem diferenciar-se em adipócitos maduros, acumulando gotículas lipídicas (OTTO E LANE, 2005).

Para o ensaio de diferenciação, cerca de 30.000 células C3H10T1/2 foram plaqueadas em placas de 6 poços, mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em meio DMEM, soro neonatal bovino a 10%, penicilina e estreptomicina, trocados a cada 2 dias até que as células atingissem 100% de confluência.

Ao alcançarem 100% de confluência, as células foram mantidas sob as mesmas condições por mais 48 horas para que houvesse a parada do crescimento. Após esse período (dia 0), o meio de cultura foi substituído pelo meio de indução da diferenciação composto por DMEM contendo soro fetal bovino a 10%, insulina humana 167 nM (1 µg/mL), dexametasona 1 µM e isobutilmetilxantina 0,5 mM (10 µg/ml), penicilina e estreptomicina. No dia 4, receberam o meio de manutenção, composto por DMEM contendo soro fetal bovino a 10% e insulina 1 µg/mL, durante 6 dias.

Os DE, benzoato de TBT e o iodeto de TBT foram administrados em diferentes concentrações a partir do dia 2 (indução da diferenciação) até o dia da coleta ou fixação das células. Em todas as placas havia também um poço com células não diferenciadas (células mantidas apenas com o meio de cultura DMEM, sem o estímulo para a diferenciação), um poço de controle negativo (células com o DMEM, o estímulo para a diferenciação e tratadas com o solvente utilizados nos compostos, o DMSO) e um poço com o controle positivo (células com o DMEM, o estímulo de diferenciação e a rosiglitazona). Todos os experimentos da diferenciação foram realizados pelo menos 3 vezes, de forma independente.

### 3.10 COLORAÇÃO COM ÓLEO VERMELHO O

Ao final do ensaio de diferenciação de adipócitos que se deu no décimo dia, utilizando as linhagens celulares 3T3-L1 e C3H10T1/2, foi analisado o acúmulo lipídico intracelular por meio da coloração com o óleo vermelho O. Para tanto, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS (Phosphate-Buffered Saline) por duas vezes. Posteriormente,



foram fixadas com formaldeído a 4% em PBS por 40 minutos. Logo em seguida, foram feitas 2 lavagens com PBS e então as células foram incubadas com o corante para lipídeos óleo vermelho O (*Oil Red O*), previamente solubilizado e filtrado, durante uma hora. Ao término do processo as células foram lavadas com água destilada para a retirada do excesso do corante e as imagens foram fotodocumentadas no microscópio *Regular Inverted BF&Fluorescent Microscope* nos aumentos de 20 e 40 vezes.

### 3.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE CULTURA DE CÉLULAS

A adipogênese foi avaliada por meio da expressão do RNA mensageiro (RNAm) do gene que codifica a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária (*Fabpa* ou aP2). Para tanto, foi realizada a extração do RNA total das amostras das células induzidas a se diferenciar em adipócitos em presença dos diferentes tratamentos. As placas foram lavadas com PBS e 1 mL de Trizol (Invitrogen®) foi adicionado em cada poço. As células em Trizol foram coletadas com o auxílio de uma micropipeta e transferidas para um tubo tipo *ependorf* de 1.5 mL. As células foram imediatamente congeladas à -80°C para posterior extração.

No dia da extração as células foram descongeladas em gelo e em seguidas centrifugadas a 14000 rpm, por 10 minutos, a 4°C em centrífuga previamente limpa com álcool 70%. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo *ependorf* aonde foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Em seguida, o tubo foi agitado em vórtex por 15 segundos e a amostra foi incubada em temperatura ambiente por 3 minutos. Foi realizada uma nova centrifugação, desta vez a 14000 rpm, por 15 minutos a 4°C, e depois disto foi possível observar a formação de 3 fases. A fase aquosa, disposta na parte superior, foi transferida para um terceiro tubo de 1,5 mL em que foram adicionados 500 µL de isopropanol e então realizada agitação em vórtex. Depois disso, as amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, e logo em seguida foram centrifugadas a 14000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Ao fim deste processo, foi possível observar a formação de um *pellet* no fundo do tubo. Os tubos foram decantados e vertidos em gaze estéril e logo foi adicionado 1 mL de etanol a 75% gelado (diluído em água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, a 0,1%). Os tubos foram então agitados no vórtex e centrifugados a 9000 rpm, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram vertidos em gaze estéril para a secagem do

*pellet*, que então foi ressuspensionado em 40 µL de água Milli-Q tratada com DEPC (livre de RNase) e mantidas no *freezer* a -80°C para posterior utilização.

Antes que a PCR fosse realizada, a concentração do RNA total foi mensurada no espectrofotômetro de microvolume *Nanovue* (*GE Health Sciences*®, *Life Sciences, Buckinghamshire, UK*), utilizando 1 µL da amostra anteriormente purificada. Também foi possível determinar o grau de pureza da amostra, que é calculado automaticamente pela razão da densidade óptica nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm.

Para a verificação da integridade do RNA extraído, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão de TBE 1x (Tris-borato-EDTA). A quantificação das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal foi realizada quando o gel com as bandas foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL em água destilada) e avaliado em luz ultravioleta. Posteriormente, as amostras que foram consideradas satisfatórias foram tratadas com DNase I (*Sigma-Aldrich*®) de acordo com as determinações estabelecidas pelo fabricante.

Após o tratamento das amostras com DNase I, para garantir que as amostras não estariam contaminadas com DNA genômico, o RNA extraído foi utilizado para a determinação da expressão relativa da *Fabpa* nas amostras, por PCR em tempo real quantitativa.

### 3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA

Para a realização da análise da expressão gênica por meio de PCR quantitativa em tempo real, é necessário que o RNA obtido da extração anterior seja convertido em cDNA, processo este que requer a utilização da enzima transcriptase reversa. As etapas de transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativa em tempo real foram realizadas em um único passo, utilizando o *Kit Power SYBR*® *Green RNAtO-CT 1-Step* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

O *SYBR Green* foi utilizado para a determinação dos produtos da amplificação. Por este método é possível quantificar a fluorescência emitida pela excitação deste fluoróforo intercalado na dupla fita de DNA, e a fluorescência é proporcional à quantidade de produtos amplificados ao final de cada ciclo de reação da PCR. Ao final da reação, o detector presente no aparelho da PCR é capaz de identificar o sinal fluorescente após cada ciclo e o equipamento compõem um traçado da intensidade do sinal a cada ciclo e determina o Ct

(*cycle threshold*), que corresponde ao número necessário de ciclos de reação para que a amplificação se torne exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*) para um volume final de 20 µL. Para verificar as possíveis contaminações, foi realizada uma reação em que não estava presente a amostra de RNA (controle negativo) para cada par de *primers*. Com o objetivo de garantir a ausência de contaminação por DNA genômico foi realizada uma reação sem a transcriptase reversa para cada par de *primers*. Os reagentes utilizados na reação estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Reagentes utilizados na reação da cadeia da polimerase e suas respectivas quantidades.

Reagentes	Quantidade (µL)
<i>Mix Power SYBR Green® RT PCR (2x)</i>	10
Transcriptase reversa	0,16
RNA	4,5
<i>Primer forward</i>	0,4
<i>Primer reverse</i>	0,4
Água Milli-Q	4,54
Total	20

Foram utilizados *primers* específicos para o cDNA que codifica a FABP-A e a GAPDH (gene referência) cujas sequências estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Sequência dos *primers* utilizados na determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

Gene	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
<i>Fabpa</i>	5'-ACACCGAGATTCCTTCAAAC-3'	5'-CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTCA-3'
<i>Gapdh</i>	5'AAGGGCTCATGACCACAGTC-3'	5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'

Para a realização das reações foi utilizado o aparelho *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* e os resultados obtidos foram analisados com o programa *Software StepOne v2.1*.

A reação se deu nas seguintes condições: A reação da transcriptase reversa a 48°C por 30 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C para que a Taq DNA polimerase fosse ativada, posteriormente 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para a desnaturação da fita, finalizando a

reação com o anelamento dos *primers* e extensão da fita que se deu à temperatura de 65°C por 1 minuto.

A  $T_m$  (temperatura de desnaturação) é utilizada, neste ensaio para a determinação da especificidade dos produtos da reação, já que é específica para cada sequência de DNA amplificado. Desta forma, realizou-se a curva de desnaturação (curva de melting) dos produtos advindos da reação, para calcular a  $T_m$ , que representa a temperatura em que 50% dos produtos da reação da PCR encontram-se desnaturados. A curva de desnaturação é realizada por meio, da elevação gradativa da temperatura de 60°C para 95°C e observando-se qual o ponto em que a fluorescência, que apresenta redução a medida que a temperatura aumenta, apresenta um decaimento mais acelerado.

Os valores de  $C_t$  obtidos na reação de amplificação do DNA que codifica o gene alvo (*fabpa*) foram normalizados em função dos valores obtidos nas reações de amplificação do DNA complementar do gene utilizado como referência *gapdh*. Assim, a quantificação relativa da expressão DNA complementar do gene que codifica a *fabpa* foi então analisada nos grupos tratados com o controle positivo (rosiglitazona) ou com os DE em relação ao grupo calibrador (tratado com veículo), por meio da fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , em que  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{amostra}} - \Delta C_{t_{calibrador}}$ .

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados apresentados representam a média dos experimentos  $\pm$  o erro padrão da média (EPM) de no mínimo, três ensaios realizados em momentos distintos. Todas as análises foram obtidas com o auxílio do *GraphPad Prism 5.0* para Windows, com critério de significância correspondendo ao valor de  $p < 0,05$ .

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular por redução do MTT e dos ensaios de gene repórter foram analisados por meio da análise de variância utilizando o teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Neuman-Keuls.

Os resultados obtidos no ensaio de expressão dos genes que codificam *fabpa* e a *gapdh*, também foram apresentados como média  $\pm$  EPM da expressão dos grupos tratados com controle positivo ou DE em relação à dos grupos tratados com o veículo. Os resultados foram analisados por análise de variância de Kruskal-Wallis seguindo pelo teste de Dunn.

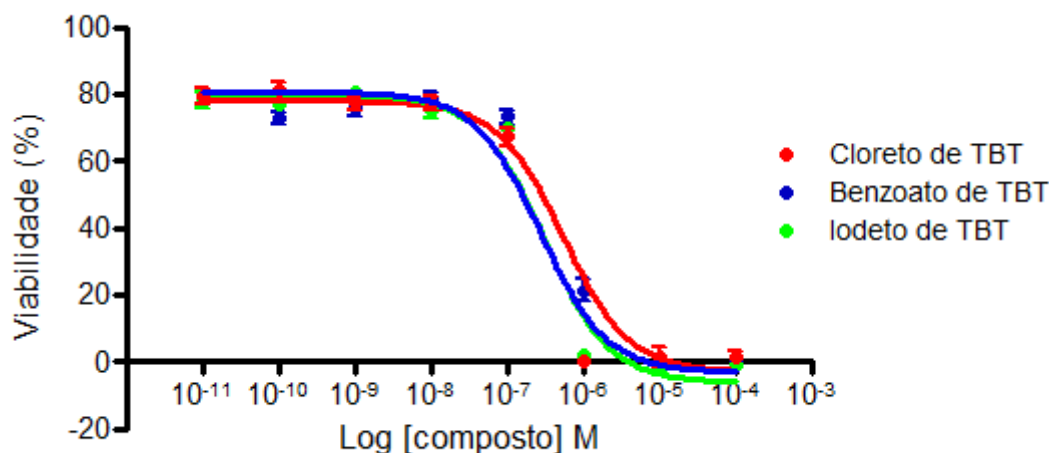
## 4 RESULTADOS

Muitas substâncias químicas ambientais são conhecidas ou suspeitas de desencadear desregulação endócrina, por mimetizar hormônios lipofílicos naturais que agem como ligantes de fatores de transcrição membros da superfamília dos receptores nucleares (JACOBS E LEWIS, 2002). Entre uma gama de produtos químicos suspeitos de desregulação endócrina, foram testados dois organoestânicos, o benzoato de tributilestanho e o iodeto de tributilestanho, e com respeito à sua capacidade de ativar os principais receptores nucleares envolvidos na adipogênese, o PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  e GR $\alpha$ , além de seu efeito adipogênico em cultura.

### 4.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar se os compostos selecionados para este estudo, benzoato de tributilestanho e iodeto de tributilestanho, exerciam alguma atividade citotóxica nas células HeLa e, assim, determinar quais concentrações seriam utilizadas no ensaio de gene repórter foi realizado o ensaio de viabilidade celular, determinada pela capacidade de redução do MTT a formazana.

As células HeLa foram tratadas com concentrações crescentes dos compostos benzoato de TBT e iodeto de TBT, e com cloreto de TBT (organoestânico com atividade obesogênica já descrita), ou com o solvente utilizado na diluição dos mesmos (DMSO), durante 24 horas. Foi observado que concentrações superiores a  $10^{-7}$  M dos três sais de TBT reduziram significativamente a viabilidade celular (Figura 7). Desta forma, foram selecionadas as concentrações de  $10^{-11}$  M a  $10^{-7}$  M de ambos os compostos para os ensaios de gene repórter.



**Figura 7:** Curvas dose-resposta do efeito citotóxico induzido pelos DE testados em células HeLa. O cloreto, iodeto e benzoato de TBT, em concentrações superiores a 100 nM, reduzem a viabilidade de células HeLa. Células HeLa tratadas com benzoato de TBT, iodeto de TBT, cloreto de TBT ou seu veículo e avaliadas com relação à sua capacidade de redução de MTT a formazana. Dados apresentados representam a média  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de células viáveis após tratamento com DE em relação às células tratadas com veículo. Experimentos realizados em triplicata e em três ocasiões independentes.

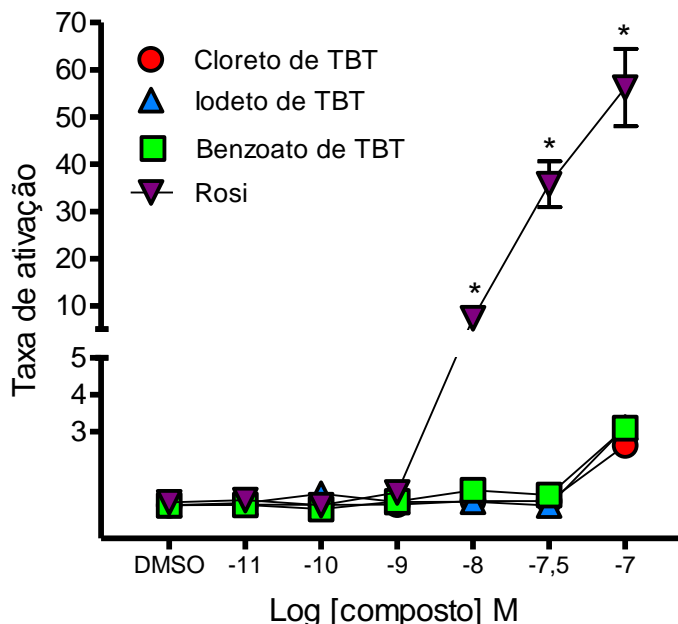
#### 4.2 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO INDUZEM A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO PPAR $\gamma$ EM CÉLULAS HELA

Para determinar se o benzoato de TBT e o iodeto de TBT apresentavam atividade agonista em PPAR $\gamma$ , foi empregado o ensaio de gene repórter. As células da linhagem HeLa foram co-transfectadas com o vetor quimérico contendo o LBD do PPAR $\gamma$  fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL-4 (PPAR $\gamma$ -LBD/DBD-GAL4), e um plasmídeo contendo a sequência do repórter luciferase dirigida por 5 cópias do elemento responsivo ao GAL4 (GAL4<sub>5x</sub>-Luc). Como o GAL4 é um fator de transcrição exclusivo de leveduras, o PPAR $\gamma$  endógeno de mamíferos (células HeLa) não é ativado, permitindo a avaliação dos compostos exclusivamente sobre o LBD do PPAR $\gamma$ .

As células foram tratadas com concentrações crescentes dos DE (10<sup>-11</sup> M a 10<sup>-7</sup> M), com o agonista conhecido do PPAR $\gamma$ , a rosiglitazona (10<sup>-5</sup> M, controle positivo), com um organoestânico já conhecido por exercer atividade agonista em PPAR $\gamma$ , o cloreto de TBT (10<sup>-7</sup> M), ou o veículo utilizado na diluição dos mesmos (DMSO).

Os resultados (Figura 8) indicaram que tanto o benzoato de TBT quanto o iodeto de TBT induzem a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , com ativação máxima comparável à do organoestânico já descrito como agonista de PPAR $\gamma$ , o cloreto de TBT, porém cerca de 20

vezes inferior à da rosiglitazona, considerada um agonista total do receptor. Estes dados sugerem, desta forma, a atividade agonista parcial do benzoato e do iodeto de TBT no PPAR $\gamma$ .



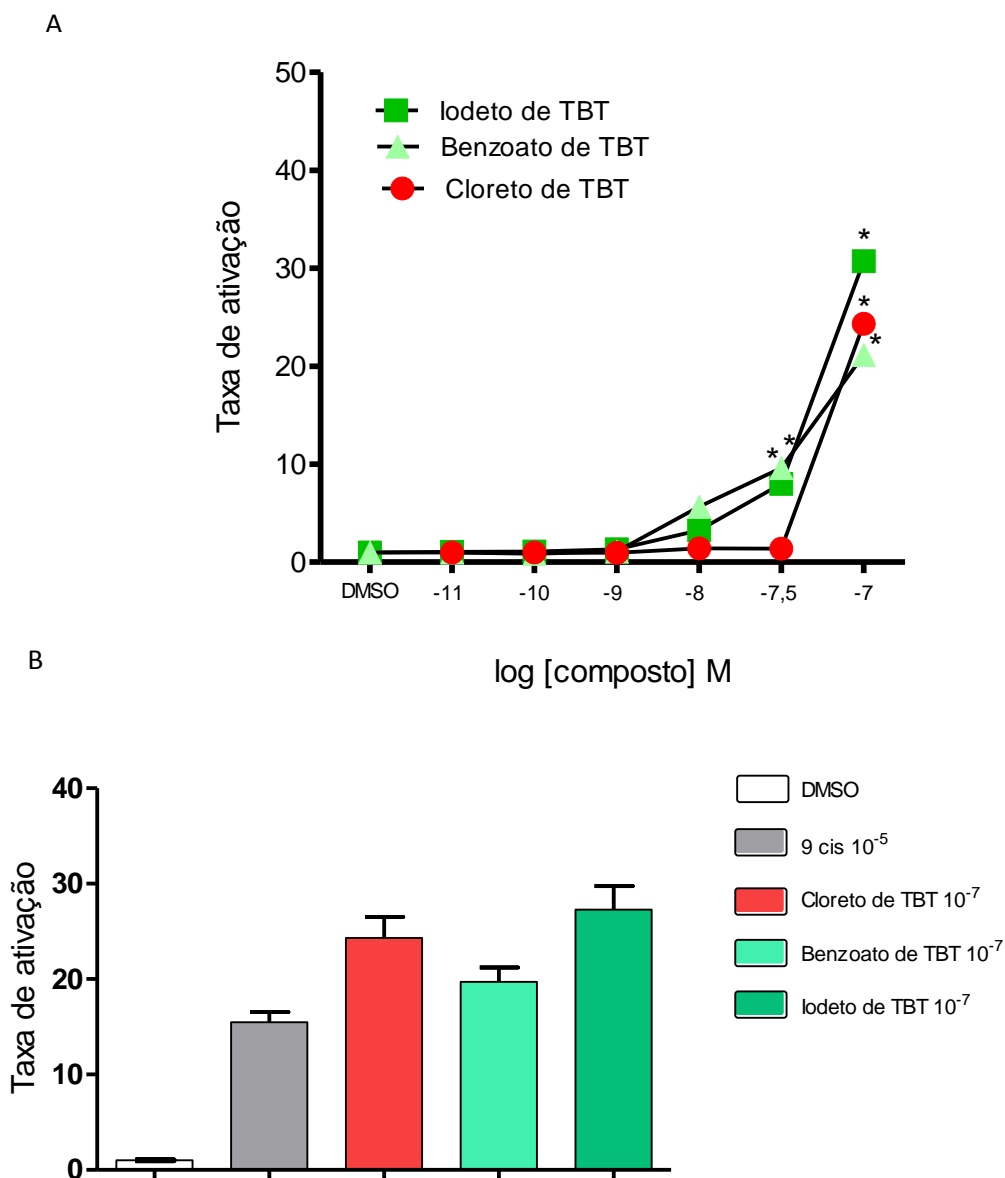
**Figura 8.** O benzoato de TBT e o iodeto de TBT induziram a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ . Células HeLa foram co-transfectadas com plasmídeo quimérico LBDPPAR $\gamma$ -DBDGAL4 e o plasmídeo contendo o gene repórter luciferase dirigido por 5 cópias do elemento responsivo ao GAL4 (GAL4<sub>5x</sub>-Luc) e tratadas com veículo (DMSO) ou diferentes concentrações de rosiglitazona ou dos TBTs por 24 horas. Em seguida, foram coletadas para quantificação da atividade da luciferase. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo, de pelo menos 3 experimentos independentes e realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  rosiglitazona vs DMSO; \*\*  $p < 0,05$  cloreto, benzoato e iodeto de TBT vs DMSO, por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls.

#### 4.3 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO INDUZEM A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO RXR $\alpha$ EM CÉLULAS HELA

A ligação de um agonista ao RXR $\alpha$  é uma forma alternativa de se ativar o heterodímero formado pelo PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ , uma vez que o PPAR $\gamma$  forma um heterodímero permissivo com RXR $\alpha$ , possibilitando que a atividade transcricional seja ativada pelo agonista do RXR $\alpha$ , pelo agonista do PPAR $\gamma$  ou pelo agonista de ambos os receptores (DESVERGNE E WAHLI, 1999).

Para investigar a atividade do benzoato e do iodeto de TBT sobre o RXR $\alpha$ , células HeLa foram co-transfectadas com o vetor de expressão do RXR $\alpha$  e com o vetor repórter da

luciferase dirigido pelo elemento responsivo ao RXR $\alpha$  (DR1-LUC), e tratadas com DEs investigados, e ácido 9-cis-retinoico (agonista conhecido do RXR $\alpha$ ) ou o veículo (DMSO, controle negativo). Os resultados indicaram que o benzoato e o iodato de TBT induziram a atividade transcricional do RXR $\alpha$ , com eficácia comparável ao ácido 9-cis-retinoico (Figura 9), o que os caracteriza como agonistas do receptor.



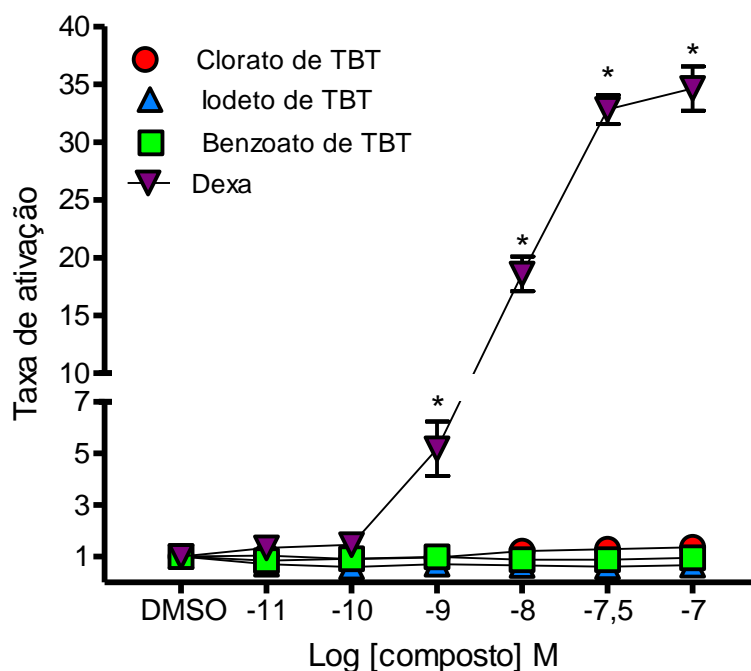
**Figura 9.** O benzoato de TBT e iodeto de TBT induziram a atividade transcricional do RXR $\alpha$ . Células HeLa cotransfectadas com os vetores de expressão do RXR $\alpha$ , o repórter RXR $\alpha$  (DR1-Luc), tratadas ácido 9-cis retinoico, DMSO ou DE durante 24 horas e, em seguida, coletadas para determinação da atividade de luciferase. (A) Curva concentração-resposta da taxa de ativação do RXR $\alpha$  induzida pelo benzoato, iodeto e cloreto de TBT. (B) Taxa de ativação do RXR $\alpha$  em resposta ao tratamento com as concentrações máximas de benzoato, iodeto de TBT e do ácido 9-cis retinoico. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo, de pelo menos 3 experimentos independentes e realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  9-cis



retinoico vs DMSO; \*  $p < 0,05$  cloreto, benzoato e iodeto de TBT vs DMSO, por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls.

#### 4.4 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO NÃO INDUZEM A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO GR $\alpha$ EM CÉLULAS HELA

A ativação do receptor de glicocorticoide desempenha papel fundamental na cascata de diferenciação de adipócitos. Para determinar se o benzoato e o iodeto de TBT eram capazes de ativar este receptor e, assim, mimetizar a ação dos glicocorticoides, foi realizado o ensaio de gene repórter. As células HeLa foram co-transfectadas com o vetor de expressão do GR $\alpha$  e com o plasmídeo contendo o repórter luciferase dirigido pelo elemento responsivo ao GR (GRE-Luc) e expostas, por 24 horas, aos compostos testados, ao cloreto de TBT (DE com atividade adipogênica caracterizada previamente), ao agonista já caracterizado de GR, a dexametasona, e ao veículo (controle negativo). Não foi observada indução da atividade transcricional do GR $\alpha$  em resposta a nenhum dos TBT testados (Figura10).



**Figura 10.** O benzoato de TBT e iodeto de TBT não induzem a atividade transcricional do GR $\alpha$ . Células HeLa co-transfectadas com os vetores de expressão do GR $\alpha$ , o repórter DR-1-TK-LUC, tratadas com dexametasona ou DE durante 24 horas e, em seguida, coletadas para determinação da atividade de luciferase. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo DMSO, de experimentos

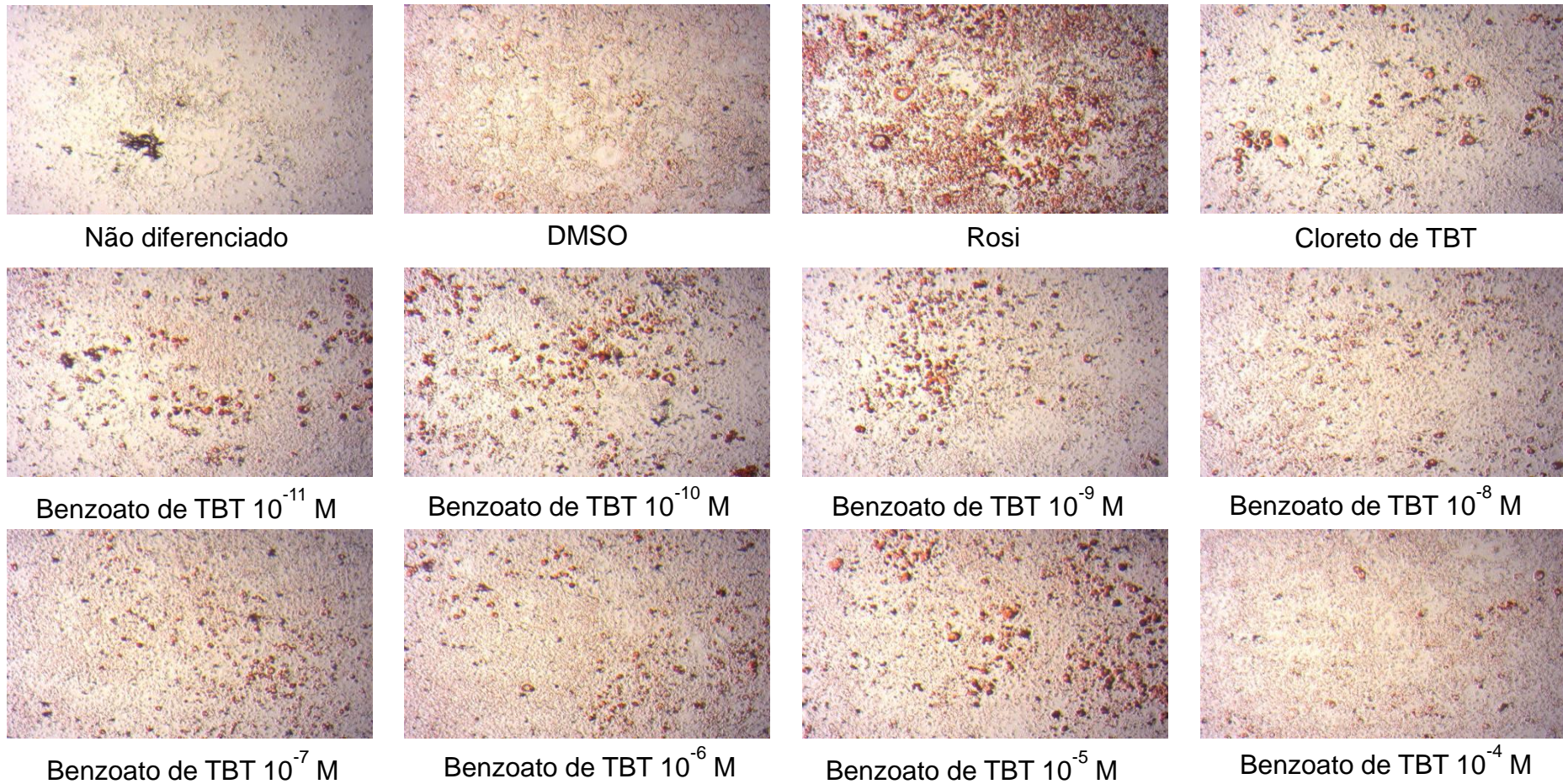
independentes realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  dexametasona vs DMSO, por análise de variância (ANOVA) seguida de Newman-Keuls.

#### 4.5 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO APRESENTAM ATIVIDADE ADIPOGÊNICA FRACA EM PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1

O PPAR $\gamma$  é um regulador chave da adipogênese e essencial quando se trata do desenvolvimento da obesidade (JANESICK E BLUMBERG, 2011; MALONEY E WAXMAN, 1999), já que atua promovendo a expressão de genes envolvidos na diferenciação de adipócitos e também na regulação da função de adipócitos maduros (TONTONNOZ, HU, SPIEGELMAN, 1994).

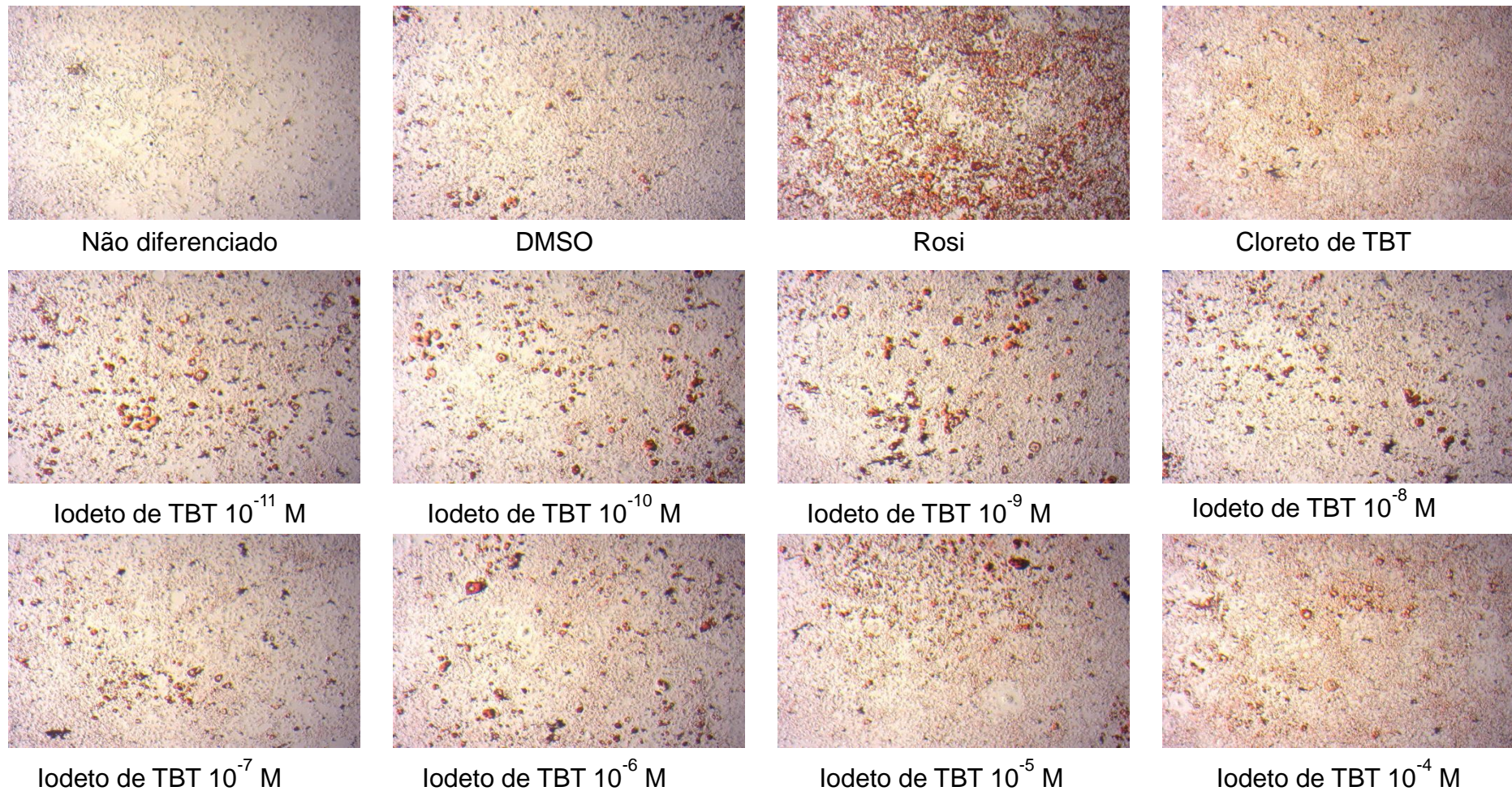
Considerando a capacidade dos TBT testados em ativar o PPAR $\gamma$ , ainda que com eficácia reduzida quando comparados ao agonista completo rosiglitazona, foi realizado ensaio de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 visando avaliar o efeito destes compostos em um contexto biológico. Para este ensaio foi utilizado o protocolo de indução da diferenciação apenas com insulina, uma vez que em ensaio piloto foi constatado que a utilização do meio de indução completo (IMXB, dexametasona e insulina), por representar um potente estímulo indutor de diferenciação adipocitária em cultura (MUELLER et al., 2002), diferenciava as células a tal ponto que não permitiu a observação de diferenças, por meio da determinação do acúmulo lipídico intracelular pelo corante óleo vermelho O, entre células tratadas com o meio de indução e veículo e células tratadas com o meio de indução e a rosiglitazona.

Primeiramente, foi realizado um ensaio em que os pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos a se diferenciar em meio DMEM contendo insulina a 10  $\mu\text{g/mL}$  e mantidas em meio DMEM contendo insulina a 5  $\mu\text{g/mL}$ . Durante todo o período de diferenciação, as células foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona ( $10^{-5}$  M) ou os DE ( $10^{-14}$  M a  $10^{-7}$  M), em placas de 12 poços. Ao final dos 10 dias, a diferenciação foi avaliada pela coloração com óleo vermelho O. Tanto o benzoato de TBT (Figura 11) quanto o iodeto de TBT (Figura 12) induziram a diferenciação dos adipócitos de forma não linear (não concentração-resposta), uma característica conhecida dos desreguladores endócrinos.



**Figura 11:** Efeito do benzoato de TBT sobre a adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 em ensaio piloto. As células foram cultivadas até atingirem 100% de confluência. Dois dias depois, foram induzidas a se diferenciar com insulina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e depois mantidas com insulina de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  até o 10<sup>o</sup> dia. Durante o período de diferenciação, as células foram tratadas com o controle negativo (DMSO), controle positivo (Rosi), cloreto de TBT ( $10^{-7}$  M) ou com o benzoato de TBT em concentrações de  $10^{-14}$  M a  $10^{-7}$  M. Posteriormente, foram fixadas e coradas com óleo vermelho O e as imagens foram fotodocumentadas no aumento de 10x. Imagens representativas de três experimentos realizados de forma independente.



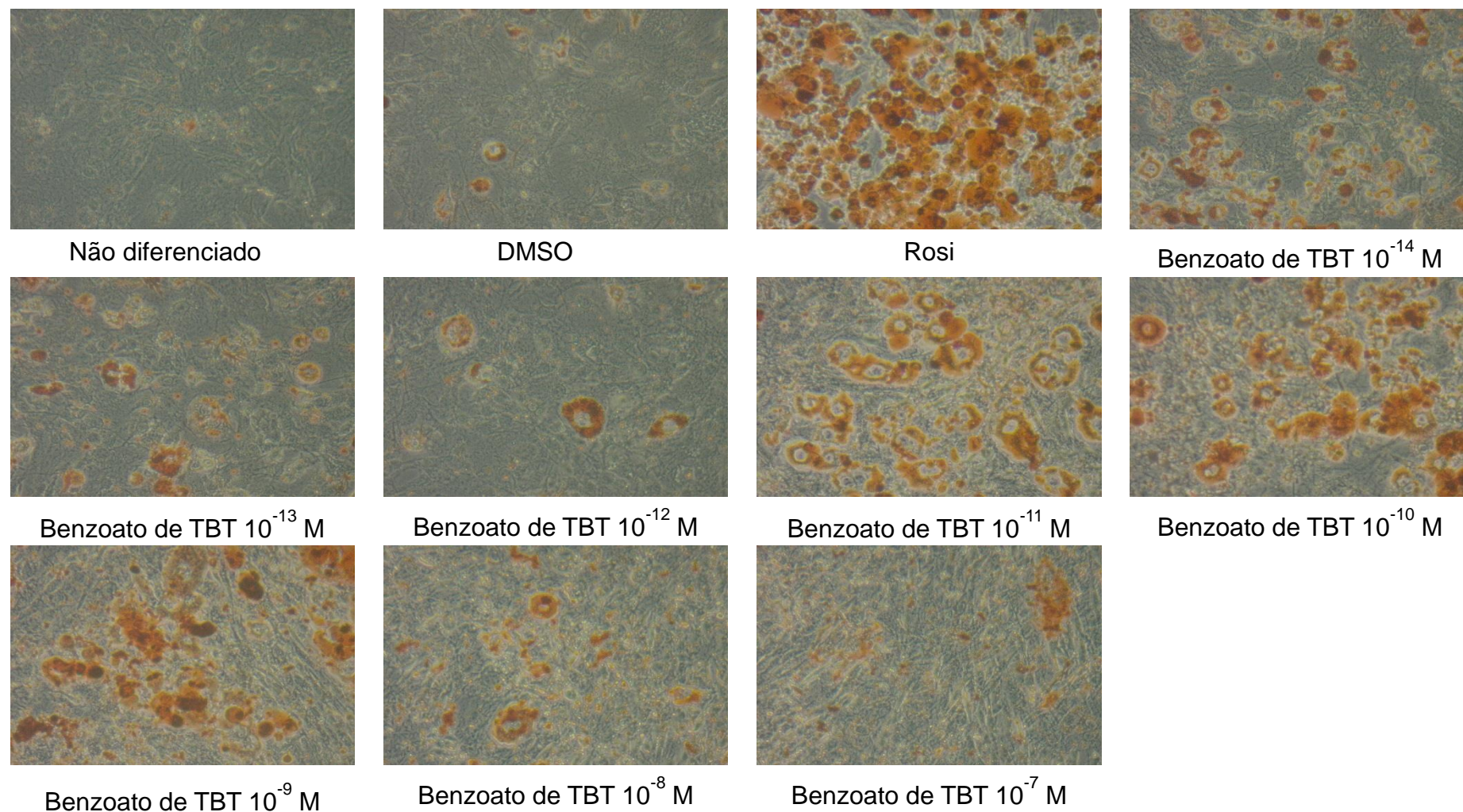


**Figura 12:** Efeito do iodeto de TBT sobre a adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 em ensaio piloto. As células foram cultivadas até atingirem 100% de confluência, dois dias após as células foram induzidas a se diferenciar com insulina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e depois mantidas com insulina de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  até o 10<sup>o</sup> dia. Durante o período de diferenciação, as células foram tratadas com o controle negativo (DMSO), controle e positivo (Rosi), cloreto de TBT ( $10^{-7}$  M) ou com o iodeto de TBT em concentrações de  $10^{-14}$  M a  $10^{-7}$  M, posteriormente foram coradas com óleo vermelho O e fotodocumentadas no aumento de 10x. Imagens representativas de três experimentos realizados de forma independente.

Os resultados do primeiro ensaio de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 não indicaram relação linear entre a concentração do benzoato ou iodeto de TBT e a indução da adipogênese. Desta forma, o ensaio foi repetido, com a utilização do mesmo protocolo descrito anteriormente, para a avaliação da adipogênese por meio de expressão do RNAm da FABP-A, utilizando todas as concentrações dos DE testadas no ensaio piloto. Ao final de 10 dias, um grupo de células foi corado com óleo vermelho O e o outro grupo foi submetido a extração do RNA total para avaliação da expressão do RNAm do gene *Fabpa* e do gene referência *Gapdh* por PCR quantitativa em tempo real.

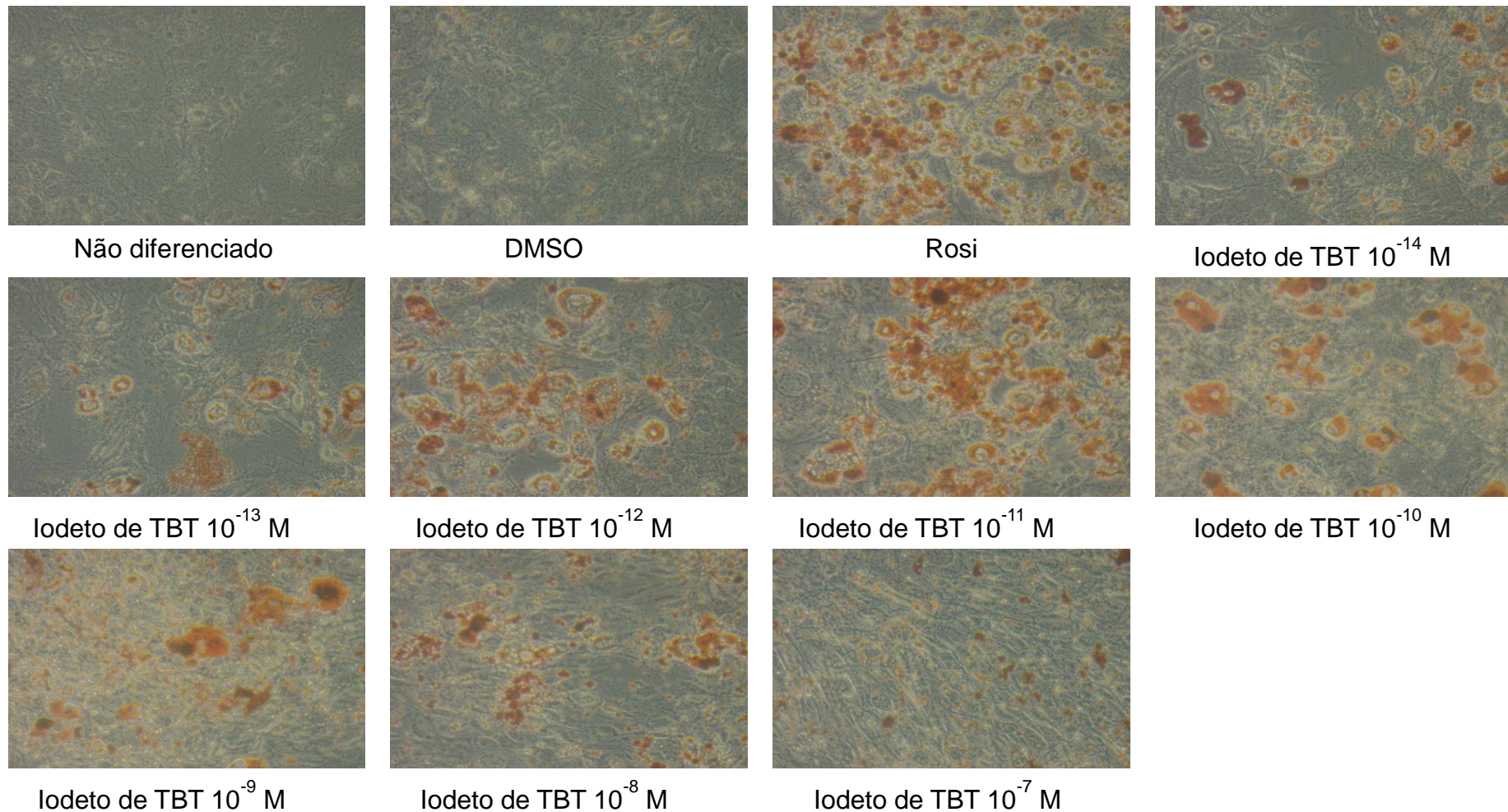
Foi confirmado que o benzoato de TBT (Figura 13) e o iodeto de TBT (Figura 14) induziram a diferenciação dos adipócitos, constatada pela visualização de um maior acúmulo lipídico, quando comparados ao controle negativo (DMSO).





**Figura 13.** Efeito do benzoato de TBT sobre a adipogênese em células 3T3-L1. Dois dias após 100% de confluência, células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciarem em adipócitos com 10 µg/mL de insulina por quatro dias e depois mantidas com meio de manutenção com insulina 5 µg/mL. Durante o período de cultivo, foram tratadas com o veículo (DMSO), controle positivo (Rosi) ou benzoato de TBT nas concentrações de  $10^{-14}$  M a  $10^{-7}$  M. Em seguida, foram coradas com óleo vermelho O e fotografadas (aumento de 20X). Imagem representativa de 3 experimentos realizados de forma independente.





**Figura 14.** Efeito do iodeto de TBT sobre a adipogênese em células 3T3-L1. Dois dias após 100% de confluência, células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciarem em adipócitos com  $10\mu\text{g/mL}$  de insulina por quatro dias e depois mantidas com meio de manutenção com insulina  $5\mu\text{g/mL}$ . Durante o período de cultivo, foram tratadas com o controle positivo (Rosi), iodeto de TBT nas concentrações de  $10^{-14}$  M a  $10^{-7}$  M, ou DMSO (controle negativo) e em seguida, foram coradas com óleo vermelho O e fotografadas em microscopia (aumento de 20X). Imagem representativa de três experimentos realizados de forma independente.

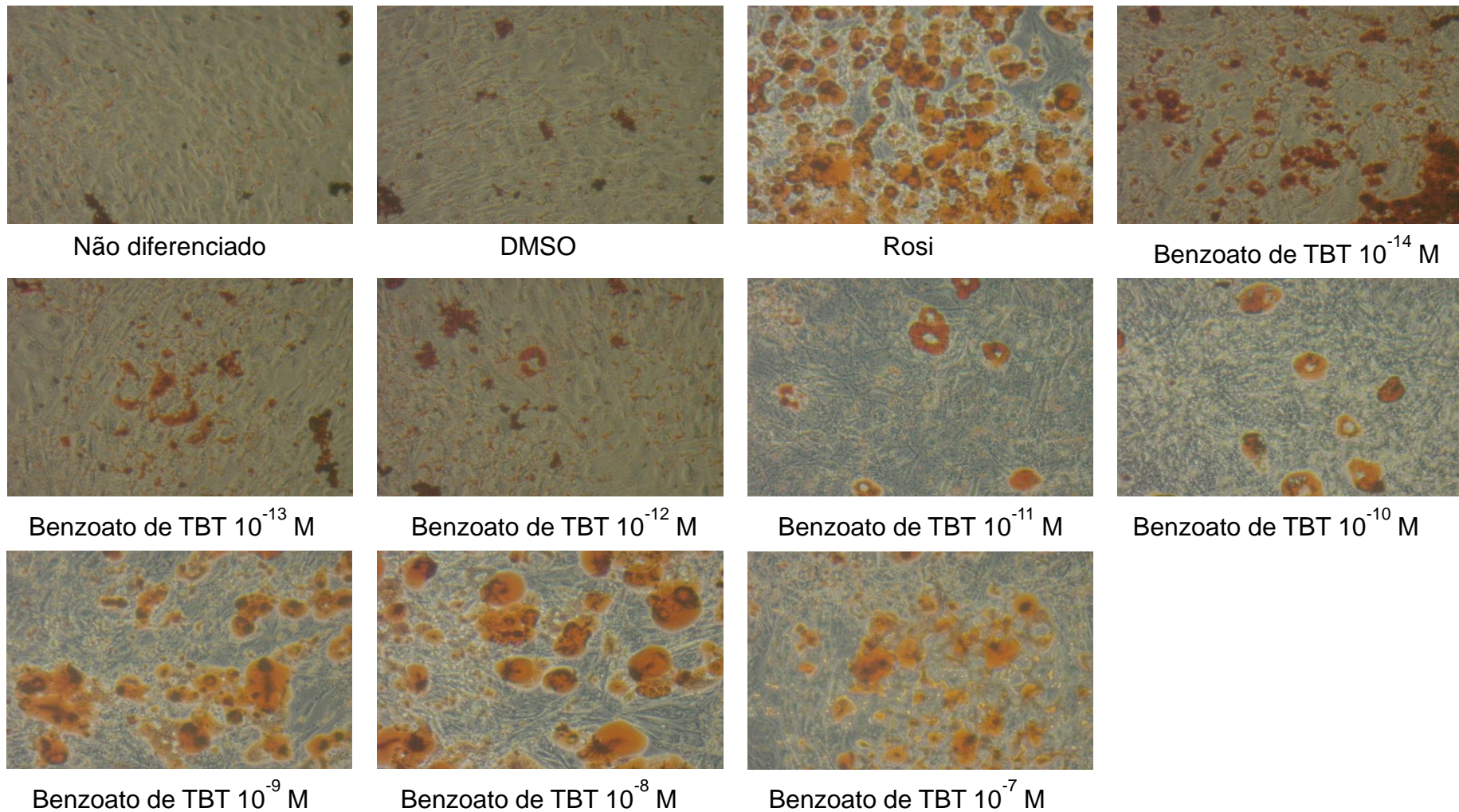
#### 4.6 O BENZOATO E O IODETO DE TRIBUTILESTANHO APRESENTAM ATIVIDADE ADIPOGÊNICA FRACA EM CÉLULAS MESENQUIMAIS C3H10T1/2

Após avaliar o efeito adipogênico do benzoato e iodeto de TBT em um tipo celular que possui comprometimento com a diferenciação de adipócitos (os pré-adipócitos 3T3-L1), foi investigada a capacidade adipogênica destes compostos em células mesenquimais murinas C3H10T1/2. Esta linhagem celular apresenta capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares, mas quando estimuladas adequadamente se tornam comprometidas restritamente à linhagem celular dos adipócitos (TANG E LANE, 2012). Esse modelo permitiu, assim, elucidar se os compostos testados são capazes de mudar o curso da maturação celular.

As células C3H10T1/2 foram induzidas a diferenciar-se em adipócitos com a exposição à combinação IMBX, dexametasona e insulina. Nesse protocolo, as células foram induzidas com o meio completo por 4 dias e posteriormente foram mantidas em DMEM com insulina 1µg/mL durante mais 6 dias. Durante todo o período as células foram tratadas com controle positivo (Rosi), controle negativo (DMSO) ou com diferentes concentrações os compostos benzoato ou iodeto de TBT. Ao final do período de diferenciação, foram coradas com o óleo vermelho O ou submetidas a extração do RNA total para avaliação da adipogênese.

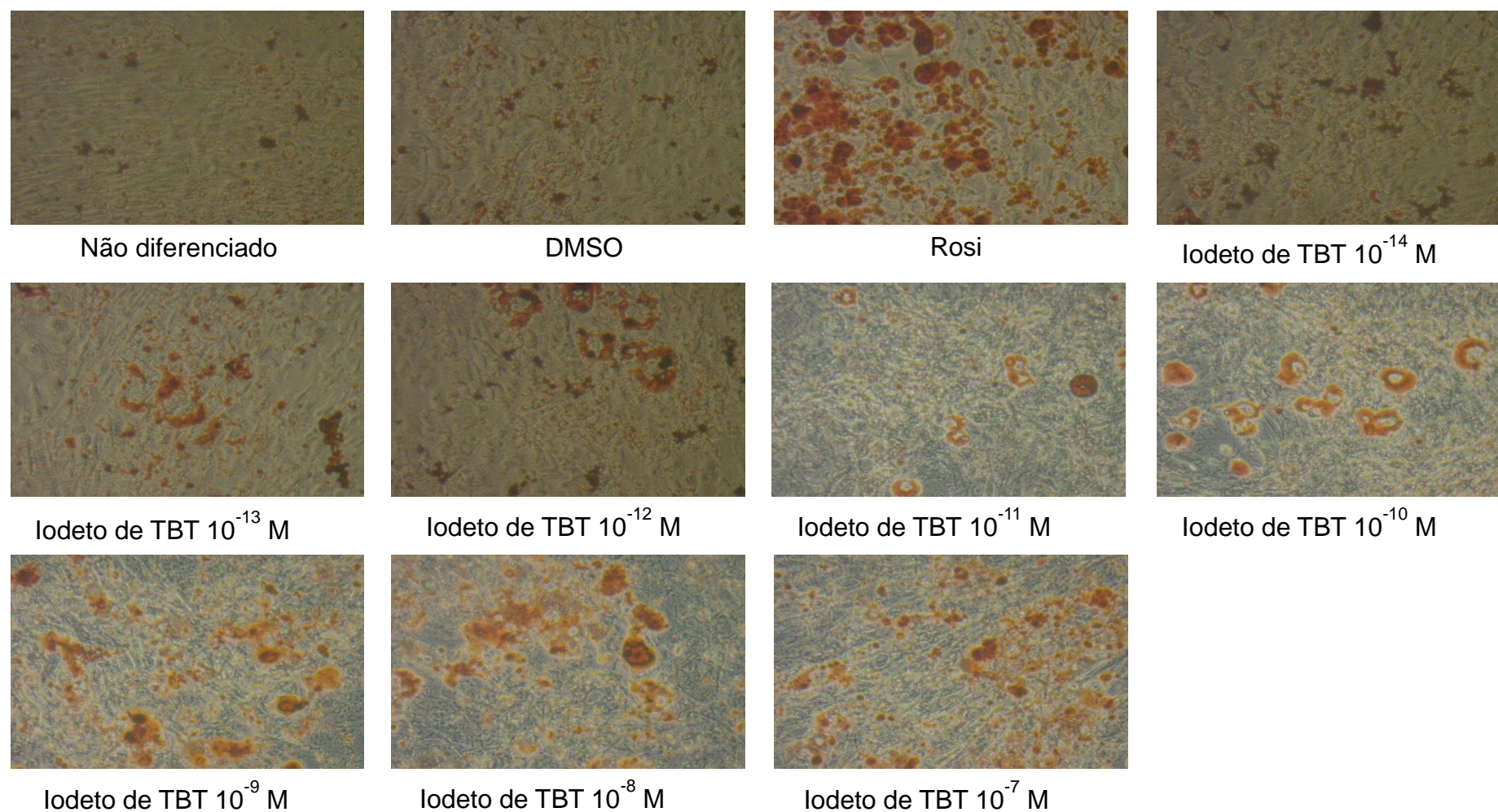
Observou que o benzoato de TBT (Figura 15) e o iodeto de TBT (Figura 16) induziram a diferenciação de células mesenquimais murinas C3H10T1/2, determinada por maior acúmulo lipídico nos adipócitos quando comparadas às células tratadas com o controle negativo (DMSO).





**Figura 15.** Efeito do benzoato de TBT sobre a adipogênese em células mesenquimais C3H10T1/2. Dois dias após a confluência, células C3H10T1/2 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com o meio completo contendo IMBX, insulina e dexametasona por quatro dias e depois mantidas com meio de manutenção com insulina  $1\mu\text{g/mL}$  durante 6 dias. Durante o período de cultivo, foram tratadas com o veículo (DMSO), controle positivo (Rosi) ou benzoato de TBT nas concentrações de  $10^{-14}$  M a  $10^{-7}$  M. Em seguida, foram coradas com o óleo vermelho O para determinação do acúmulo lipídico intracelular e fotografadas em microscopia (aumento de 20X). Imagens representativas de três experimentos realizados de forma independente.

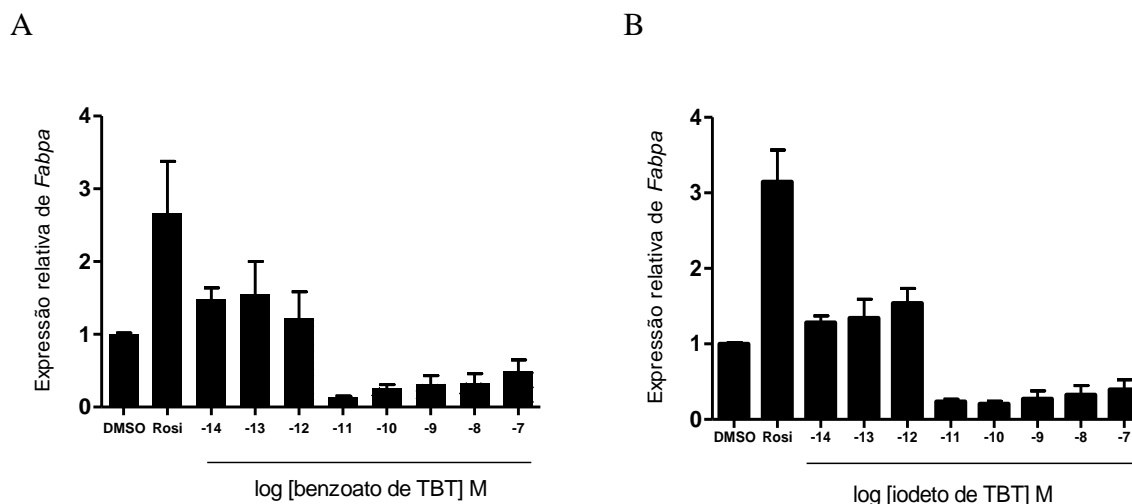




**Figura 16.** Efeito do iodeto de TBT sobre a adipogênese em células mesenquimais C3H10T1/2. Dois dias a confluência, células C3H10T1/2 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com o meio completo contendo IMBX, insulina e dexametasona por quatro dias e depois mantidas com meio de manutenção com insulina 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 6 dias. Durante o período de cultivo, foram tratadas com o veículo (DMSO), controle positivo (Rosi) ou iodeto de TBT nas concentrações de  $10^{-14}$  M a  $10^{-7}$  M. Em seguida foram coradas com óleo vermelho O para determinação do acúmulo lipídico intracelular e fotografadas em microscopia (aumento de 20X). Imagens representativas de três experimentos realizados de forma independente.

#### 4.7 EFEITO DO BENZOATO DE TRIBUTILESTANHO E DO IODETO DE TRIBUTILESTANHO SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA LIGADORA DE ÁCIDOS GRAXOS ADIPOCITÁRIA

Ao final da diferenciação foi realizada a extração do mRNA e realizada a avaliação da expressão do gene que codifica a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária, a (*Fabpa*). Nas células 3T3-L1 induzidas a se diferenciar em adipócitos, ao final de 10 dias, foi possível observar um aumento da expressão da *Fabpa*, nas menores concentrações dos DEs testados, quando comparadas às células tratadas com o controle negativo (DMSO), como apresentado na Figura 17. Foi possível observar, ainda, tendência de redução da indução da expressão da *Fabpa* nas maiores concentrações do benzoato de TBT (Figura 17A) e o iodeto de TBT (Figura 17 B) aumentava.

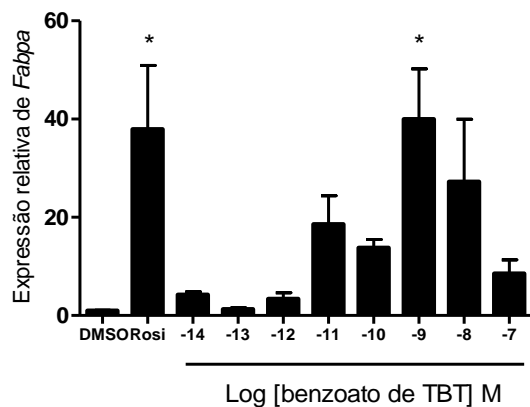


**Figura 17.** O benzoato de TBT e o iodeto de TBT induzem a expressão de *Fabpa* em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar em adipócitos e tratados com baixas concentrações destes organoestânicos. Células 3T3-L1 induzidas, dois dias após a confluência, a se diferenciar em adipócitos com IBMX, dexametasona e insulina e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (rosi  $10^{-6}$ ) ou concentrações crescentes de benzoato (A) ou iodeto (B) de TBT durante 10 dias e, em seguida, avaliadas quanto à expressão relativa de *Fabpa*, utilizando como gene referência o que codifica a *Gapdh*. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes e por análise de variância de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

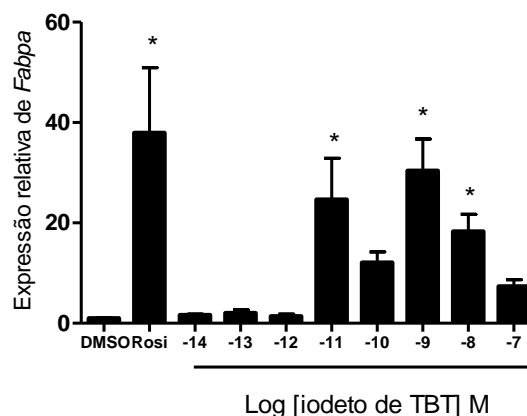
A análise da expressão de *Fabpa* também foi realizada para as células C3H10T1/2 induzidas a se diferenciar em adipócitos na presença de benzoato ou iodeto de TBT. Neste

tipo celular foi possível identificar uma discreta tendência de indução da expressão de *Fapba*, principalmente nas concentrações mais elevadas de benzoato de TBT (Figura 18 A) quanto para o iodeto de TBT (Figura 18 B) quando comparadas com as células tratadas com o controle negativo (DMSO).

A



B



**Figura 18.** O benzoato de TBT e o iodeto de TBT induzem a expressão de *Fapba* em células mesenquimais C3H10T1/2 induzidas a se diferenciar em adipócitos e tratadas com concentrações mais elevadas destes organoestânicos. Células C3H10T1/2 induzidas, dois dias após a confluência, a se diferenciar em adipócitos com IBMX, dexametasona e insulina e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (rosi  $10^{-6}$ ) ou concentrações crescentes de benzoato (A) ou iodeto (B) de TBT durante 10 dias e, em seguida, avaliadas quanto à expressão relativa de *Fapba*, utilizando como gene referência o que codifica a *Gapdh*. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$ , rosi, benzoato e iodeto de TBT vs DMSO, por análise de variância de Kruskal-Wallis seguindo pelo teste de Dunn.

## 5 DISCUSSÃO

A obesidade, definida como aumento da quantidade de tecido adiposo, tem como mecanismo fisiopatológico central o desequilíbrio crônico entre ingestão calórica e o gasto energético. Sua incidência e prevalência aumentaram, em todo o mundo, em curto prazo, o que tornou essa condição motivo de grande preocupação. Estão envolvidos neste processo o equilíbrio energético, fatores biológicos, genéticos, comportamentais e ambientais (GRÜN E BLUMBERG, 2007).

A elevação das taxas de obesidade foi precedida pelo aumento exponencial da produção de substâncias químicas sintéticas (BAILLIE-HAMILTON, 2002), muitas delas caracterizadas hoje como substâncias obesogênicas, capazes de desencadear a obesidade por promoverem o aumento do número de células adiposas e/ou armazenamento de lipídeos nos adipócitos já existentes. Por modularem o metabolismo lipídico e o processo adipogênico, são capazes de promover a obesidade, o diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, dentre outras associadas à síndrome metabólica (JANESICK E BLUMBERG, 2012. A).

Os compostos organoestânicos têm sido vastamente utilizados como fungicidas agrícolas, repelentes de roedores, molusquicidas e principalmente como anti-incrustantes em tintas para navios de rede e de pesca (PIVER, 1973). O uso generalizado implicou na grande concentração dos organoestânicos no meio ambiente e, embora a toxicidade destes compostos já tenha sido descrita (BOYER, 1989), muitos compostos organoestânicos ainda não têm ainda seus alvos moleculares definidos.

O cloreto de TBT, usado como controle positivo em alguns ensaios deste trabalho, é um organoestânico que apresenta ação agonista em PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$ , caracterizada em ensaios de gene repórter e por meio da indução da expressão de genes alvo do PPAR $\gamma$ - RXR $\alpha$  (KANAYAMA et al., 2005; JANESICK E BLUMBERG, 2012; GRÜN et al., 2006). Já foi descrito, também, que o cloreto de TBT influencia a sinalização dos glicocorticoides por meio da inibição da atividade enzimática da 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ HSD2), ocasionando o aumento das concentrações circulantes de cortisol (ATANASOV et al., 2005), porém sem efeito direto sobre a transcrição mediada pelo GR (PEREIRA-FERNANDES et al., 2013). No entanto, muitos membros da família dos organoestânicos ainda não foram investigados quanto ao seu potencial de influenciar a sinalização pelos RN.

Para avaliar a capacidade adipogênica dos compostos de estanho, benzoato de TBT e iodeto de TBT, foram selecionados os receptores PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  e GR $\alpha$ . Estes membros da

superfamília de RN, ou fatores de transcrição ativados por ligantes, são altamente essenciais ao processo adipogênico bem como na homeostase energética de adipócitos maduros (GREGOIRE, SMAS E SUL, 1998).

O regulador central do processo adipogênico é o PPAR $\gamma$ , abundantemente expresso nos adipócitos, que associa-se ao RXR $\alpha$  para formar heterodímeros que regulam diretamente a expressão de genes em nível transcricional (TONTONNOZ, HU E, SPIEGELMAN, 1994) e, assim, apresentam papel essencial em praticamente todos os processos da biologia do adipócito (TONTONNOZ E SPIEGELMAN, 2008). Estes receptores já foram descritos por Grün e colaboradores (2006) como alvo dos compostos organoestênicos. Os ligantes deste receptor são capazes de induzir a conversão eficiente de células fibroblásticas em adipócitos e isso pode ser observado pela indução de genes específicos de adipócitos maduros e relacionados ao acúmulo de lipídeos (LEHMANN et al., 1995).

O GR $\alpha$  também foi investigado neste estudo porque seus agonistas, os glicocorticoides, afetam quase todos os aspectos da biologia do tecido adiposo, sendo necessários para a diferenciação completa de precursores do tecido adiposo e para a manutenção de genes chave do metabolismo lipídico e da glicose em adipócitos em cultura ou no tecido adiposo (PECKETT, WRIGHT E RIDDELL, 2011; GATHERCOLE et al., 2011). O GR $\alpha$  é altamente expresso no tecido adiposo e tem seus níveis ainda mais aumentados com a diferenciação, sendo relevante tanto na adipogênese quanto na regulação da expressão da leptina, adiponectina e interleucina 5 em adipócitos humanos (HIRATA et al., 2012; CAPRIO et al., 2007; LEE E FRIED, 2014).

A sinalização pelos glicocorticoides também é implicada no desenvolvimento da obesidade. Foi descrito que alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que conduzem a um excesso da produção de cortisol e, assim, a maior sinalização do receptor de glicocorticoide, têm sido implicados como fatores que podem desencadear o desenvolvimento da obesidade (ODERMATT et al., 2006).

Para investigar a atividade do benzoato e iodeto de TBT no PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  e GR $\alpha$ , primeiramente foi realizado o ensaio de viabilidade celular em células HeLa a fim de determinar quais seriam as concentrações utilizadas no ensaio de gene repórter. Assim, foi definida a faixa de concentração de  $10^{-7}$  M a  $10^{-11}$  M, já que concentrações maiores que  $10^{-7}$  M resultavam em viabilidade celular menor que 70%. Estes achados foram semelhantes aos estudos prévios com o cloreto de TBT, usado como controle positivo neste estudo, em que foi

descrita a concentração máxima utilizada de  $10^{-7}$  M (KANAYAMA et al., 2005; PEREIRA-FERNANDES et al., 2013; GRÜN et al., 2006)

No ensaio de gene repórter observamos que tanto o benzoato quanto o iodeto de TBT apresentaram capacidade de ativação do PPAR $\gamma$  de forma menos intensa que o agonista utilizado como controle positivo, a rosiglitazona, mas comparável ao cloreto de TBT, um membro da família dos organoestênicos já descrito como agonista parcial de PPAR $\gamma$  (KANAYAMA et al., 2005) e que induz a transcrição do receptor a partir da concentração entre  $10^{-8}$  M a  $10^{-7}$  M (GRÜN et al., 2006), semelhante aos compostos testados. O benzoato e iodeto de TBT também apresentam atividade agonista no RXR $\alpha$  na maior concentração testada, que não comprometeu a viabilidade das células HeLa. Sua atividade foi comparável à do controle positivo, o agonista total RXR $\alpha$  ácido 9-cis-retinoico, e também à do cloreto de TBT, já descrito como agonista do receptor (BRTKO E DVORAK, 2015). Não foi, contudo, realizada curva concentração-resposta do ácido 9-cis-retinoico em RXR $\alpha$  para que fossem comparadas sua potência e eficácia de ativação do receptor às dos TBTs testados.

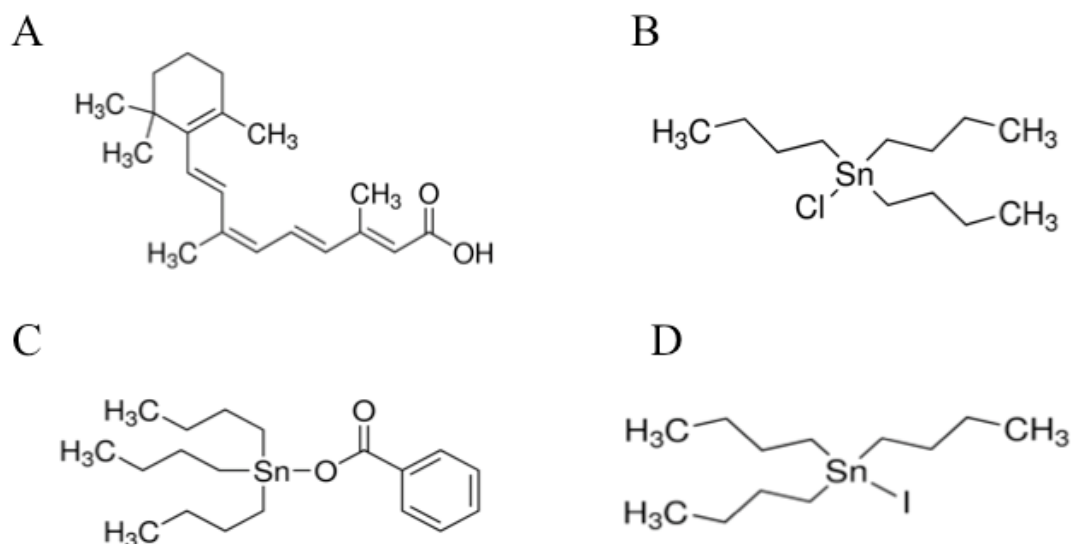
A atividade desempenhada no PPAR $\gamma$  e no RXR $\alpha$ , pelos dois compostos testados, foi considerada de agonista parcial e total, respectivamente. Ainda que a base molecular da atividade agonista parcial de ligantes de RN não esteja bem definida, é possível que seja resultado de diferente conformação do receptor em relação à desencadeada pelo agonista total, ou ainda de outros mecanismos, não definidos, mas relacionados à célula e ao promotor gênico (MCDONNELL et al., 1995).

O cloreto de TBT tem parte da sua ação desreguladora do sistema endócrino mediada pela via de sinalização RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$ . Curiosamente, os organoestênicos não possuem semelhança estrutural e nem química com ligantes conhecidos de ambos os receptores, os retinoides ou as tiazolidinodionas, respectivamente (MICHALIK et al., 2006). Em 2009, Le Maire e colaboradores mostraram que o cloreto de TBT ativava os heterodímeros RXR $\alpha$ /PPAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ /PPAR $\delta$  e RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  e, por meio de análise cristalográfica, demonstraram que o cloreto de TBT se liga ao RXR $\alpha$ . Os autores sugeriram, desta forma, que a ativação do heterodímero RXR $\alpha$ /PPAR ocorre por meio da ação agonista do cloreto de TBT no RXR $\alpha$ .

Os ensaios de gene repórter indicaram, como mencionado anteriormente, que o benzoato e iodeto de TBT atuaram como agonista total de RXR $\alpha$  e parcial de PPAR $\gamma$ . Os agonistas dos RN são classificados como agonistas totais ou parciais, indicada pela atividade desempenhada na atividade transcricional do receptor. A atividade agonista total ou parcial é

resultado das diferentes conformações adotadas pelo domínio de ligação ao ligante do receptor. Uma das diferenças é a capacidade de estabilizar a hélice 12 (H12); agonistas totais estabilizam diretamente a H12 permitindo a ligação do coativador ao receptor, e os agonistas parciais atuam sem contato direto com a H12 (GERMAIN et al., 2006). Esta classificação fornece meios para a distinção da atividade do composto organoestânico cloreto de TBT, que faz interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de Ile341, Val 339, localizadas na H3, e não com a H12, o que é compatível com ação agonista limitada ou parcial (LE MAIRE et al., 2009).

A atividade agonista em PPAR $\gamma$  apresentada pelo benzoato e o iodeto de TBT era esperada em razão de sua semelhança estrutural com o cloreto de TBT, caracterizado previamente como agonista parcial do receptor (GRÜN et al., 2006), e das características do bolso de ligação aos ligantes do PPAR $\gamma$ , capaz de acomodar compostos de estruturas diversas (MALONEY E WAXMAN, 1999). O RXR $\alpha$ , no entanto, apresenta bolso de ligação ao ligante menor e mais restritivo (GERMAIN et al., 2006), de modo que a sua ativação pelo benzoato e iodeto de TBT, estruturalmente bastante diferentes do ácido 9-cis-retinoico, e com algumas diferenças em relação ao cloreto de TBT (Figura 19), não eram diretamente previsíveis. Estudos para caracterizar o benzoato e o iodeto de TBT como ligantes do PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$ , como análises cristalográficas, são necessários, uma vez que essa característica não pode ser definida pelo ensaio de gene repórter.



**Figura 19.** (A) Estrutura química do ácido 9-cis retinóico; (B) cloreto, (C) benzoato e (D) iodeto de TBT. Fonte: Pubchem .



As consequências biológicas da ativação da via de sinalização de RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  pelos organoestânicos são inferidas pelo seu papel fundamental na diferenciação de adipócitos e armazenamento de energia (AUWERX, 1999). A ativação de PPAR $\gamma$  resulta na elevação da expressão de genes relacionados a promoção do armazenamento de ácidos graxos e repressão de genes relacionados à indução de lipólise em adipócitos. A ativação do RXR por ligantes com atividade agonista, por sua vez, aumenta a sensibilização à insulina, de forma que a ativação do heterodímero permissivo RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  pode influenciar mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do DM2 e da obesidade (GRÜN et al., 2006).

Outro RN com efeito importante sobre a diferenciação e função adipocitária e sobre a homeostase energética é o GR. Os compostos testados, benzoato e iodeto de TBT, não apresentaram atividade agonista no GR $\alpha$ . Entretanto, já foram descritos outros mecanismos pelos quais podem influenciar a sinalização pelos glicocorticoides, que incluem a inibição da atividade da 11 $\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase-2, pelo cloreto de TBT em concentrações nanomolares. Esta enzima, fisiologicamente, inativa o cortisol, de forma que sua inibição resulta em aumento das concentrações circulantes de cortisol. O aumento das concentrações circulantes de cortisol, refletidos em aumento de sua concentração no tecido adiposo, poderiam, por sua vez, influenciar etapas finais da diferenciação dos adipócitos e a regulação do metabolismo energético (DRAPER E STEWART, 2005). Além disso, o cloreto de TBT inibe a atividade da enzima aromatase, que converte testosterona em estrogênio, diretamente no tecido adiposo, o que resulta em redução das concentrações de estradiol e, assim, subregulação de genes alvo em ER (GRÜN E BLUMBERG, 2006). Apesar do conhecimento da existência destes mecanismos, neste trabalho não foram realizados ensaios para a investigação de outros aspectos da sinalização pelos glicocorticoides e sua influência sobre a adipogênese.

Um dos DE cujos mecanismos de ação obesogênica são mais bem compreendidos é o cloreto de TBT. A exposição a este composto resulta em aumento da diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 (GRÜN et al., 2006) e de células mesenquimais estromais multipotentes (CARFI et al., 2008) em adipócitos. Neste estudo, foi investigado o potencial adipogênico de compostos relacionados ao cloreto de TBT, o benzoato e iodeto de TBT, por meio da avaliação de seu potencial de induzir a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e de células mesenquimais C3H10T1/2 em adipócitos.

As células 3T3-L1, originadas do camundongo Swiss, são uma linhagem que apresenta comprometimento com a diferenciação adipocitária e, por isso, recebem a denominação de pré-adipócito (GREEN E MEUTH, 1974), e representam o primeiro e melhor modelo para o estudo da adipogênese. No entanto, com o intuito de explorar melhor a capacidade dos DEs testados de induzir diferenciação adipocitária, incluímos neste trabalho a linhagem celular C3H10T1/2, isolada dos camundongos C3H. Estas são células tronco mesenquimais, não comprometidas com a diferenciação adipocitária, mas capazes de se diferenciar, se devidamente induzidas, em adipócitos maduros (OTTO E LANE, 2005).

Os pré-adipócitos 3T3-L1 são classicamente induzidos a se diferenciar em adipócitos pelo tratamento com um inibidor de fosfodiesterase (IMBX), dexametasona e insulina. Neste estudo, a indução da diferenciação desta linhagem pré-adipocitária foi conduzida com um meio incompleto, contendo apenas insulina que, mesmo isoladamente, atua aumentando o desenvolvimento eficiente dos adipócitos (KANAYAMA et al., 2005). O objetivo da indução apenas com insulina foi de estimular estas células, já comprometidas com a diferenciação adipocitária, de forma menos potente, quando comparada ao estímulo com IMBX, dexametasona e insulina e, assim, facilitar a identificação de eventual atividade adipogênica menos acentuada que a do estímulo completo à indução.

A linhagem celular C3H10T1/2, não comprometida com a diferenciação adipocitária, foi induzida a se diferenciar com o meio completo (IMBX, dexametasona e insulina). Cada um destes componentes apresenta papel específico na cascata de diferenciação dos adipócitos. A IMBX atua inibindo as fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos e, assim, aumenta os níveis intracelulares de AMPc que, por sua vez, ativa a expressão do fator de transcrição C/EBP $\delta$ . A dexametasona induz a expressão do fator de transcrição C/EBP $\beta$ . O C/EBP $\delta$  e o C/EBP $\beta$  induzem a transcrição do C/EBP $\alpha$  e do PPAR $\gamma$ . A insulina auxilia a diferenciação dos adipócitos por ativar a expressão de genes característicos do adipócito maduro, como os que codificam a sintase de ácidos graxos, a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária (*fabpa*), a leptina e a adiponectina (ROSEN et al., 2000).

Grün e colaboradores (2006) mostraram que o cloreto de TBT induz a diferenciação da linhagem pré-adipocitária 3T3-L1 em adipócitos nas concentrações de 10 a 100 nmol/L, as duas únicas concentrações testadas pelos autores por terem sido as concentrações que induziram atividade transcricional do PPAR $\gamma$ . Já é sabido que os DE não seguem uma linha tradicional de ação concentração-dependente, e há casos em que concentrações menores podem induzir respostas mais potentes que concentrações mais elevadas (VOM SAAL et al.,

2007). Assim, no presente estudo, foi testado o efeito de uma ampla faixa de concentração do benzoato e iodeto de TBT no ensaio de diferenciação de adipócitos, desde  $10^{-14}$  M, ainda que estas concentrações não tivessem sido testadas no ensaio de gene repórter. Observamos indução da diferenciação em ambos os tipos celulares, 3T3-L1 e C3H10T1/2, desde a menor concentração testada, confirmada pelo aumento do acúmulo lipídico intracelular, determinado pela coloração com o óleo vermelho O.

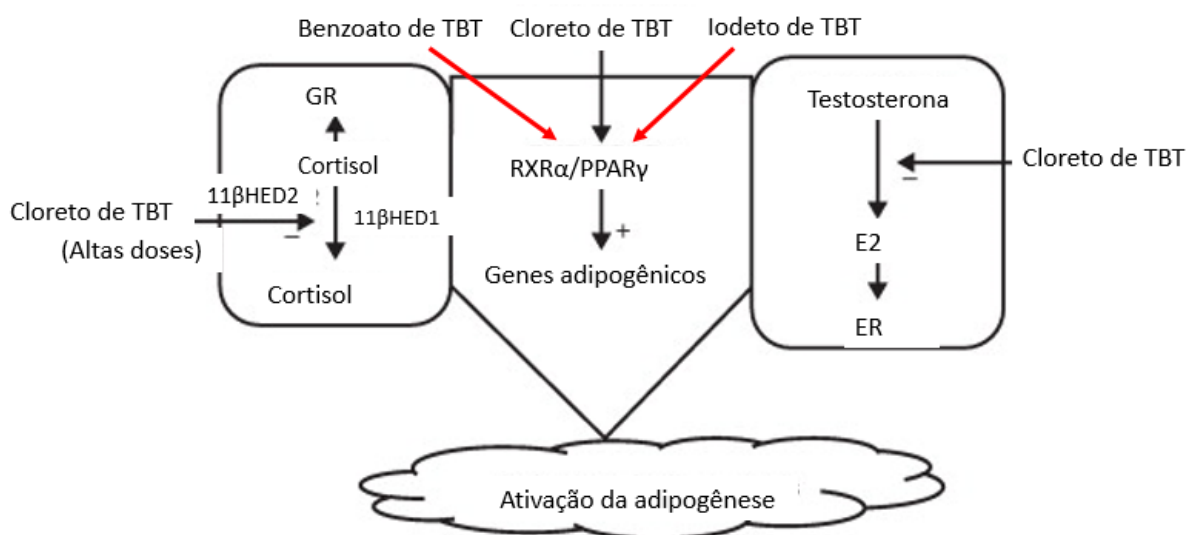
A adipogênese em resposta ao tratamento com benzoato e iodeto de TBT também foi avaliada pela expressão do RNAm do gene que codifica a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária, um gene alvo do PPAR $\gamma$  e cuja expressão é considerada marcador do adipócito maduro (EVANS, BARISH E WANG, 2004). Nas células 3T3-L1 observamos, ao final do período de diferenciação (10 dias), tendência indução discreta de sua expressão nas células tratadas com a menor concentração dos compostos testados ( $10^{-14}$  M a  $10^{-12}$  M), e redução nas células tratadas com as maiores concentrações, em comparação com as células induzidas a se diferenciar em adipócito mas tratadas com veículo. Entretanto, estas diferenças não foram significativas. Grün e colaboradores (2006) observaram, também em células 3T3-L1, aumento de cinco e quarenta e cinco vezes da expressão de *Fapba* em resposta ao tratamento com cloreto de TBT durante 24 e 72 horas, respectivamente, após a confluência das células. A diferença do tempo de tratamento entre o estudo de Grün e colaboradores (2006), de 1 e 3 dias, e do presente estudo, de 10 dias, limita a comparação entre seus resultados, uma vez que é possível que a expressão deste transcrito diminua ao longo do processo de diferenciação.

Nas células C3H10T1/2 induzidas a se diferenciar em adipócitos na presença de benzoato ou iodeto de TBT, foi observada tendência de indução da expressão de *Fapba* em todas as concentrações testadas, menos acentuada nas menores concentrações e mais acentuada nas concentrações mais elevadas, em relação às células tratadas com veículo. Entretanto, estas diferenças não foram significativas. Não foram encontrados outros estudos que avaliaram o efeito do cloreto de TBT na diferenciação de células C3H10T1/2, no entanto Carfi e colaboradores (2008) demonstraram que em células de medula óssea houve uma resposta dependente da concentração no tratamento por 14 dias com o cloreto de TBT.

Estudos realizados *in vivo* indicam que o cloreto de TBT, em concentrações semelhantes às encontradas no ambiente, produz efeitos transgeracionais sobre o volume de tecido adiposo branco, altera a programação de células-tronco e promove acúmulo de gordura no fígado em várias gerações de camundongos após a geração exposta. A exposição pré-natal

ao TBT leva, assim, indivíduos a produzir mais células de gordura e aumentar os depósitos de tecido adiposo (KIRCHNER et al., 2010).

Os resultados encontrados neste estudo, em conjunto, fornecem evidências de que os compostos organoestânicos testados, benzoato e iodeto de TBT, são agonistas parciais de PPAR $\gamma$  e agonistas totais de RXR $\alpha$  e, consistentemente com este efeito, atuam como indutores fracos da diferenciação de adipócitos, tanto em células comprometidas com a diferenciação quanto em uma linhagem pluripotente, e adicionam dados aos múltiplos efeitos previamente descritos dos organoestânicos sobre a adipogênese (Figura 20). No entanto, neste estudo não foi demonstrado efeito direto sobre GR $\alpha$  ou ER.



**Figura 20.** Mecanismo de ação dos organoestânicos. Setas vermelhas: dados encontrados no trabalho, E2: estradiol, GR: receptor de glicocorticoide, TBT: tributilestanho, 11 $\beta$ HED: 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase, (+) ativação, (-) inibição. Adaptado de García-Mayor et al., 2012.

Estudos futuros são necessários para detalhar os mecanismos envolvidos no efeito adipogênico do benzoato e iodeto de TBT, incluindo sua caracterização como ligantes de PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$  por meio de ensaios de ligação e análise cristalográfica, seus efeitos sobre diferentes etapas do processo de diferenciação adipocitária ou mesmo em outras vias que influenciam a diferenciação de adipócitos.

Juntos, estes dados fornecem evidências que os compostos testados, benzoato e iodeto de TBT, podem funcionar como indutores da diferenciação de adipócitos, tanto em células comprometidas com a diferenciação, quanto a linhagem pluripotente, sendo necessário a realização de mais estudos para a identificação dos mecanismos envolvidos.

## 6 CONCLUSÃO

Os compostos, benzoato de tributilestanho e iodeto de tributilestanho, reduziram a viabilidade celular das células HeLa em concentrações acima de  $10^{-7}$  M.

O benzoato de tributilestanho e o iodeto de tributilestanho induziram a atividade transcricional dos receptores PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$  atuando como agonistas parciais e totais, respectivamente.

O benzoato de tributilestanho e o iodeto de tributilestanho não induziram a atividade transcricional do GR $\alpha$ .

O benzoato de tributilestanho e o iodeto de tributilestanho apresentam potencial adipogênico em cultura de células mesenquimais murinas C3H10T1/2 induzidas a diferenciar-se com IMBX, insulina e dexametasona e em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 induzidos com insulina.

O benzoato de tributilestanho e o iodeto de tributilestanho induziram a expressão do RNAm do *Fabpa* nas menores concentrações quando testados nos pré-adipócitos 3T3-L1, e nas maiores concentrações quando testados nas células C3H10T1/2.

## REFERÊNCIAS

ABESO. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

**Acid 9-cis retinoic**. Disponível em:<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/99455622#section=2D-Structure>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

ALZIEU C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 258, n. 1-2, p. 99-102, 2000.

ALZIEU, C. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean Coast Manage**, Augustinusga, v. 40, n. 1, p. 23–36, 1998.

ALZIEU, C. et al. Tin contamination in Arcachon Bay—effects on oyster shell anomalies. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 17, n. 11, p. 494-498, 1986.

AMBROSIO, A. L. et al. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 22, n. 25, p. 18625-18633, 2007.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expressions. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, 2001.

ATANASOV, A. G. et al. Organotins disrupt the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2-dependent local inactivation of glucocorticoids. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 113, n. 11, p. 1600–1606, 2005.

AUWERX, J. PPAR $\gamma$  the ultimate thrifty gene. **Diabetologia**, Berlim, v. 42, n. 9, p. 1033-1049, 1999.

AZENHA, M. et al. Estimation of the human intestinal permeability of butyltin species using the Caco-2 cell line model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 1431–1442, 2004.

BAILLIE-HAMILTON, P. F. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, Nova Iorque, v. 8, n. 2, p. 185-192, 2002.

BERGMAN, R. N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Trends in Endocrinology Metabolism**, Nova Iorque, v. 11, n. 9, p.351–356, 2000.

BHOSLE, N. B. et al. Butyltins in water, biofilm, animals and sediments of the west coast of India. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 897–907, 2004.

BIEMANN, R. et al. Tributyltin effects adipogenic cell fate commitment in mesenchymal stem cells by a PPAR $\gamma$  independent mechanism. **Chemico-Biological Interactions**, Konstanz, v. 214, p. 1–9, 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 68, n. 4. p. 701-711, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio\\_vigitel\\_2006\\_marco\\_2007.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_vigitel_2006_marco_2007.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2015.

BRTKO, J.; DVORAK, Z. Triorganotin compounds - ligands for “rexinoid” inducible transcription factors: Biological effects. **Toxicology Letters**, Ireland, v. 234, p. 50-58, 2015.

CALAFAT, A. M.; NEEDHAM, L. L. Human exposures and body burdens of endocrine-disrupting chemicals. In: GORE, A. C. **Endocrine-Disrupting Chemicals**. Nova Iorque: Humana Press, v. 2, p. 253-268, 2007.

CAPPUCCIO, F. P. et al. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. **Sleep**, Nova Iorque, v. 31, n. 5, p. 619–626, 2008.

CAPRIO, M. et al. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 21, n. 9, p. 2185–2194, 2007.



CARFI, M. et al. TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture. **Toxicology**, Amsterdam, v. 249, n. 1, p. 11–18, 2008.

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

CEC - COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Community strategy for endocrine disruptors**: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Brussels: CEC, 1999.

CEULEMANS M.; SLAETS S.; ADAMS F. Speciation of organotin in environmental sediment samples. **Talanta**, Londres, v. 46, n. 3, p. 395- 405, 1998.

CHAMP, M. A. The Status of the Treaty to Ban TBT in Marine Antifouling Paints and Alternatives. 24th UJNR (US/Japan) **Marine Facilities Panel Meeting**. Hawaii, Estados Unidos, 2001.

CHEN, J. Q.; RUSSO, J. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular cell research**, Amsterdam, v. 1793, n. 7, p. 1128–1143, 2009.

COLBORN T.; CLEMENT C. **Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development**: The Wildlife-Human Connection. Nova Jersey: Princeton Scientific Pub, 1992. 403 p.

DALBY, B. et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. **Methods**, Chicago, v. 33, n. 2, p. 95-103, 2004.

DE COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. **Journal of Environmental and Public Health**, Cairo, v. 2012, n. 2012, p. 1-52, 2012.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 20, n. 5, p.649-88, 1999.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et. al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

DRAPER, N.; STEWART, P. M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. **Journal of Endocrinology**, Londres, v. 1, n. 186, p. 251-271, 2005.

EPD. **The Status of the Treaty to Ban TBT in Marine Antifouling Paints and Alternatives**. Disponível em:

<[http://www.epd.gov.hk/eia/register/report/eiareport/eia\\_1262006/eia\\_report/pdf/APP%203C.pdf](http://www.epd.gov.hk/eia/register/report/eiareport/eia_1262006/eia_report/pdf/APP%203C.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2013.

**Estrutura primária e terciária dos receptores nucleares**. Adaptado

de:<<http://www.nptel.ac.in/courses/102103012/module5/lec2/3.htm>>. Acesso em 16 mar. 2015.

EU-SCOOP. **Revised assessment of the risks to health and the environment associated with the use of the four organotin compounds TBT, DBT, DOT and TPT**. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scher/docs/scher\\_o\\_047.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_047.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

EVANS, M.; BARISH, G. D.; WANG, Y.X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, Nova Iorque, v. 10, n. 4, p. 355–361, 2004.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. **Relatório Anual de 2011**. Bruxelas, Bélgica: Federação Internacional de Diabetes, 2012.

FENT, K. Worldwide occurrence of organotins from antifouling paints and effects in the aquatic environment. **The Handbook of Environmental Chemistry**, Barcelona, v. 50, n. 5, p. 71–100, 2006.

FITRIDGE, I. et al. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. **Biofouling**, Londres, v. 28, n. 7, p. 649-669, 2012.

FORMAN, B. M. et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. **Cell**, Cambridge, v. 83, n.5, p. 803-812, 1995.

GARCÍA-MAYOR. R. V. et al. Endocrine disruptors and obesity: obesogens. **Endocrinología y Nutrición**, Barcelona, v. 59, n. 4, p. 261-267, 2012.

GATHERCOLE, L. L. et al. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 10, p. e26223, 2011.

GERMAIN, P et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v.58, n. 4, p. 760-72, 2006.

GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, Cambridge, v. 135, n. 2, p. 366, 2007.

GRACELI, J. B. et al. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 36, n. 4, p. 40–52, 2013.

GREEN, H.; MEUTH, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. **Cell**, Cambridge, v. 5, n. 1, p.19-27, 1974.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 78, n. 3, p. 783–809, 1998.

GRÜN. F. et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 20, n. 2141–2155, p. 766-774, 2006.

GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, Baltimore, v. 147, n. 6, p. 50–55, 2006.

GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, Boston, v. 8, n. 2, p. 161-71, 2007.

HANSON, M. A.; GLUCKMAN, P. D. Developmental origins of health and disease: new insights. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Copenhagen, v. 102, n. 2, p. 90–93, 2008.

HANY, J. et al. Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Nova Iorque, v. 158, n. 3, p. 231-243, 1999.

HAO, C. J. et al. The endocrine disruptor 4-nonylphenol promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular**, Basel, v. 30, n. 2, p. 382–394, 2012 a.

HAO, C. J. et al. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. **Bioscience Reports**, Nova Iorque, v. 32, n. 6, p. 619–629, 2012 b.

HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. **Food Chemistry**, Barking, v. 62, n. 1, p. 7-20, 1998.

HIRATA, A. et al. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 419, n. 2, p. 182-187, 2012.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Applied Geochemistry**, Mainz, v. 16 p. 719-743, 2001.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, Londres, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

HURST, C. H.; WAXMAN, D. J. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. **Toxicological Science**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 297–308, 2003.

IMO. International Marine Organisation. **International convention on the control of harmful antifouling systems on ships**. Disponível em: <[http://www.imo.org/Conventions/mainframe.asp?topic\\_id=529](http://www.imo.org/Conventions/mainframe.asp?topic_id=529)>. Acesso em 18 jan. 2015.

Iodotributylstannane. **LookChem**. Disponível em:<http://www.lookchem.com/Iodotributylstannane/>> Acesso em 20 jan. 2015.

IOSSA, S. et al. Energy intake and utilization vary during development in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 8, p. 1593-1596, 1999.

JACOBS, M. N.; LEWIS, D. F. Steroid hormone receptors and dietary ligands: a selected review. **Proceedings of the Nutrition Society**, Londres, v. 61, n. 1, p. 105–122, 2002.

JANESICK, A.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. **Birth Defects Research Part C Embryo Today**, Hoboken, v. 93, n. 1, p. 34-50, 2011 a.

JANESICK, A.; BLUMBERG, B. Minireview: PPAR $\gamma$  as the Target of Obesogens. The **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 127 n. 1-2, p. 4–8, 2011 b.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, Nova Iorque, v. 106, n. 4, p. 473–481, 2000.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, Londres, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

KANAYAMA T, et al. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ /retinoid X receptor pathway. **Molecular Pharmacology**, Nova Iorque, v. 67, n. 3, p. 766 –774, 2005.

KINO, T.; CHARMANDARI, E.; CHROUSOS, G.P. Glucocorticoid receptor: implications for rheumatic diseases. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 29, n. 5 (Suppl 68):S32-41, 2011.

KIRCHNER, S. et al. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. **Molecular Endocrinology**, Washington, v. 24, n. 3, p. 526–539, 2010.

KIRSCHNER, C. M.; BRENNAN, A. B. Bio-inspired antifouling strategies. **Annual Review of Materials Research**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 211-229, 2012.

KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment International**, Elmsford, v. 30, n. 2, p. 235–248, 2004.

LE MAIRE, A. et al. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. **EMBO Reports**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 367-373, 2009.

LEE, M. J.; FRIED, S. K. The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes. **International Journal of Obesity**, Londres, v. 38, n. 9, p. 1228-1233, 2014.

LEGLER, J. New insights into the endocrine disrupting effects of brominated flame retardants. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 216–222, 2008.

LEUNG, K.M.Y. et al. Ecological risk assessments of endocrine disrupting organotin compounds using marine neogastropods in Hong Kong. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 6, p. 922-938, 2006.

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**, Oxford, v. 127, n. 1-2, p. 9–15, 2011.

LILIENTHAL, H. et al. Effects of developmental exposure to 2,2,4,4,5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 114, n. 2, p. 194-201, 2006.

LOWELL, B. B.; SHULMAN, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, Washington, v. 307, n. 5708, p. 384-387, 2005.

LYSSIMACHOU, A.; BACHMANN, J.; PORTE, C. Short - term exposure to the organotin compound triphenyltin modulates esterified steroid levels in females of *Marisa cornuarietis*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 129-135, 2008.

MALONEY, E. K.; WAXMAN, D. J. trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v. 161, n. 2, p. 209–218, 1999.

MASTERS, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 2, n. 4, p. 315-319, 2002.

MCDONNELL, D. P. et al. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. **Molecular Endocrinology**, Washington, v. 9, n. 6, p. 659-669, 1995.

MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 58, n. 4, p. 726–74, 2006.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Nova Iorque, v. 65, n.1-2, p.55-63, 1983.
- MUELLER E. et al. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 44, p. 41925-41930, 2002.
- MULLER, M. D.; RENBERG, L.; RIPPEN, G. Tributyltin in the environment - sources, fate and determination an assessment of present status and research needs. **Chemosphere**, Oxford, v. 18, n. 9 -10, p. 2015-2042, 1989.
- NAKANISHI, T. Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. **Journal of Toxicological Sciences**, Sapporo, v. 33, n. 3, p. 269-276, 2008.
- NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 14, n. 4, p. 353–362, 1962.
- NEWBOLD, R. R. et al. Effects of endocrine disruptors on obesity. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 201-208, 2008.
- NIELSEN, J. B.; STRAND, J. Butyltin compounds in human liver. **Environmental Research**, Nova Iorque, v. 88, n. 2, p. 129–133, 2002.
- NILSSON, R. Endocrine modulators in the food chain and environment. **Toxicological Pathology**, Research Park Triangle, v. 28, n. 3, p. 420-431, 2000.
- NOLTE, R. T. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor. **Nature**, Londres, v. 395, n. 9, p.137-143, 1998.
- NORMAM. **Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Antiincrustantes Danosos em Embarcações** - NORMAM-23/DPC. Disponível em: <<https://www.dpc.mar.mil.br/sites/default/files/normam23.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2015.
- NTAMBI, J. M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte differentiation and gene expression. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 12, p. 3122S-3126S, 2000.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 5, p. 3177–3184, 2011.

ODERMATT A. et al. Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: potential mechanisms and relevance. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 222-231, 2006.

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

OMAE, I. **Organotin chemistry**. Amsterdam: Elsevier, p 320. 1989.

OTTO, T. C.; LANE, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 40, n. 4, p. 229-242, 2005.

OYER, I. J. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to human and to experimental animals. **Toxicology**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 253-298, 1989.

PECKETT, A. J.; WRIGHT, D. C.; RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism Clinical Experimental**, Baltimore, v. 60, n.11, p. 1500-1510, 2011.

PEIRCE, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. The different shades of fat. **Nature**, Londres, v. 510, n. 7503, p.76-83, 2014.

PEREIRA-FERNANDES, A. et al. Unraveling the mode of action of an obesogenic: mechanistic analysis of the model obesogen tributyltin in the 3T3-L1 cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 6, n. 370, p. 52-64, 2013.

PIVER, W. T. Organotin Compounds: Industrial Applications and Biological Investigation. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 4, n. 6, p. 61-79, 1973.

PORTE, C. et al. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology**, Oxford, v. 143, n. 3, p. 303-315, 2006.



PRIVALSKY, M. L. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 66, n. 1, p. 315-360, 2004.

RADKE, B. et al. Organotin Compounds in Marine Sediments. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn 5, v. 17, n. 5, p. 643-654, 2008.

RAINBOW, P. S. Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 31, n. 4-12, p. 183-192, 1995.

REDDY, J. K.; HASHIMOTO, T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 21, n. 1, p. 193-230, 2001.

ROBINSON-RECHAVI, M.; ESCRIVA GARCIA H, LAUDET V. The nuclear receptor superfamily. **Journal of Cell Science**, Nova Iorque, v. 116, n. 4, p. 585-586, 2003.

ROSEN, E.D. et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor NY, v. 14, n. 11, p. 1293-1307, 2000.

ROULEAU, C.; GOBEIL, C.; TJALVE, H. Pharmacokinetics and distribution of dietary tributyltin and methylmercury in the snow crab (*Chionoecetes opilio*). **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 33, n. 19, p. 3451-3457, 1999.

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

SARGIS, R. M. et al. Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. **Obesity**, Silver Spring, v. 18, n. 7, p. 1283-1288, 2010.

SCHECTER, N. et al. Bisphenol A (BPA) in U.S. food. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 24, p. 9425-9430, 2010.

SKINNER, M. K.; MANIKKAM, M.; GUERRERO-BOSAGNA, C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, Nova Iorque, v. 21, n. 4, p. 214-222, 2010.

SMITH, L. D. et al. The effects of antifoulant-paint-contaminated sediments on coral recruits and branchlets. **Marine Biology**, Berlin, v. 143, n. 4, p. 651-657, 2003.

SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, n. 1, p. 2-9, 2008.

STAHLHUT, R. W. et al. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 115, n. 6, p. 876-882, 2007.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 81, n., p. 715-736, 2012.

THAYER, K. A. et al. Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 120, n. 6, p. 770-789, 2012.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. CD Commission Directive 2002/62/EC of 9 July 2002. **Official Journal of the European Communities**, Aberdeen, L183, p. 58-59, 2002.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, Cambridge, v. 79, n. 7, p. 1147-1156, 1994.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.77, p. 289-312, 2008.

**Tributyltin benzoate**. Disponível

em:<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/135018178#section=Top>> Acesso em 20 jun. 2015.

**Tributyltin chloride**. Disponível

em:<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/223737160#section=Top>>. Acesso em 20 jun. 2015.

**Tributyltin iodide.** Disponível

em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/250125614#section=Top>> Acesso em 20 jun. 2015

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, Londres, v. 457, n. 7228, p.480–484, 2009.

VANDEVYVER, S. et al. Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 122, n. 6, p. 2130-2140, 2012.

VASILAKOPOULOU, A.; LE ROUX, C.W. Could a virus contribute to weight gain? **International Journal of Obesity**, Londres, v. 31, n. 9, p. 1350–1356, 2007.

VISSER, W. E. et al. Thyroid hormone transport in and out of cells. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, Nova Iorque, v. 19, n. 2, p. 50-56, 2008.

VOGT, C. et al. Multi-generation studies with *Chironomus riparius* – Effects of low tributyltin concentrations on life history parameters and genetic diversity. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 2192–2200, 2007.

VOM SAAL, F. S. et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 24, n. 2, p. 131–138, 2007.

WANG, Y.; LOBSTEIN, T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. **International Journal of Pediatric Obesity**, Nova Iorque, v. 1, n. 1, p. 11-25, 2006.

WARING, R. H.; HARRIS, R.M. Endocrine disruptors: a human risk? **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 244, n. 1–2, p. 2–9, 2005.

WHO. World Health Organization. **Obesity and overweight.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

WHO-IPCS. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. **Concise international chemical assessment document 14. Tributyltin oxide.** Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicad14.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

WISSE, B. E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. Physiology. An integrative view of obesity. **Science**, Washington, v. 318, n. 5852, p. 928-929, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tributyltin compounds**. Geneva: Environmental Health Criteria, 1990.

YAMADA, S.; KAKUTA, H. Retinoid X receptor ligands: a patent review (2007 - 2013). Expert Opinion on Therapeutic Patents, Londres, v. 24, n. 4, p. 443-452, 2014.

YANIK, S. C. et al. Organotins are potent activators of PPARgamma and adipocyte differentiation in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. **Toxicological Science**, Oxford, v. 122, n. 2, p. 476-488, 2011.

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**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 75-104, 2004.

ZOELLER, R. T.; BANSAL, R.; PARRIS, C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. **Endocrinology**, Baltimore, v. 146, n. 2, p. 607-612, 2005.