

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

CAROLINA FALCÃO XIMENES

**Efeitos da exposição por quinze dias ao
tributilestanho (500 ng/kg) sobre a reatividade e
morfologia da aorta de ratas**

VITÓRIA

2016

CAROLINA FALCÃO XIMENES

**Efeitos da exposição por quinze dias ao
tributilestanho (500 ng/kg) sobre a reatividade e
morfologia da aorta de ratas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, na área de concentração de Fisiologia Cardiovascular.

Orientadora: Profa. Dra. Ivanita Stefanon

Co-Orientador: Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli

VITÓRIA

2016

Efeitos da exposição por quinze dias ao tributilestanho (500 ng/kg) sobre a reatividade e morfologia vascular de ratas

CAROLINA FALCÃO XIMENES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em / / por:

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – Orientadora - UFES

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli – Co-Orientador - UFES

Prof^a Dr^a Adriane Belló Klein – UFRGS

Dr Rogério Faustino Ribeiro Júnior – UFES

Coordenador do PPGCF:

Prof^a. Dr^a Alessandra Simões Padilha

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória - ES, Fevereiro de 2016.

Ximenes, Carolina Falcão 1990

Efeitos da exposição por quinze dias ao tributilestanho (500 ng/kg) sobre a reatividade e morfologia vascular de ratas [Vitória] 2016

110p., 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2016)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon

Co-Orientador: Prof Dr. Jones Bernardes Graceli

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

1. Cloreto de Tributilestanho 2. Reatividade Vascular 3. Estrogênio 4. Músculo Liso Vascular 5. Estresse oxidativo

“Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não te atemorizes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andares.”

(Josué 1:9)

Dedico este trabalho às pessoas que amo, meus pais (Lourdes e João)
e ao meu irmão (Gustavo).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conduzir, proteger, sustentar e iluminar em todos os momentos da minha vida. Por todas as bênçãos derramadas e pela sua infindável misericórdia.

Especialmente à minha admirável orientadora Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon por acreditar em mim e me proporcionar uma brilhante orientação acadêmica e pessoal, desde a graduação como aluna de iniciação científica. Ivanita, você é um exemplo de pessoa, professora e pesquisadora. Obrigada por me apresentar a pesquisa e por dividir sua sabedoria e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Dalton pela disponibilidade, atenção, conselhos, conversas e suas brilhantes contribuições para a pesquisa e o Programa. O seu exemplo foi fundamental no meu crescimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. Jones pela coorientação e pelo projeto TBT que me confiou. Obrigada pelo direcionamento, apoio e disponibilidade para ensinar e ajudar.

A Prof^a. Dr^a. Alessandra pela disponibilidade e por sempre me acolher nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Leonardo pela sua disponibilidade, contribuições e ensinamentos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos.

Aos meus companheiros do LEMC: Amanda, Ariane, Bianca, Bruna Azevedo, Bruna Brun, Bruno, Camila, Cindy, Cleydianne, David Chaves, David Freire, Dieli, Edna, Elis, Emilly Rossi, Fabiana, Gersica, Gilson, Guilherme, Jessica Spalenza, João Vitor, Jordana, Karol Ronconi, Karol Zuqui, Lorena, Marito, Maylla, Mirian, Nathalia, Patrícia, Paula, Renata, Sabrina, Tatiani, Teca, Vinícius, Rodrigo, Roger e Wena.

À Rose pelo seu carinho, pelas conversas, companhia e conselhos. Você é uma pessoa fenomenal que entrou para o time do LEMC para somar.

À Dr^a. Priscila Rossi por me abraçar e conduzir os primeiros passos do projeto TBT no LEMC. Sua iniciativa de colaboração e ajuda foram essenciais para o início da minha jornada.

Aos componentes do grupo de pesquisa que me auxiliaram em todos os momentos. À Priscila Podratz pelo companheirismo, pelo auxílio com a histologia e por ser essa pessoa meiga e atenciosa. Ao Eduardo pelo auxílio com DHE e pela disponibilidade para me ajudar com os softwares. À Júlia pelo auxílio com a microscopia eletrônica de varredura e pelo companheirismo. À Prof^a. Dr^a. Juliana Coitinho pelo empenho e auxílio com o TBARS e pelos ensinamentos de bioquímica. À Prof^a. Dr^a Livia pela colaboração com a pesquisa.

À minha amiga Samya por compartilhar comigo o projeto de pesquisa desde a primeira iniciação científica, os experimentos, os finais de semana, além dos feriados no laboratório, os medos, os descobrimentos, as conquistas e pelo incentivo nos momentos difíceis e de desânimo.

À minha amiga Carmen pelo companheirismo no dia a dia, nos finais de semana de estudos, diversão e por dividir as ansiedades e as alegrias durante esse último ano de mestrado.

À minha mãe Lourdes e ao meu pai João por apoiarem minhas escolhas e sonhos. Agradeço imensamente pela criação, educação, carinho, paciência, pelo amor incondicional materno e paterno, além dos princípios que me ensinaram. Vocês são essenciais na minha vida.

Ao meu irmão Gustavo pelo companheirismo no dia a dia, pelos momentos de distração, diversão e alegria.

Agradeço aos meus familiares pela compreensão da ausência e que muito me ajudaram direta e indiretamente nos meus sonhos.

Aos meus grandes e inesquecíveis amigos: Silvana, Reginaldo, Railda, Paula, Marcia e Queila pelo incentivo, apoio, ombro amigo, carinho, momentos de risadas, momentos difíceis, pelas horas no telefone e por sempre estarem por perto.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPES/FUNCITEC.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E FóRMULAS

ACh – Acetilcolina

ADP – Adenosina difosfato

ANOVA – Análise de variância

Apocinina – Apo

BH₄ – Tetrahydrobiopterina

Ca²⁺ – Íon cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CITBT – Cloreto de tributilestanho

cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina

CMLVs – Células do músculo liso vascular

dAUC – Diferença da área sob a curva

DBT – Dibutilestanho

Dihidroetídio – DHE

E+ – Endotélio íntegro

E- – Endotélio removido mecanicamente

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EPM – Erro Padrão da Média

EROs – Espécies reativas de oxigênio

E₂ – Estrogênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HOCl⁻ – Ácido hipocloroso

ip – Intraperitoneal

2 H₂O – Citrato de Sódio

KCl - Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio Monobásico

L-NAME – N^G-nitro-L-arginina metil éster

MAPK – Proteína- quinases ativadas por mitógenos

MBT – Monobultilestanho

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Mg SO₄ – Sulfato de Magnésio

NaCl –Cloreto de Sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NPS – Nitroprussiato de Sódio

O₂⁻ – Ânion superóxido

OH^{*} – Radical Hidroxila

ONOO⁻ – Peroxinitrito

OTBT – Óxido de tributilestanho

OTs – Compostos organoestânicos

PC – Peso corporal

pD₂ – Log da concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo a fenilefrina

PGH₂ – Prostaciclina H₂

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

RE – Receptor de estrogênio

R_{máx} – Resposta máxima

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

Sn – Estanho

SnVI – Derivados orgânicos do estanho

SOD – Superóxido dismutase

SOD1; Cu/Zn SOD – Superóxido dismutase cobre/zinco

SOD2; Mn SOD – Superóxido dismutase mitocondrial

SOD3; ECSOD – Superóxido dismutase extracelular

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBT – Tributilestanho

TXA₂ – Tromboxano A₂

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura molecular do OTBT e CITBT..... 28
- Figura 2: Fontes gerais de compostos organoestânicos de exposição humana. Modificado de Hoch, 2001..... 31
- Figura 3: Distribuição e destino de OTs e suas rotas gerais no meio aquático. Hoch 2001. 33
- Figura 4: Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm..... 47
- Figura 5: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems. Modificado de Dias, 2007. 48
- Figura 6: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina 10^{-7} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; K) Adição de acetilcolina (ACh) 2×10^{-6} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias, 2011). 50
- Figura 7: Avaliação do ganho ponderal nos grupos Controle (n=10) e TBT (n=10). Dados expressos em Média \pm EPM. $p > 0,05$, Teste t de Student não pareado. 61
- Figura 8: Avaliação ponderal das câmaras cardíacas em ratas dos grupos Controle (n=10) e TBT (n=10). A- Razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal das ratas (VE/PC); B- Razão do peso do ventrículo direito pelo peso corporal das

ratas (VD/PC). Dados expressos em Média \pm EPM. $p > 0,05$, Teste t de Student não pareado.	62
Figura 9: Avaliação das respostas dos anéis ao KCl em ratas dos grupos Controle (n=10) e TBT (n=10). Dados expressos em Média \pm EPM. *** $p < 0,001$, Teste t de Student não pareado.	64
Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar nos grupos Controle e TBT. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não pareado. ** $p < 0,01$ e *** $P < 0,001$	65
Figura 11: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas wistar dos grupos: (A) Controle (E+) e após a retirada do endotélio (E-); (B) TBT (E+) e após a retirada do endotélio (E-). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não pareado. A análise foi realizada através do Teste t não pareado para comparações de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2); ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$	67
Figura 12: (A) Avaliação da superfície endotelial por microfotografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando a superfície endotelial de aorta de ratas do grupo Controle com aparência escamosa normal. A superfície endotelial de aorta de ratas do grupo TBT (B, B1 e B2) apresentando superfície endotelial desnudada (asterisco), principalmente uma superfície endotelial irregular com acúmulo de células vermelhas, plaquetas e fibrina em endotélio desnudado (seta). (A seta: célula endotelial, Barra=10 μ m).	69
Figura 13: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina. Teste t não pareado. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$	70
Figura 14: Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina. Teste t não pareado. *** $p < 0,001$	72

Figura 15: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Controle L-NAME); (B) TBT e após a incubação com L-NAME (TBT L-NAME); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle e Tributilestanho. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste *t* não pareado. **p* < 0,5 e ****p* < 0,001. 75

Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Apocinina (Controle Apo); (B) TBT e após a incubação com Apocinina (TBT Apo). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001. 77

Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com SOD (Controle SOD); (B) TBT e após a incubação com SOD (TBT SOD). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; **p* < 0,5 e ****p* < 0,001. 78

Figura 18: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Catalase (Controle Catalase); (B) TBT e após a incubação com Catalase (TBT Catalase). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001. 79

Figura 19: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Tiron (Controle Tiron); (B) TBT e após a incubação com Tiron (TBT Tiron). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ****p* < 0,001. 81

Figura 20: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Alopurinol (Controle Alopurinol); (B) TBT e após a incubação com Alopurinol (TBT Alopurinol). O número

de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; *p < 0,5 e **p < 0,01..... 82

Figura 21: Avaliação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) "in situ" por Imagens de micrografia representando a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de ratas dos grupos: (A-A1) Controle (Controle E+) e (C-C1) após a retirada do endotélio (Controle E-); (B-B1) TBT (TBT E-). (E) Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio. Valores expressos em média \pm EPM; teste ANOVA uma via. **p < 0,01 e ***p < 0,001..... 85

Figura 22: Avaliação da peroxidação lipídica dos anéis de aorta de ratas dos grupos Controle e TBT. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Dados expressos em média \pm EPM. *p < 0,5, Teste t de Student não pareado. 86

Figura 23: Imagem representativa da densidade superficial de colágeno em segmentos de aorta de ratas dos grupos: (A) Controle e (B) TBT. (C) Gráfico com percentuais da deposição de colágeno. Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não pareado. ***p < 0001. Bar = 20 μ m..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos do tributilestanho (TBT).	29
Tabela 2: Dados da avaliação das concentrações do estrogênio (E_2) no soro e dados ponderais das ratas dos grupos Controle e TBT.	63
Tabela 3: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratas Wistar dos grupos Controle e TBT.	66
Tabela 4: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratas Wistar dos grupos Controle e TBT.	68
Tabela 5: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina (ACh) em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle e TBT. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção à fenilefrina.	71
Tabela 6: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) induzida pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle e TBT. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina.....	73
Tabela 7: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).....	76
Tabela 8: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Apocinina (Apo).	77
Tabela 9: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de SOD.....	78

Tabela 10: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Catalase. 80

Tabela 11: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Tiron. 81

Tabela 12: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Alopurinol..... 83

RESUMO

O Cloreto de Tributilestanho (TBT) é uma substância química que provoca a redução da concentração de estrogênio (E_2) no soro, podendo causar desregulação endócrina e efeitos tóxicos em mamíferos. A concentração de 500 ng/kg foi utilizada por ser encontrada no meio ambiente, mimetizando assim, uma exposição humana a uma concentração realística. No entanto, sua ação sobre o sistema vascular, não está bem elucidada. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição de 500 ng/kg ao TBT durante quinze dias sobre reatividade vascular, e a possível relação entre anormalidades vasculares e o estresse oxidativo. Foram utilizadas ratas fêmeas Wistar (250-300 g), divididas em grupo controle e exposto ao TBT (500 ng/kg) diariamente via gavagem. A concentração de E_2 no soro foi analisada por radioimunoensaio e a peroxidação lipídica foi medida na aorta usando a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A reatividade vascular de anéis de aorta incubados com KCl (75 mM), e logo após, com fenilefrina ($10^{-10} - 3 \times 10^{-4}$ M) foi avaliada na presença (E+) e na ausência do endotélio (E-). Para analisar os possíveis fatores endoteliais envolvidos no efeito do TBT, foram realizadas curvas de concentração-resposta à fenilefrina com N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (100 μ M), apocinina (30 μ M), Superóxido Dismutase (SOD) 150 (U/ml), Catalase (1000 U/ml), Tiron (1 mM) e Alopurinol (100 μ M). A resposta ao relaxamento induzida pelo endotélio foi avaliada através da curva de relaxamento induzida pela acetilcolina (ACh, $10^{-10} - 3 \times 10^{-4}$ M), e a resposta ao relaxamento mediada pelo músculo liso vascular foi testada pela curva de nitroprussiato de sódio (NPS, $10^{-11} - 3 \times 10^{-7}$ M), em artérias pré-contraídas com fenilefrina (10^{-6} M). Para analisar a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) "in situ" foi utilizado o dihidroetídio (DHE). A integridade estrutural da aorta foi avaliada através da coloração Hematoxilina e Eosina, Pricosirius Red e pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados foram expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foram utilizados teste *t* de Student não pareado e ANOVA 1 via para avaliação da produção de $O_2^{\cdot-}$ "in situ", sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. A concentração de E_2 no soro (Controle: $32,2 \pm 6,6$; TBT: $19,95 \pm 2,3$ pg/ml, $n=4$, $p < 0,05$) reduziu 38% e a peroxidação lipídica (Controle: $7,53 \pm 1,26$; TBT: $12,33 \pm 0,81$ nmol/mg proteína, $n=3-5$, $p < 0,01$) foi maior no grupo TBT. A resposta ao KCl

(Controle: $2,34 \pm 0,06$; TBT: $3,48 \pm 0,17$ g, $n=10$, $p < 0,01$) e a resposta à felinefrina ($R_{\text{máx}}$, Controle: $1,54 \pm 0,09$; TBT: $4,01 \pm 0,36$ g, $n=10$, $p < 0,01$; pD_2 , Controle: $-6,32 \pm 0,09$; TBT: $-6,85 \pm 0,14$ g, $n=10$, $p < 0,01$) foi maior no grupo TBT. A remoção do endotélio promoveu um aumento da $R_{\text{máx}}$ no grupo controle e um aumento da pD_2 no grupo TBT, porém a magnitude da resposta (analisada pela $dAUC$) não foi diferente entre os grupos. A administração de L-NAME promoveu aumento de $R_{\text{máx}}$ e pD_2 à felinefrina, tanto na ausência quanto na presença de TBT. A magnitude desse efeito foi maior na presença de TBT ($dAUC\%$ - Controle: $55,69 \pm 12,96$ vs TBT $102,70 \pm 16,78\%$). A vasodilatação induzida pela ACh ($R_{\text{máx}}$, Controle: $-105,3 \pm 0,15$; TBT: $91,26 \pm 0,92\%$, $n=10$; pD_2 , Controle: $-6,07 \pm 0,01$, $n=10$; TBT: $-5,79 \pm 0,02\%$, $n=10$, $p < 0,01$) e NPS ($R_{\text{máx}}$, Controle: $-99,37 \pm 1,65$, $n=9$; TBT: $-80,68 \pm 2,78\%$, $n=10$; pD_2 , Controle: $-7,64 \pm 0,08$, $n=9$; TBT: $3,63 \pm 0,57\%$, $n=10$; $p < 0,01$) foram modificadas pela exposição ao TBT. Além disso, a exposição ao TBT induziu um aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ "in situ" principalmente no músculo, redução da espessura (Controle: $133,24 \pm 5,29$, $n=5$; TBT: $87,29 \pm 0,75$ μm , $n=5$), aumento a deposição de colágeno (Controle: $84,27 \pm 2,32$; TBT: $103,87 \pm 1,93\%$, $n=5$, $p \leq 0,001$) e desnudação endotelial com acúmulo de células vermelhas, fibrina e plaquetas em anéis de aorta. Assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o TBT provoca um prejuízo na reatividade vascular de ratas fêmeas, provavelmente devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e anormalidades morfológicas.

Palavras chaves: Cloreto de tributilestanho, reatividade vascular de aorta, estresse oxidativo, estrogênio.

ABSTRACT

The tributyltin chloride (TBT) is a chemical that causes a reduction of serum estrogen (E_2) levels and may cause endocrine disruption and toxic effects in mammals. The dose of 500 ng/kg was used to be found in the environment, thus mimicking a human exposure to a realistic concentration. However is not well understood. The objective of this study was to investigate the effects of exposure of 500 ng/kg of TBT for fifteen days on vascular reactivity, and the possible relationship between vascular abnormalities as a result of the development of oxidative stress. Female Wistar rats were used (250-300 g), divided into control group and exposed to TBT (500 ng/kg) daily by gavage. The E_2 level in the serum was analyzed by radioimmunoassay and lipid peroxidation was measured in the aorta using the level of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS). Aortic rings vascular reactivity incubated with KCl (75 mM), immediately after, with phenylephrine ($10^{-10} - 3 \times 10^{-4}$ M) was assessed in the presence (E+) and absence of the endothelium (E-). To analyze the possible factors involved in endothelial effect of TBT were carried concentration-response curves to phenylephrine with L-N^G-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) (100 μ M), apocynin (30 μ M), superoxide dismutase (SOD) 150 (U/ml), Catalase (1000 U/ml), Tiron (1 mM) and allopurinol (100 μ M). The relaxation response endothelium-induced was evaluated by acetylcholine-induced relaxation curve (ACh $10^{-10} - 3 \times 10^{-4}$ M), and the relaxation response mediated by the vascular smooth muscle was tested by curve sodium nitroprusside (SNP, $10^{-11} - 3 \times 10^{-7}$ M) in arteries pre-contracted with phenylephrine (10^{-6} M). To analyze the production of superoxide anion "in situ" was used dihydroethidium (DHE). The structural integrity of the aorta was evaluated by staining hematoxyline and eosin, Pricosirius Red and by scanning electron microscopy (SEM). Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis used Student's *t* test unpaired and ANOVA 1 way for evaluate the production of $O_2^{\cdot-}$ "in situ", with $p < 0.05$ considered statistically significant. The oestrogen level in serum (Control: 32.2 ± 6.6 ; TBT: 19.95 ± 2.3 pg/ml, $n=4$, $p < 0.05$) was decreased 38 % and the lipid peroxidation (Control: 7.53 ± 1.26 ; TBT: 12.33 ± 0.81 nmol/mg protein $n=3-5$, $p < 0.01$) was higher in the TBT group. The response to KCl (Controle: 2.34 ± 0.06 ; TBT: 3.48 ± 0.17 g, $n=10$, $p < 0.01$) and the response to phenylephrine (E_{max} , Control: 1.54 ± 0.09 ; TBT: 4.01 ± 0.36 g, $n=10$, $p < 0.01$; pD_2 , Control: -6.32 ± 0.09 ; TBT: -6.85 ± 0.14 g, $n=10$, $p < 0.01$) were higher in the TBT

group. Removal of the endothelium was associated with an increase of E_{max} in the control group and an increase pD_2 in the TBT group, although the magnitude of the response (analyzed by dAUC) was not different between the groups. L-NAME administration promoted an increase of E_{max} and pD_2 to phenylephrine, both in the absence and in the presence of TBT. The magnitude of this effect was greater in the presence of TBT (dAUC % - control: 55.69 ± 12.96 vs TBT 102.70 ± 16.78 %). The vasodilation induced by ACh (E_{max} , Control: -105.3 ± 0.15 ; TBT: 91.26 ± 0.92 %, $n=10$; pD_2 , Control: -6.07 ± 0.01 , $n=10$; TBT: -5.79 ± 0.02 %, $n=10$, $p < 0.01$) and SNP (E_{max} , Control: -99.37 ± 1.65 , $n=9$; TBT: -80.68 ± 2.78 %, $n=10$; pD_2 , Control: -7.64 ± 0.08 , $n=9$; TBT: 3.63 ± 0.57 , $n=10$; $p < 0.01$) were modified by exposure to TBT. Furthermore, exposure to TBT induced an increase in superoxide anion production "in situ" mainly in the smooth, reduction of wall thickness (Control: 133.24 ± 5.29 , $n=5$; TBT: 87.29 ± 0.75 μm , $n=5$) increased collagen deposition and endothelial denudation with accumulation of red blood cells, fibrin and platelets in aortic rings. Thus, the results obtained in this study suggest that TBT causes an impaired vascular reactivity of female rats, probably due increased production of reactive oxygen species (ROS) and morphologic abnormalities.

Key words: tributyltin chloride, vascular reactivity aorta, oxidative stress, estrogen.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
1.1	O TRIBUTILESTANHO	28
1.1.2	Identificação da substância	28
1.1.2	Compostos organoestênicos (Ots) na natureza	29
1.1.3	Propriedades físico-químicas e utilização industrial	30
1.2	EXPOSIÇÃO POPULACIONAL E OCUPACIONAL	31
1.3	CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	33
1.4	EFEITOS DO TRIBUTILESTANHO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	34
1.4.1	Efeitos vasculares	35
1.5	REGULAÇÃO DA REATIVIDADE DE AORTA	36
1.5.1	Fatores envolvidos na regulação do tônus vascular	36
1.5.2	Óxido Nítrico (NO)	37
1.5.4	Efeito do Estrogênio (E ₂) sobre a reatividade vascular	41
1.5.5	Hipótese	42
2	OBJETIVOS	44
2.1	OBJETIVO GERAL	44
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS		46
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS:	46
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS:	46
3.3	AVALIAÇÃO PONDERAL	46
3.4	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	47
3.4.1	Preparação dos anéis de aorta	47
3.4.2	Obtenção dos registros para estudo da reatividade vascular em anéis de aorta	48
3.4.3	Avaliação funcional dos anéis isolados de aorta	49
3.4.4	Avaliação da integridade funcional do endotélio	49
3.4.5	Avaliação da resposta contrátil à fenilefrina	50
	Avaliação da participação do endotélio ao relaxamento	50
3.4.6	Avaliação indireta da liberação basal de óxido nítrico (NO)	51
3.4.7	Avaliação da resposta de relaxamento dependente de endotélio	51
3.4.8	Avaliação da resposta de relaxamento independente do endotélio	51
3.4.9	Avaliação da participação de radicais livres	51

3.5	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	53
3.5.1	Mensuração hormonal	53
3.5.2	Mensuração de homogeneizado de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	53
3.6	ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	54
3.6.1	Preparação do tecido	54
3.6.2	Histomorfometria	54
3.6.3	Densidade da superfície de colágeno.....	55
3.6.4	Microscopia eletrônica de varredura	55
3.6.5	Detecção de ânion superóxido “in situ”.....	56
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
3.8	DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS:.....	58
4	RESULTADOS.....	61
4.1	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE ESTROGÊNIO (E ₂) NO SORO E GANHO PONDERAL DE RATAS.....	61
4.2	RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA.....	64
4.3	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATAS.....	65
4.4	EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO NA MODULAÇÃO ENDOTELIAL SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATAS.....	67
4.5	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO ENDOTÉLIO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	69
4.6	EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	70
4.7	EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	72
4.8	FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	74
4.8.1	Participação da via do óxido nítrico na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	74
4.8.2	Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	76

4.8.2.1	Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	76
4.8.2.2	Influência da superóxido dismutase (SOD) na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	77
4.8.2.4	Influência da administração do tiron no tratamento por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.	80
4.8.2.6	Quantificação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) "in situ" através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE).	84
4.8.2.7	Quantificação da peroxidação lipídica através das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).	86
4.9	Quantificação da deposição de colágeno na aorta através pela coloração <i>picrosirius red</i>.	86
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÃO	96
7	REFERÊNCIAS	98



INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 O TRIBUTILESTANHO

1.1.2 Identificação da substância

Compostos de tributilestanho (TBT) são derivados orgânicos de estanho (SnIV), que são caracterizados pela presença de ligações covalentes entre os três átomos de carbono e um átomo de estanho. Eles têm a fórmula geral $(n\text{-C}_4\text{H}_9)_3\text{Sn-X}$, onde X é um ânion ou um grupo ligado covalentemente. O óxido de tributilestanho (OTBT) é o mais utilizado destes compostos. Outros compostos de tributilestanho (Tabela 1) industrialmente importantes são o fluoreto de tributilestanho, metacrilato de tributilestanho (monômero ou copolímero), benzoato de tributilestanho, linoleato de tributilestanho e naftenato de tributilestanho (EUROPE, 2011). O cloreto de tributilestanho (CITBT), que é um líquido incolor ou ligeiramente amarelado, com odor característico, e o OTBT têm sido normalmente utilizados em experimentos laboratoriais para investigar a toxicidade dos OTs (Figura 1) (ANTIZAR-LADISLAU, 2008).

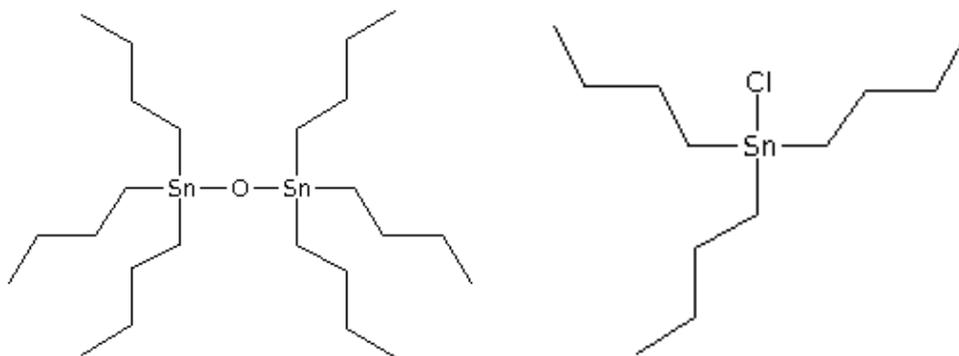


Figura 1: Estrutura molecular do OTBT e CITBT.

Tabela 1: Compostos do tributilestanho (TBT).

Nome	Fórmula Molecular	Peso molecular
Óxido de tributilestanho	C ₂₄ H ₅₄ O ₂ Sn ₂	596
Benzoato de tributilestanho	C ₁₉ H ₃₂ O ₂ Sn	411
Cloreto de tributilestanho	C ₁₂ H ₂₇ ClSn	325
Fluoreto de tributilestanho	C ₁₂ H ₂₇ F ₂ Sn	309
Linoleato de tributilestanho	C ₃₀ H ₅₈ O ₂ Sn	568.7
Metacrilato de tributilestanho	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ Sn	374.7
Naftenato de tributilestanho		cerca de 500

Modificado de EUROPE, 2011.

1.1.2 Compostos organoestânicos (Ots) na natureza

A degradação dos OTs no meio ambiente pode ser definida como uma perda progressiva de grupos orgânicos do cátion estanho (Sn):



A remoção dos grupos orgânicos pode ser causada por vários processos, que incluem: a irradiação ultravioleta, a clivagem química e biológica, mas a fotólise pela luz solar parece ser o caminho mais rápido de degradação na água.

Contaminantes organoestânicos encontram-se a ser associados com a fração de partículas em suspensão de argila, indicando que a adsorção e concentração para esta fração é um importante mecanismo de controle sobre a distribuição e destino de OTs no meio ambiente (HOCH, 2001).

Ampla distribuição, alta hidrofobicidade, e persistência de OTs no ambiente, como TBT, são características que levantaram preocupações sobre a sua bioacumulação, o seu potencial em cadeias alimentares e os seus efeitos adversos (GALLOWAY, 2006; VELTMAN *et al.*, 2006; NAKANISHI, 2007).

1.1.3 Propriedades físico-químicas e utilização industrial

A química dos compostos de TBT é dominada por reações que envolvem a ligação entre o grupo TBT e o ânion ou um grupo que compreende o resto da molécula. A natureza do ânion ou um grupo limitado ao grupo (s) de TBT influencia as propriedades físico-químicas dos compostos de TBT, especialmente as solubilidades relativas em água e solventes não polares e a pressão de vapor. OTBT é solúvel em lipídios e muito solúvel em diversos solventes orgânicos (por exemplo, etanol, hidrocarbonetos halogenados, éteres). Seu coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) situa-se entre 3,19 e 3,84 para água destilada. A pressão de vapor de compostos de TBT é muito baixa. Portanto, compostos de TBT existem como partículas e aerossóis (EUROPE, 2011).

OTs, como o TBT têm sido amplamente utilizados como biocidas em navios anti-incrustantes e fungicidas agrícolas, na conservação de madeira, repelente de roedores, inseticidas e como agente desinfetante (PIVER, 1973; BRYAN *et al.*, 1986; HOCH, 2001). Fonte adicional vem de rolhas de garrafa, tapetes, produtos de higiene e alimentos enlatados (WWF ficha informativa).

1.2 EXPOSIÇÃO POPULACIONAL E OCUPACIONAL

Devido à presença de vários OTs de inúmeras fontes antropogênicas, a exposição da população a esses poluentes podem ocorrer de duas formas: a ingestão de alimentos contaminados e exposição indireta de utensílios domésticos que contenham OTs (Figura 2) (HOCH, 2001). Poucos estudos que tratam da acumulação de OTs em tecidos humanos estão disponíveis: como avaliação de OTs em humanos voluntários, que revelaram uma acumulação de monobutilestano (MBT) e dibutilestano (DBT) e TBT no fígado de pessoas que vivem no Japão e Dinamarca, bem como no fígado e sangue de voluntários dos Estados Unidos da América (EUA) (KANNAN & FALANDYSZ, 1997; KANNAN *et al.*, 1999; WHALEN *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1999; NIELSEN & STRAND, 2002).

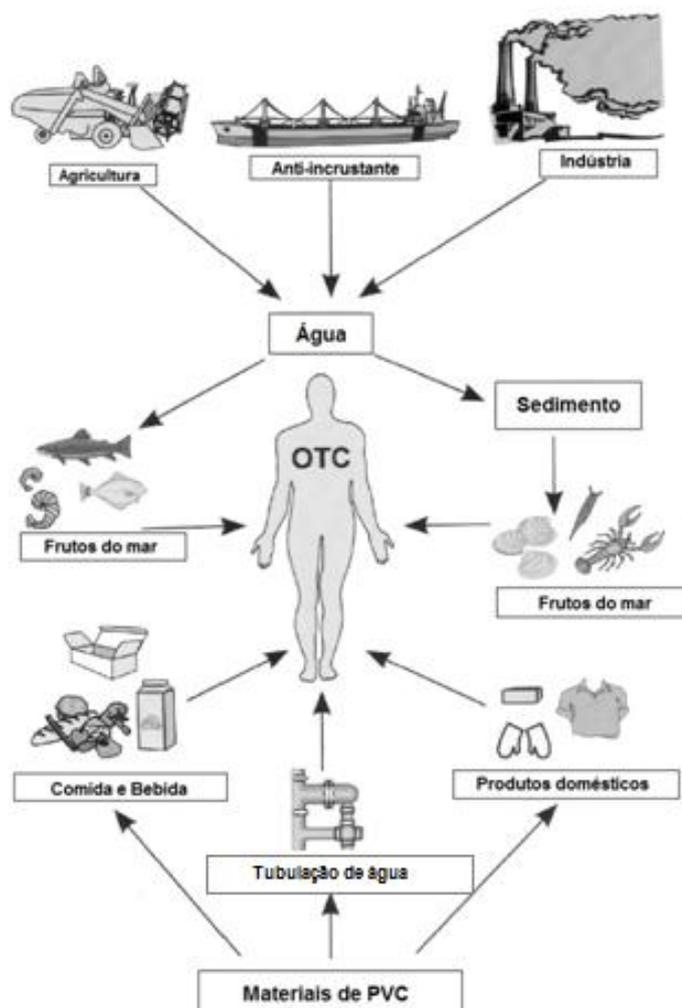


Figura 2: Fontes gerais de compostos organoestânicos de exposição humana. Modificado de Hoch, 2001.

Não há informações sobre a captação e distribuição no organismo de compostos de TBT inalados por humanos. Os dados em animais sugerem que aproximadamente de 20 a 50% de OTBT ingerido é absorvido, no entanto, quando o TBT é aplicado na derme a absorção é em torno de 1 e 10% (IPCS, 1990). IPCS, (1999), implicam que a incorporação de OTs, a partir de outros compostos de TBT, era esperada que fosse semelhante. O OTBT absorvido é rapidamente e amplamente distribuído entre os tecidos com as concentrações mais elevadas, sendo encontrado no fígado e rins (IPCS, 1999). O OTBT pode ser transferido através da barreira hematoencefálica e da placenta para o feto (IPCS, 1999). Compostos de TBT são rapidamente metabolizados e metabólitos foram detectados no sangue no prazo de 3 horas após a administração via parenteral em animais. Os principais metabólitos parecem ser compostos de estanho MBT e DBT (IPCS, 1999).

Vários relatos de casos descreveram a irritação do trato respiratório agudo seguido de exposição por inalação de pessoas à OTBT. Sintomas, incluindo sensação de queimação no nariz e na testa, dor de cabeça, sangramento nasal, tosse, perda de apetite, náusea e vômito foram relatados em associação com um odor persistente de tinta contendo TBTO usado para controle de mofo (IPCS, 1999). Além disso, o OTBT é irritante para os olhos e pode causar dermatite grave resultante do contato direto com a pele, como por exemplo, OTBT em roupa de trabalho (IPCS, 1999; Grace *et al.*, 1991).

1.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Devido o extensivo uso de OTs em várias áreas da atividade humana, grande quantidade de OTs tem sido introduzida em vários ecossistemas. Assim, concentrações significantes destes poluentes e de seus metabólitos têm sido detectadas em vários compartimentos, principalmente no ambiente aquático: água, matéria suspensa, sedimento e biomassa. Os poluentes podem entrar no sistema aquático por diferentes rotas (Figura 3) (HOCH, 2001).

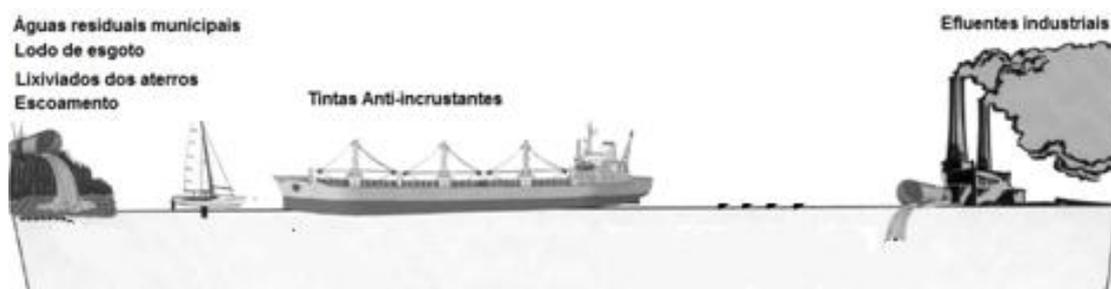


Figura 3: Distribuição e destino de OTs e suas rotas gerais no meio aquático. Hoch 2001.

Até agora a atenção tem sido dada principalmente à poluição do TBT em água e sedimentos por causa do alto efeito tóxico para os organismos aquáticos, mesmo em concentrações muito baixas (CHAGOT *et al.*, 1990), levando à proibição da utilização dos compostos anti-incrustantes, mas a poluição ambiental generalizada com TBT e sua consequência maléfica são encontradas até hoje (FENT, 1996).

O consenso para proibir a utilização de TBT é muito complexo, mas muitos países cumpriram com o regulamento de proibição (CHAMP, 2000). No entanto, a poluição das águas costeiras ainda é devido à longa semivida de TBT em sedimentos marinhos (VIGLINO *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2010). Altas concentrações de TBT foram detectadas nos sedimentos marinhos perto de portos, portos de pesca, marinas e estaleiros em diferentes países (HARINO *et al.*, 2007; GARG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011a; PODRATZ *et al.*, 2015). Como a ocorrência de concentrações elevadas de butilestanho no sedimento marinho de Vitória, ES, Brasil (COSTA *et al.*, 2014).

1.4 EFEITOS DO TRIBUTILESTANHO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Apesar da proibição, inúmeras consequências tóxicas do TBT ainda existem no meio ambiente (KONSTANTINO & ALBANIS, 2004; DIEZ *et al.*, 2005; NHAN *et al.*, 2005; COOKE, 2006), efeitos no sistema endócrino (SUMPTER, 2005; LAGADIC *et al.*, 2007; NAKANISHI, 2007; OEHLMANN *et al.*, 2007), toxicidade imunológica e reprodutiva (OHTAKI *et al.*, 2007; DELGADO FILHO *et al.*, 2011), bem como o papel no aumento da produção de EROs em modelos *in vitro* e modelos *in vivo* (ISHIHARA *et al.*, 2012; MITRA *et al.*, 2014).

Vários estudos relataram que o desenvolvimento do imposex em moluscos do sexo feminino expostos ao TBT, um processo de masculinização, que desenvolve um órgão genital masculino e um vaso deferente. Em certas espécies o crescimento do vaso deferente prejudica a estrutura e função da trompa uterina, impedindo a atividade normal e causando declínio da população. Imposex foi estabelecido como uma forma de desregulação endócrina causada por concentrações elevadas de testosterona, levando a masculinização de fêmeas expostas aos OTs (FENT; RONIS & MASON, 1996). Recentemente, Podratz *et al.*, (2015) relataram que a exposição de frutos do mar que contém OTs, que varia 108,7-844,3 ng g⁻¹ Praia Formosa, ES, Brasil, leva a anomalias do trato reprodutivo.

Outro estudo toxicológico utilizando uma dose de exposição de TBT 500 ng/kg demonstrou degeneração severa de hepatócitos citoplasmático e presença de gotículas lipídicas, bem como a redução das concentrações de resistina em ratos macho (ZUO *et al.*, 2011). Penza *et al.*, (2011) relataram uma produção de aumento do transiente no peso do tecido adiposo, tamanho dos adipócitos e variabilidade da forma em ratas fêmeas.

1.4.1 Efeitos vasculares

Penninks (1993) propôs uma quantidade de ingestão diária tolerável para os seres humanos de 0,25 mg/Kg de peso corporal com base em estudos de imunotoxicidade. O limite tolerado de exposição ao TBT foi adaptado pela Organização Mundial de Saúde a 0,30 mg/kg (WHO, 2007). No entanto, o nosso laboratório relatou que uma dose mais baixa de TBT (100 ng/Kg) foi capaz de reduzir a reatividade vascular da aorta em ratas fêmeas, aumentar produção de $O_2^{\cdot-}$ e deposição de colágeno na artéria aorta após exposição durante quinze dias (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Apesar de vários estudos mostrarem a toxicidade sistêmica de TBT, poucas investigações relataram o efeito de TBT no sistema cardiovascular.

1.5 REGULÇÃO DA REATIVIDADE DE AORTA

1.5.1 Fatores envolvidos na regulção do tônus vascular

Fatores derivados do endotélio associados com a ação das células do músculo liso vascular (CMLVs) desenvolvem uma função importante no controle da resistência periférica, sendo o seu estado contrátil determinante para o diâmetro do lúmen arterial, o que influenciará o fluxo e a pressão sanguínea (MULVANY & HALPERN, 1977).

Interações entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores através dos fatores derivados do endotélio, de neurotransmissores, de hormônios, e a própria pressão sanguínea regulam a contração das CMLVs (JACKSON, 2000; BLAUSTEIN & HAMLYN, 2010).

A fim de deflagrar a contração do músculo liso vascular, as CMLVs requerem um aumento na concentração de cálcio (Ca^{2+}) citoplasmático. Resultando em provável aumento tanto do influxo do Ca^{2+} através de canais específicos da membrana citoplasmática, como na liberação dos estoques intracelulares e retículo sarcoplasmático. Desta forma, a oferta do Ca^{2+} à maquinaria contrátil será aumentada (LINCOLN *et al.*, 2001).

Na regulção do tônus vascular também temos as ações de numerosos fatores vasodilatadores e vasoconstritores produzidos pelas células endoteliais, além de fatores responsáveis pela manutenção do balanço entre a promoção e a inibição da proliferação e migração das CMLVs, além de prevenir a agregação plaquetária e a trombose (FELETOU & VANHOUTTE, 2009; MILLER *et al.*, 1985).

Com relação aos fatores vasoconstritores liberados pelo endotélio podemos destacar os derivados do ácido araquidônico, o tromboxano (TXA_2) e as prostaciclina H_2 e prostaglandinas $\text{F}_{2\alpha}$ (PGH_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$) (FROLICH & FORTERMANN, 1989) $\text{O}_2^{\cdot-}$ (RUBANY & VANHOUTTE, 1986; VANHOUTTE, 1988; YANAGISAWA *et al.*, 1988), a endotelina-1 (YANAGISAWA *et al.*, 1988) e a angiotensina II (SKEEGS *et al.*, 1954; VELTMAR *et al.*, 1991). Como os principais

mediadores do relaxamento da musculatura lisa vascular podemos destacar o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980; FURCHGOTT, 1983; HUTCHINSON *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1987a; PALMER *et al.*, 1987), a prostaciclina (PGI₂) (MONCADA *et al.*, 1976) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FELETOU & VANHOUTTE, 1988).

1.5.2 Óxido Nítrico (NO)

O NO é um radical livre inorgânico altamente reativo, além de ser um gás solúvel, o que o permite difundir facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação. Dentre os componentes vasodilatadores liberados pelo endotélio, o NO é um dos mais importantes, sendo fundamental na manutenção da homeostase dos vasos, incluindo a modulação do tônus vascular através do seu potente efeito vasodilatador. Este radical livre está envolvido na regulação do crescimento celular, além de possuir ação inibitória sobre a adesão, agregação plaquetária (MONCADA *et al.*, 1991; CANNON III, 1998) e contribui na manutenção da fluidez sanguínea e exerce seu papel regulador da homeostase vascular unicamente na interface da superfície luminal das células endoteliais e do sangue, pois é rapidamente captado pela hemoglobina dos eritrócitos e é inativado pelos radicais livres, tais como o O₂⁻ (MARUMO *et al.*, 1999).

Para gerar NO, o endotélio necessita da presença de alguns cofatores como: L-arginina, oxigênio (O₂), NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida), grupamento heme e tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e Ca²⁺ (BREDT *et al.*, 1991; STEVENS-TRUSS *et al.*, 1997; ANDREW & MAYER, 1999). Este composto é sintetizado por ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que além de catalisar a produção do NO a partir do aminoácido L-arginina. O relaxamento da musculatura lisa adjacente resulta da ativação da guanilil ciclase solúvel pelo NO (PALMER *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1991; TRIGGLE *et al.*, 2003; BIAN & DOURSOUT, 2008; MICHEL & VANHOUTTE, 2010).

Esta síntese é induzida por vários estímulos físicos e químicos, como estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de

cisalhamento (*shear stress*), substância P, agregação plaquetária, histamina, serotonina, acetilcolina (ACh), entre outros (ANDREW & MAYER, 1999; MARÍN & RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 1997; MONCADA, PALMER & HIGGES, 1991).

Existe forte correlação com a biodisponibilidade de NO e aumento da produção de EROs. Entretanto, alguns autores relatam que a biodisponibilidade de NO está normal ou até mesmo elevada, embora sua degradação esteja potencializada devido ao aumento na produção de radicais livres em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (BRIONES *et al.*, 2002). Outros autores relatam que a biodisponibilidade de NO se encontra reduzida em doenças cardiovasculares (KERR *et al.*, 1999; FROSTERMANN & MUNZEL, 2006). A diminuição da síntese de NO ocorre principalmente pela reação do NO com $O_2^{\cdot-}$ produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$), que influencia as doenças cardiovasculares (FROSTERMANN & MUNZEL, 2006; TAKAYA *et al.*, 2007).

Rodrigues *et al.*, (2014) relataram que a exposição ao TBT (100 ng/kg) durante quinze dias induz a disfunção endotelial e reduz a biodisponibilidade de NO, além de aumentar a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela via NADPH oxidase.

1.5.3 Participação das espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) na disfunção endotelial

Em alguns estados patológicos, ocorre um aumento das EROs que são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, enzimas da via do ácido araquidônico (lipoxigenase e cicloxigenase), xantina oxidase, NADPH oxidase, NOS desacoplada, citocromo P-450, mecanismo de defesa dos fagócitos, a xantina oxidase e mieloperoxidases (CAI & HARRISON, 2000; MUELLER *et al.*, 2005; BEDARD & KRAUSE, 2007; KOH, OH & QUON, 2009; WESELER & BAST, 2010).

Ademais, as EROs, não promovem somente consequências tóxicas no metabolismo celular em processos patológicos induzindo danos a estruturas biológicas, mas são participantes essenciais na sinalização e na regulação celular em baixas concentrações. Além disso, as EROs, também participam na regulação

fisiológica de vários mecanismos moleculares, inclusive nas células endoteliais, na sinalização e na regulação celular, participando da sinalização intracelular, mudança de transcrição gênica e síntese de proteínas (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2000; NDIAYE *et al.*, 2004; ANSELM *et al.*, 2007).

No sistema vascular, o $O_2^{\cdot-}$ assume importante ação entre as EROs, sendo formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases, além de também da NOS desacoplada (FÖRSTERMANN & SESSA 2012). Estudos demonstram que a NADPH oxidase é uma importante fonte $O_2^{\cdot-}$ em vasos patológicos (GRIENGLING *et al.*, 2000; CAI, 2005; HAMILTON *et al.*, 2002; GARRIDO & GRIENGLING, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011), sendo descritas sete isoformas; cada uma delas constituídas por uma subunidade catalítica (NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4, NOX5, DUOX-1 e DUOX-2) e um máximo de cinco subunidades reguladoras (p22phox, DUOXA1, DUOXA2, p67phox, NOXA1, p47phox, NOXO1 e p40phox) que participam da ativação e organização espacial dos distintos componentes da enzima (DRUMMOND *et al.*, 2011). Após a formação de $O_2^{\cdot-}$, o mesmo passa por reações e torna-se fundamental na produção de outras espécies reativas: ONOO⁻ e radicais hidroxila (OH[•]) (MILLER *et al.*, 1998; BEAL, 2002; GRIEDLING & FITZGERALD, 2003; STREHLOW *et al.*, 2003; TANIYAMA & GRIENGLING, 2003; CAI, 2005). Ademais, a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela NADPH oxidase determina a severidade da disfunção endotelial podendo caracterizar experimentalmente e clinicamente o perfil do risco cardiovascular (GUZIK *et al.*, 2000). As células endoteliais expressam NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5, já as células musculares lisas expressam NOX-1, NOX-4 e NOX-5 e macrófagos e monócitos fundamentalmente NOX-2. As principais subunidades que contribuem para a produção do estresse oxidativo vascular em patologias cardiovasculares NOX-1 e NOX-2 (DRUMMOND *et al.*, 2011).

Estudos demonstram a presença de EROs em todas as células vasculares, em particular nos fibroblastos da camada adventícia, CMLs e endoteliais (MUNZEL *et al.*, 2002). A localização vascular destas espécies reativas depende da natureza do estímulo e da patologia associada (WOLIN *et al.*, 2002). De fato, uma produção importante de EROs foi observada no endotélio vascular em modelos animais e humanos com diabetes (HINK *et al.*, 2001; GUZIK *et al.*, 2002), também em modelos de hipertensão arterial, como o “DOCA-sal” (CAI & HARRISON, 2000). Uma

produção aguda de EROs pelas células musculares lisas foi relatada nos modelos de aterosclerose em coelho (MILLER *et al.*, 1998).

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre pelas subunidades da NADPH (NOX-4, DUOX-1 e DUOX-2). Além disso, através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) o ânion superóxido é dismutado em H_2O_2 , o qual pode ser convertido em água por ação da catalase. A catalase é uma enzima envolvida na degradação do H_2O_2 a água (H_2O) e O_2 é um importante antioxidante intracelular, considerado mais efetivo quando o estresse oxidativo está aumentado (CAI, 2005; SINDHU *et al.*, 2005).

O H_2O_2 pode atuar como segundo mensageiro, mediando respostas que levam o crescimento do músculo liso vascular, migração celular, apoptose e respostas inflamatórias (GRIEDLING & FITZGERALD, 2003; CAI, 2005). O H_2O_2 pode ser também metabolizado pelas mieloperoxidases e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou reagir com metais de transição dando origem ao $OH\cdot$. Dentre as EROs, o $O_2^{\cdot-}$ e $OH\cdot$ são os mais instáveis e reativos, enquanto H_2O_2 é a mais estável (GRIEDLING, SORESCU & USHIO-FUKAI, 2000; SZOCS *et al.*, 2002; TANIYAMA & GRIEDLING, 2003). Em mamíferos foram identificadas três isoformas da SOD: a SOD cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1), SOD mitocondrial (Mn SOD; SOD2) e a SOD extracelular (ECSOD; SOD3). A isoforma mais encontrada em tecido vascular é a ECSOD, uma glicoproteína, produzida em fibroblastos e células gliais. Esta família cataliza a reação do $O_2^{\cdot-}$ com um elétron e dois prótons formando o H_2O_2 (MCINTYRE *et al.*, 1999; GRIEDLING & FITZGERALD, 2003; TANIYAMA & GRIEDLING, 2003).

O aumento da produção de EROs provoca diminuição da biodisponibilidade de NO, pode levar à apoptose, aumento adesão de monócitos e angiogênese, no endotélio, enquanto que no músculo liso vascular, o aumento de estresse oxidativo pode gerar crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (TANIYAMA & GRIEDLING, 2003). Todas estas características contribuem para lesão vascular, disfunção endotelial e conseqüentemente para a fisiopatologia da hipertensão arterial (KERR *et al.*, 1999; CRUZADO *et al.*, 2005).

Apesar de o organismo sintetizar grandes quantidades de EROs em condições patológicas, ele também produz substâncias antioxidantes que inativam as EROs, levando assim, ao equilíbrio desse sistema. Desse modo, um desequilíbrio, no qual substâncias pró-oxidantes se sobrepõem à capacidade antioxidante do organismo gera o estresse oxidativo. Além disso, as EROs ativam metaloproteinases e possibilitam uma inclinação do balanço endotelial para a produção de fatores vasoconstritores, os quais possuem papel fundamental na patogênese de enfermidades vasculares (GRIENGLING & FITZGERALD, 2003).

1.5.4 Efeito do Estrogênio (E₂) sobre a reatividade vascular

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte entre mulheres nos Estados Unidos, e a doença cardíaca coronária, se desenvolve em mulheres, em média, 10 anos mais tarde do que nos homens (XING *et al.*, 2009). Este atraso tem sido atribuído, em parte, para os efeitos protetores dos hormônios sexuais femininos, particularmente o E₂ (ativadores naturais de receptores de E₂ que ocorrem antes da menopausa) (BARTON *et al.*, 2007).

Este hormônio tem efeitos antiinflamatórios e vasoprotetores, quando administrado em mulheres jovens ou animais experimentais, também modula a expressão do fator de crescimento e estresse oxidativo em artérias com lesão aguda e em outras formas de patologias vasculares, através da alteração da expressão ou a ação de vários fatores de crescimento, moléculas de adesão e quimiocinas, em tipos de células relevantes na parede do vaso (XING, 2009).

Existe uma associação entre o E₂ e aumento da biodisponibilidade de NO relacionadas à suas propriedades antioxidantes, por meio de receptor de estrogênio (RE), via ativação de proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fosfolipase-C, envolvendo fator de crescimento de fibroblastos (ARNAL *et al.*, 2004). Estudo realizado em arteríolas coronarianas mostrou que tratamento com E₂ aumentou a expressão da SOD-1 (KANG *et al.*, 2011). Strehlow *et al.*, (2003) demonstraram que o E₂ pode aumentar a expressão proteica e do RNAm das isoformas da enzima SOD mitocondrial e extracelular (SOD-2 e 3 respectivamente),

além da atividade dessa enzima, *in vivo* e *in vitro*. Em modelo experimental utilizando células endoteliais bovinas, o tratamento com E₂ foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e apoptose induzida por tratamento com H₂O₂ (SONG *et al.*, 2009). Considerando a importância da ação do E₂ em vasos e a ação do TBT inibindo a aromatase, se fez necessário estudar os possíveis danos provocados pela exposição a este xenobiótico em anéis de aorta de ratas.

1.5.5 Hipótese

No presente estudo foi analisada a reatividade vascular *in vitro* em anéis de aorta de ratas expostas ao TBT, a fim de testar a hipótese de que a exposição ao TBT (500 ng/kg) é capaz de induzir alterações de reatividade vascular devido ao aumento de estresse oxidativo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição durante quinze dias ao TBT (500 ng/kg) sobre a reatividade vascular da aorta de ratas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da exposição ao TBT sobre o ganho de peso corporal e peso das câmaras ventriculares.

- Investigar efeitos da exposição ao TBT (500 ng/kg) em segmentos isolados de aorta torácica sobre:

- A reatividade vascular à fenilefrina;
- A participação endotelial na resposta vascular à fenilefrina;
- O relaxamento dependente e independente do endotélio;
- A participação do óxido nítrico, das EROs $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , da NADPH oxidase e xantina oxidase na reatividade vascular à fenilefrina.

- Investigar efeitos da exposição ao TBT na morfologia da aorta torácica.



MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS:

Foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação, pesando entre 230 e 250 g, idade de 12 semanas, com ciclo estral normal, armazenadas em gaiolas com no máximo quatro animais, em temperatura entre 23-25° C, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação, onde tiveram livre acesso à ingestão de água e ração. Todos os protocolos desenvolvidos foram aprovados pela Comissão de Ética para pesquisa com animais (CEUA-UFES 020/2009).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, denominados: Controle e TBT. O grupo controle recebia diariamente gavagem com solução de TBT diluída em 99,6% de água e de 0,4% etanol durante quinze dias. Os animais pertencentes ao grupo TBT recebiam TBT (500 ng/kg) (96% de pureza) pm= 325,5, Aldrich Milwaukee, USA), via gavagem durante quinze dias.

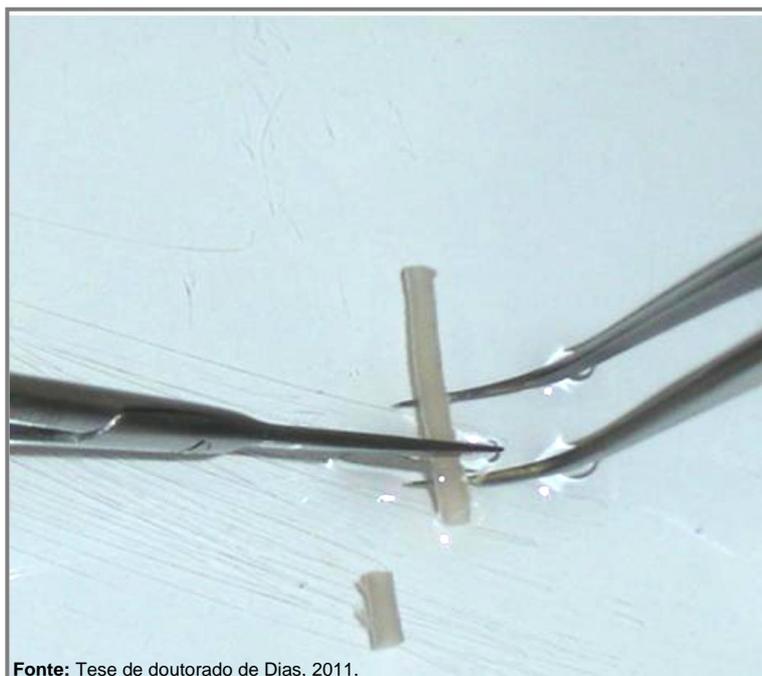
3.3 AVALIAÇÃO PONDERAL

No início e no fim do tratamento os ratos dos grupos Controle e TBT foram pesados para avaliação do ganho ponderal. Os corações dos ratos de ambos os grupos, tiveram seus ventrículos direito e esquerdo separados e posteriormente pesados. O procedimento de dissecação dos ventrículos foi realizado pelo mesmo pesquisador, com cuidado na equidade da conduta. Todas as pesagens foram realizadas na mesma balança.

3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Preparação dos anéis de aorta

Após quinze dias de tratamento os animais foram anestesiados com Ketamina (50 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) i.m., o tórax foi aberto o diafragma cortado e a aorta torácica foi retirada e colocada em uma placa de Petri com solução de Krebs (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; Mg SO_4 1,2; KH_2PO_4 1,17; NaHCO_3 25; EDTA 0,01 e glicose. As artérias foram divididas em segmentos cilíndricos de 3-4 mm de comprimento, livres dos tecidos conectivos e adiposo (Figura 4) (ANGELI *et al.*, 2011).



Fonte: Tese de doutorado de Dias, 2011.

Figura 4: Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, após a remoção do tecido conjuntivo e adiposo adjacente à artéria e dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.

3.4.2 Obtenção dos registros para estudo da reatividade vascular em anéis de aorta.

Cada anel da aorta torácica foi colocado em um banho com temperatura constante a 37 °C, contendo 5 mL de solução de Krebs continuamente aerada com mistura carbogênica, mantendo um pH estável de 7,4. Duas hastes metálicas foram passadas através do lúmen dos segmentos, sendo que uma foi fixada à parede da cuba e outra conectada verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (FT03, Grass). A tensão foi registrada através do transdutor de força conectado ao sistema de aquisição de dados (BIOPAC, modelo MP100), e este a um computador (Figura 5).

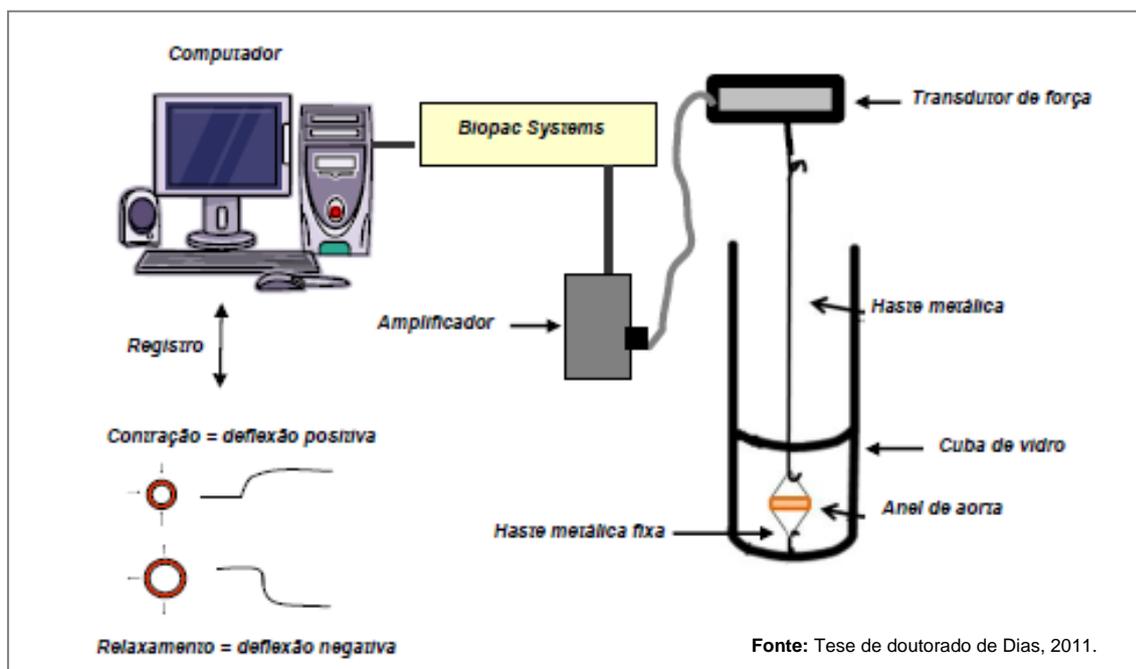


Figura 5: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems. Modificado de Dias, 2007.

3.4.3 Avaliação funcional dos anéis isolados de aorta

Após o período de 45 minutos de estabilização permanecendo na tensão de 1 g (Figura 6 A), foi adicionado ao banho cloreto de potássio (KCl) 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização (Figura 6 B). Ao atingir 1g de força, estes anéis foram lavados com solução de Krebs e os anéis que não contraíram foram descartados (Figura 6 C). Após 30 minutos de estabilização (Figura 6 D), uma nova dose de KCl 75 mM foi adicionada ao banho (Figura 6 E) e aguardado aproximadamente 30 minutos para atingir um platô no registro de contração (Figura 6 F). Após o platô, os anéis foram novamente lavados (Figura 6 G) e estabilizados por aproximadamente 35 minutos, (Figura 6 H) sendo submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.4.4 Avaliação da integridade funcional do endotélio

Após o período de estabilização, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-8} a 10^{-7} M (Figura 6 I) até atingir entre 50 a 75 % da contração obtida ao KCl para sensibilizar a preparação e, assim testar a sua viabilidade. Ao fim da contração (platô) (Figura 6 J), uma única dose de ACh 2×10^{-6} M foi dada testando assim a integridade endotelial dos anéis (Figura 6 K); os anéis com relaxamento menor que 85 % eram descartados e os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10 % ou até contraíram.

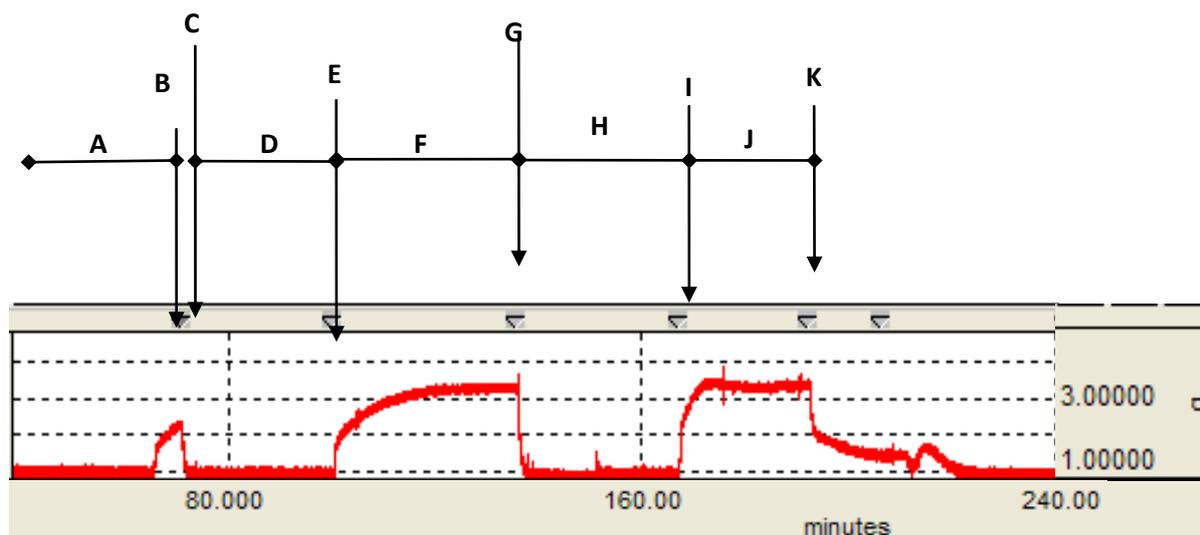


Figura 6: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina 10^{-7} M; J) Platô da contração induzida pela fenilefrina; K) Adição de acetilcolina (ACh) 2×10^{-6} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias, 2011).

Avaliação da participação do endotélio ao relaxamento

A retirada do endotélio vascular, nos grupos sem endotélio, foi realizada mecanicamente através de uma haste metálica que foi introduzida no lúmen do vaso seccionado, cuidadosamente para que não houvesse prejuízo ao músculo liso.

3.4.6 Avaliação indireta da liberação basal de óxido nítrico (NO)

A liberação basal de NO foi avaliada indiretamente pelo aumento dependente do endotélio, na contração à fenilefrina induzida pelo inibidor não seletivo da enzima NOS o L-N^G-nitroarginina metil ester (L-NAME) adicionado ao banho na dose de 100 µM, 30 minutos antes do início da curva concentração-resposta à fenilefrina.

3.4.7 Avaliação da resposta de relaxamento dependente de endotélio

Para avaliação da resposta de relaxamento dependente do endotélio foi administrada fenilefrina 10^{-8} a 10^{-7} M para pré-contração dos anéis, de modo a atingir de 50 a 75 % da contração máxima obtida durante a construção da curva de KCl. A seguir, doses crescentes de ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} M) foram adicionadas ao banho de modo a se construir uma curva concentração-resposta à ACh em porcentagem da contração.

3.4.8 Avaliação da resposta de relaxamento independente do endotélio

Para avaliação da resposta de relaxamento dependente do músculo liso vascular foi administrada fenilefrina de 10^{-8} a 10^{-7} M para pré-contração dos anéis, de modo a atingir entre 50 a 75% da contração máxima obtida durante a construção da curva de KCl. A seguir, doses crescentes de nitroprussiato de sódio (10^{-11} – 3×10^{-7} M) foram adicionadas ao banho de modo a se construir uma curva concentração-resposta à nitroprussiato de sódio em porcentagem da contração.

3.4.9 Avaliação da participação de radicais livres

Para verificar o envolvimento de EROs na resposta contrátil à fenilefrina após exposição de TBT foram utilizados agentes antioxidantes: apocinina (APO, 30 µM) é um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, (SOD, 150 U/ml) é um importante antioxidante fisiológico que converte $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , (catalase, 1000 U/ml) um

varredor de H_2O_2 , (tiron, 1 mM) um varredor de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e (alopurinol 100 μM) um inibidor seletivo da xantina oxidase.

3.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

3.5.1 Mensuração hormonal

Para a mensuração das concentrações circulantes de hormônio sexual o sangue da aorta abdominal foi coletado anteriormente à remoção da aorta torácica. O sangue coletado foi centrifugado a 825 x g a 4°C por 10 minutos para a obtenção do soro que foi estocado à -20°C para a mensuração de E₂ por radioimunoensaio (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

3.5.2 Mensuração de homogeneizado de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada usando a concentração TBARS. O tecido adiposo foi removido manualmente da aorta e descartado, sendo em seguida transferido para um Eppendorf de 1,5 ml contendo tampão de extração (tampão de fosfato de sódio 50 mM gelado, pH 7,4) com um inibidor de protease. A amostra foi homogeneizada com homogeneizador (Turrax NT1338) a 4° C. O homogenato foi centrifugado a 825 x g a 4° C durante 15 min e o sobrenadante foi armazenado a -80 ° C até ao ensaio da peroxidação lipídica.

Alíquotas (0,05 ml) de cada homogenato foram misturados com 0,25 mL de uma solução a 1% de ácido tiobarbitúrico, aquecida a 90° C durante 2 horas e a absorção foi medida a 532 nm (MA *et al.*, 2003). Os valores de TBARS finais foram expressos utilizando o coeficiente de extinção de 156 mM⁻¹cm (HERMES-LIMA *et al.*, 1995).

O teor de proteína foi determinado no homogenato pelo kit de ensaio de Bradford (Sigma Aldrich), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

3.6.1 Preparação do tecido

Os corações foram perfundidos com salina contendo heparina (10 U/mL) via ventrículo cardíaco esquerdo seguido de infusão com PBS-formalina. A aorta foi removida e dissecada manualmente em anéis de 3 a 4 mm, n= 5 por grupo, fixado em PBS-formalina, em pH de 7.4, de 24 a 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, o tecido foi desidratado em etanol graduado, limpos em xilol, embebidos em parafina a 60 °C e cortados em fatias de 5 µm. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina para visualização das túnica vasculares da aorta (BARREIRA et al., 2009). O Processamento e análise microscópica foram realizados no Laboratório de LUCCAR da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.

3.6.2 Histomorfometria

O sistema de análise de imagem por histomorfometria foi composto por uma câmera digital (Axio-Cam ERC 5S) acoplada a um microscópio de luz (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA). Imagens de alta resolução (2048 × 1536 pixels tampão) foram capturadas com uma Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8. Fotomicrografias foram obtidas usando uma objetiva de 10x, e a espessura da parede da aorta (que incluía todas as túnica/campo vascular) e a área da parede da aorta foram calculados com a ferramenta de medida de área de AxioVision Rel. 4.8. Os resultados representam a espessura e a área da parede da aorta, e são expressos como \pm erro padrão da média (EPM).

3.6.3 Densidade da superfície de colágeno

As aortas foram retiradas delicadamente, lavadas em solução de Krebs, dissecadas do tecido conjuntivo e gordura, e fixadas imediatamente em solução tamponada de paraformaldeído 4% por 48 horas. Após a fixação, as aortas foram desidratadas em solução de álcool a 70%, permanecendo por 1 hora, trocado sucessivamente para álcool a 80%, 90% e álcool absoluto por 3 vezes. A seguir foi feita a clarificação com xilol puro, com 3 banhos de 30 minutos cada. A infiltração foi feita com parafina líquida a 60°C por 90 minutos. O material foi incluído em parafina líquida à temperatura ambiente, e cortado transversalmente em um micrótomo (LEICA RM2125), a uma espessura de 5 micrômetros. Esses cortes foram colocados em banho-maria a temperatura de 37-40°C, para a abertura e planificação. Para cada animal foram feitas duas lâminas, com 20 cortes em cada, e com distância de 100 micrômetros entre eles. Os cortes corados com Picosírius red seguiram o protocolo: Xilol (3 banhos de 5 minutos cada), Álcool-50% Xilol (5 minutos), Álcool absoluto (3 banhos de 5 minutos cada), Solução de Picosírius (1 hora), lavagem em água corrente, álcool absoluto (3 banhos de 5 minutos cada), Álcool-50% Xilol (5 minutos), Xilol (3 banhos de 5 minutos cada) e montagem com DPX. As fotos foram obtidas na objetiva de 20x com a Câmera AxioCam ERc5s acoplada ao Microscópio Olympus AX70. As análises de 15 fotomicrografias foram realizadas pelo Programa ImageJ, em áreas escolhidas aleatoriamente, evitando-se as áreas sem todas as túnicas vasculares. Os resultados representam a porcentagem de colágeno na superfície total da parede da aorta, e é expressa como a média \pm EPM, como descrito por DOS SANTOS *et al.* (2012).

3.6.4 Microscopia eletrônica de varredura

Aortas de ratas dos grupos Controle e TBT foram coletadas, lavadas e abertas longitudinalmente na temperatura ambiente durante 10 min com PBS e fixado com glutaraldeído a 2,5%. As aortas foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 3,8% e 2,5 mM de CaCl₂, desidratada em acetona e embebida em Epon 812. Seções ultrafinas foram coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e foram examinados por um microscópio Zeiss EM 10C. Por microscopia eletrônica de varredura, esferóides secaram no ponto crítico,

revestido com uma camada de 20 nm de ouro e examinadas sob um microscópio Zeiss 940 DSM (DOS SANTOS *et al.*, 2012).

3.6.5 Detecção de ânion superóxido “in situ”

Concentrações de $O_2^{\cdot-}$ foram detectados nos criocortes aórticos (8 μM), na presença e na ausência de endotélio. O endotélio foi removido, esfregando suavemente a superfície da íntima com uma haste de aço inoxidável. Corte Tissue-Tek otimizado por temperatura (OCT) foram deixados descongelar e incubadas com corante dihidroetídio (DHE, 2 μM) sensível a fluorescente $O_2^{\cdot-}$ a 37°C durante 30 minutos no escuro. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência confocal (Leica DM 2500). A fluorescência foi detectada à 585 nm. A intensidade do sinal no interior da camada média foi analisada em toda a circunferência das três secções do vaso por um investigador cego.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado o teste *t* de Student não-pareado. Foram calculadas as respostas máximas ($R_{\text{máx}}$) e o log da concentração necessária para produzir 50 % do efeito máximo a fenilefrina (pD_2). Para comparar o efeito da remoção do endotélio nas respostas à fenilefrina dos grupos, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas sob as curvas concentração-resposta (dAUC).

As análises morfométricas foram descritas como média \pm EPM o resultado foi normalizado usando o teste Kolmogorov Smirnov. As comparações entre os grupos foram feitas usando o teste *t* de Student não-pareado.

A mensuração da geração de EROs na aorta foi descrita como média \pm EPM. Os dados foram testados por análise de variância (ANOVA) uma via e quando encontrada diferença estatística o teste *post hoc* de Dunn's múltiplas comparações. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

3.8 DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS:

Acetilcolina, cloridrato (Sigma)

Ácido Tiobarbitúrico (Alfa Aesar)

Alopurinol (Sigma)

Bicarbonato de Sódio (Merck)

Catalase (Sigma)

Citrato de Sódio (Reagen)

Cloreto de Magnésio Heptahidratado (Merck)

Cloreto de Potássio (Merck)

Cloreto de Sódio (Merck)

Cloreto de Tributilestanho (Sigma)

Dihidroetidio (Sigma)

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Hoescht)

Epon 812 (Sigma)

Etanol absoluto (Sigma)

Ferricianeto de potássio (Sigma)

Glutaraldeído (Sigma)

Fosfato de Potássio Monobásico (Cinética)

Fosfato de Sódio Monobásico (Merck)

Glicose (Reagen)

L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)

N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)

Nitroprussiato de sódio (NPS), dihidratado (Fluka)

Superóxido Dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)

Tetróxido de ósmio (Sigma)

Tiopental Sódico (Amental[®])

Tiron (Sigma)



RESULTADOS



4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE ESTROGÊNIO (E_2) NO SORO E GANHO PONDERAL DE RATAS.

Com o objetivo de avaliar as concentrações de E_2 das ratas dos grupos Controle e TBT, o sangue foi coletado e centrifugado. A exposição ao TBT durante quinze dias diminuiu consideravelmente as concentrações de E_2 no soro quando comparado com as concentrações de E_2 das ratas do grupo Controle (Tabela 2). A fim de avaliar o ganho de peso corporal das ratas dos grupos Controle e TBT, foi realizada a pesagem desses animais antes do início da exposição, durante e ao fim de quinze dias de exposição ao TBT. A mesma média de peso corporal no início e ao fim da exposição, além disso, não houve interferência da exposição com TBT ou solução etanólica 0,1% (veículo) no ganho de peso destas ratas (Figura 7; Tabela 2).

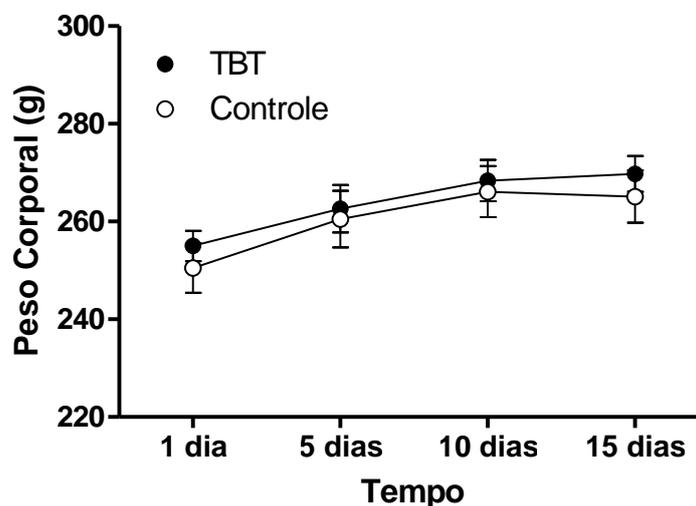


Figura 7: Avaliação do ganho ponderal nos grupos Controle (n=10) e TBT (n=10). Dados expressos em Média \pm EPM. $p > 0,05$, Teste t de Student não pareado.

Os corações foram cuidadosamente dissecados e seus ventrículos direito e esquerdo separados. Não houve diferença entre os pesos dos ventrículos corrigidos pelo peso corporal de cada rata (Figura 8; Tabela 2).

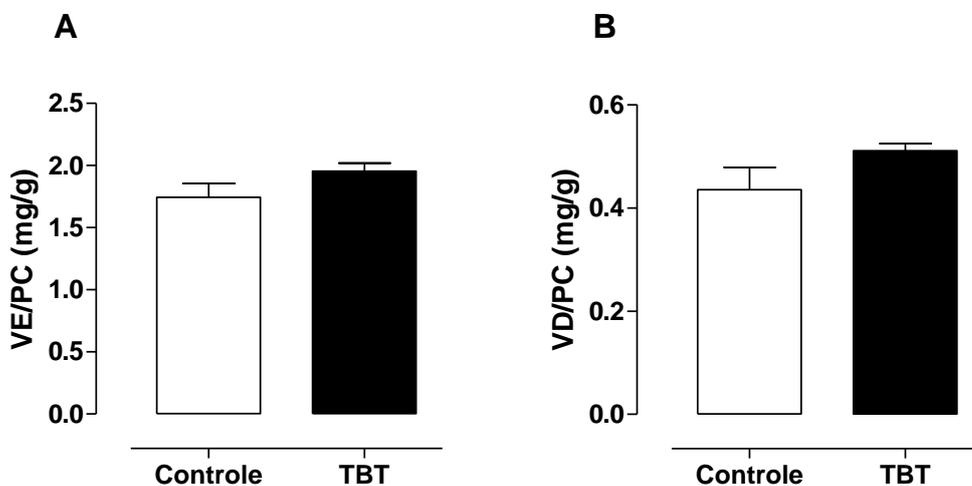


Figura 8: Avaliação ponderal das câmaras cardíacas em ratas dos grupos Controle (n=10) e TBT (n=10). A- Razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal das ratas (VE/PC); B- Razão do peso do ventrículo direito pelo peso corporal das ratas (VD/PC). Dados expressos em Média \pm EPM. $p > 0,05$, Teste *t* de Student não pareado.

Tabela 2: Dados da avaliação das concentrações do estrogênio (E2) no soro e dados ponderais das ratas dos grupos Controle e TBT.

	Controle	n	TBT	n	p
E ₂ (pg/ml)	47,2	4	19,9*	4	<0,05
PC- 1 dia (g)	250,5	10	251,3	10	> 0,05
PC- 5 dias (g)	260,5	10	262,6	10	> 0,05
PC- 10 dias (g)	266,1	10	268,3	10	> 0,05
PC- 15 dias (g)	265,1	10	267,4	10	> 0,05
VE/PC (mg/g)	1,7	10	1,9	10	> 0,05
VD/PC (mg/g)	0,4	10	0,4	10	> 0,05

Estrogênio (E₂); Peso corporal inicial (PC inicial); Peso corporal final (PC final); Peso ventricular esquerdo (VE); Relação peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (VE/PC); Peso ventricular direito (VD); Relação peso do ventrículo direito pelo peso corporal (VD/PC). Dados expressos em Média ± EPM. *p < 0,5, Teste t de Student não pareado.

4.2 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA.

A exposição dos segmentos arteriais ao KCl (75 mM) promoveu resposta contrátil com maior magnitude no grupo TBT (Controle: $2,34 \pm 0,06$; TBT: $3,48 \pm 0,17$ g, $n=10$, $p < 0,01$) (Figura 9).

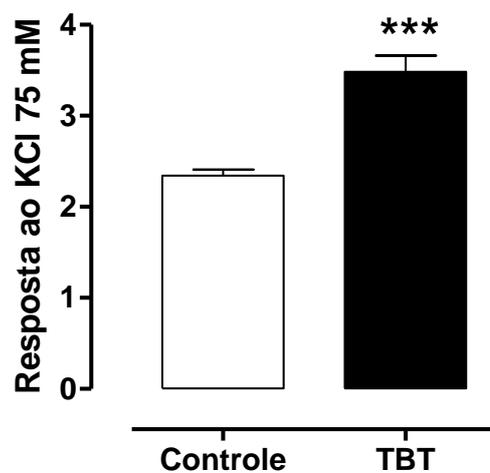


Figura 9: Avaliação das respostas dos anéis ao KCl em ratos dos grupos Controle ($n=10$) e TBT ($n=10$). Dados expressos em Média \pm EPM. *** $p < 0,001$, Teste t de Student não pareado.

4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATAS.

A fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos Controle e TBT (Figura 10). No entanto, a $R_{m\acute{a}x}$ foi com maior magnitude nos segmentos arteriais dos animais do grupo TBT (Tabela 3). Também houve diferença significativa entre os grupos Controle e TBT na pD_2 . A resposta à fenilefrina foi expressa em tensão desenvolvida em grama.

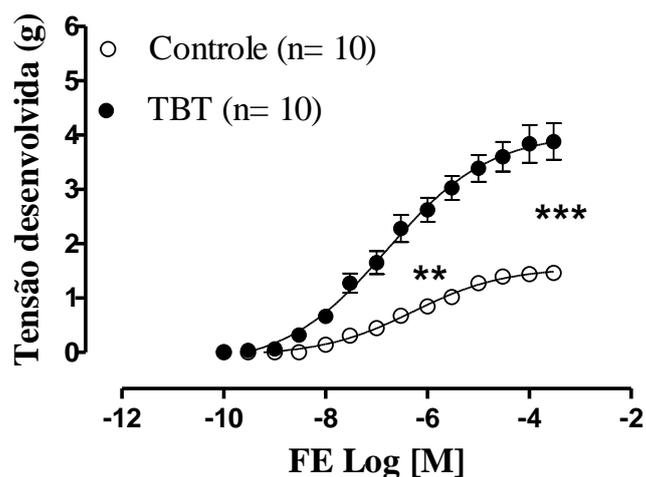


Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar nos grupos Controle e TBT. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t não pareado. ** $p < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Tabela 3: Valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratas Wistar dos grupos Controle e TBT.

	R _{máx} (g)	pD ₂
Controle	1,55 ± 0,09	-6,32 ± 0,09
TBT	4,01 ± 0,36 ***	-6,85 ± 0,14**

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não pareado. **p < 0,01 e *** p < 0,001.

4.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO NA MODULAÇÃO ENDOTELIAL SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATAS.

A remoção do endotélio nos anéis isolados de aorta dos grupos Controle (Figura 12 A) e TBT (Figura 12 B) aumentou a resposta contrátil à felinefrina nos dois grupos estudados, ou seja, desviou a curva concentração-resposta à fenilefrina para esquerda como esperado. No grupo Controle houve aumento da $R_{m\acute{a}x}$, enquanto no grupo TBT houve aumento da pD_2 à fenilefrina (Tabela 4; Figura 11).

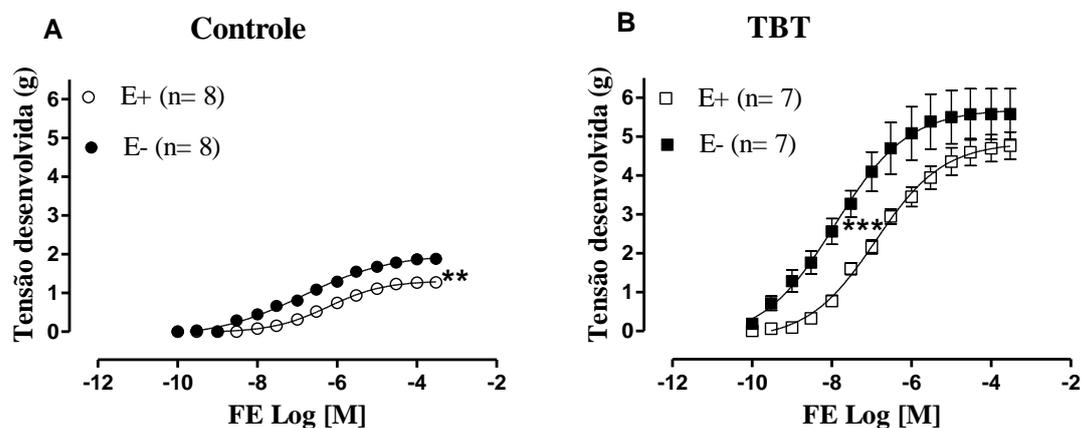


Figura 11: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle (E+) e após a retirada do endotélio (E-); (B) TBT (E+) e após a retirada do endotélio (E-). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t* não pareado. A análise foi realizada através do Teste *t* não pareado para comparações de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2); ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 4: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratas Wistar dos grupos Controle e TBT.

	R _{máx} (g)	pD ₂
Controle E+	1,30 ± 0,01	-6,28 ± 0,11
Controle E-	2,22 ± 0,28**	-6,63 ± 0,38
TBT E+	4,82 ± 0,36	-6,92 ± 0,11
TBT E-	5,74 ± 0,67	-8,03 ± 0,15***

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não pareado. **p < 0,01 e ***p < 0,001.

4.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO ENDOTÉLIO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).

A MEV de artérias aorta (Figura 12) revelou a superfície endotelial da aorta de ratas Controle com aparência escamosa normal (A). A exposição ao TBT durante quinze dias promoveu uma desnudação da superfície endotelial na aorta de ratas (B-B2), principalmente uma superfície irregular com acumulação de células vermelhas, plaquetas e fibrina na superfície endotelial desnudada (B2).

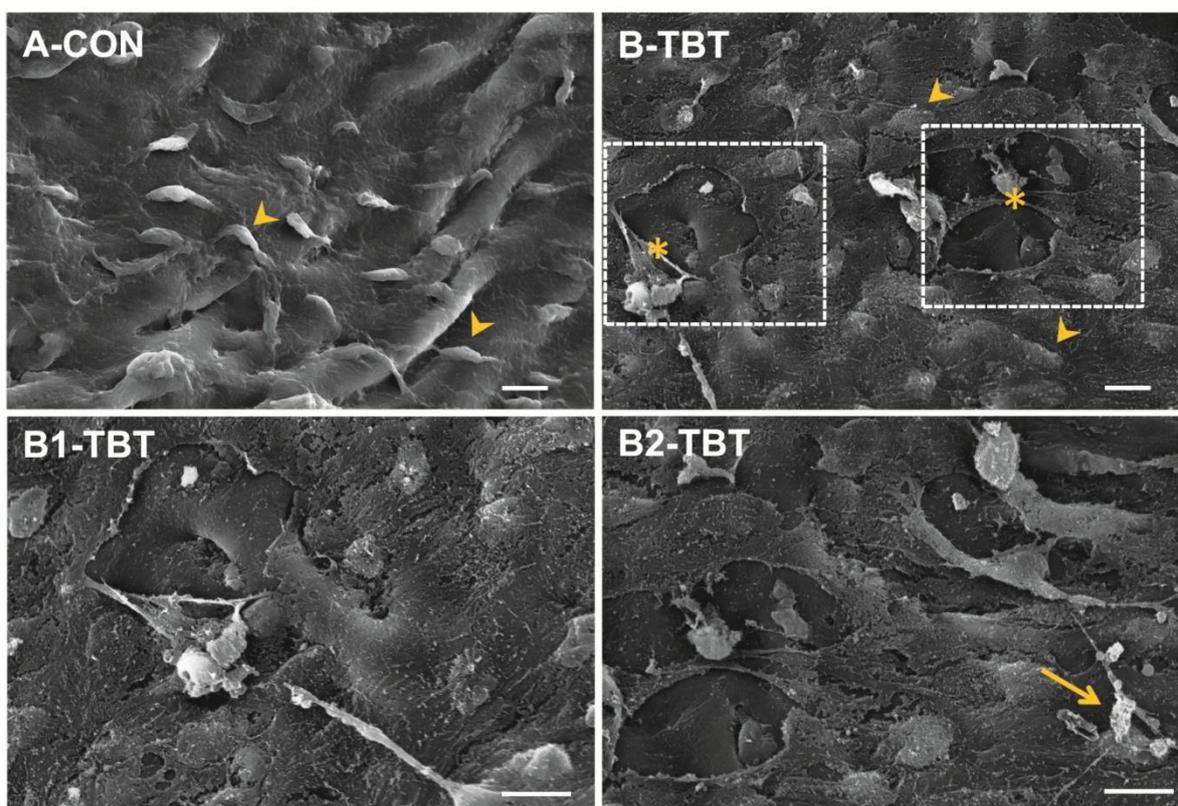


Figura 12: (A) Avaliação da superfície endotelial por microfotografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando a superfície endotelial de aorta de ratas do grupo Controle com aparência escamosa normal. A superfície endotelial de aorta de ratas do grupo TBT (B, B1 e B2) apresentando superfície endotelial desnudada (asterisco), principalmente uma superfície endotelial irregular com acúmulo de células vermelhas, plaquetas e fibrina em endotélio desnudado (seta). (A seta: célula endotelial, Barra=10 μ m).

4.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta à ACh. Como esperado, houve relaxamento concentração-resposta em todos os anéis isolados de aorta. Porém, a exposição por quinze dias com TBT promoveu uma diminuição do relaxamento dos anéis de aorta destes animais. Observamos diferença estatisticamente significante na $R_{m\acute{a}x}$ e na pD_2 entre os grupos estudados (Tabela 5; Figura 13).

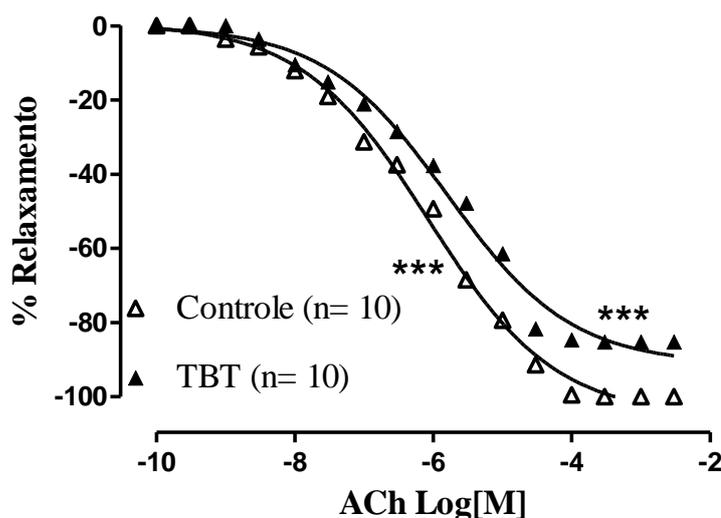


Figura 13: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t não pareado. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 5: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina (ACh) em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle e TBT. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	-105,3 ± 0,15	-6,07 ± 0,01
TBT	-91,26 ± 0,92***	-5,79 ± 0,02***

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não pareado. ***p < 0,001.

4.7 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do efeito induzido pelo NPS, que de maneira concentração dependente inibiu a contração induzida pela fenilefrina. A resposta ao relaxamento induzida pelo NPS foi diferente nos grupos estudados. Observamos diferença estatisticamente significativa nos valores de $R_{máx}$ e pD_2 do grupo TBT comparado com o grupo Controle (Tabela 6; Figura 14).

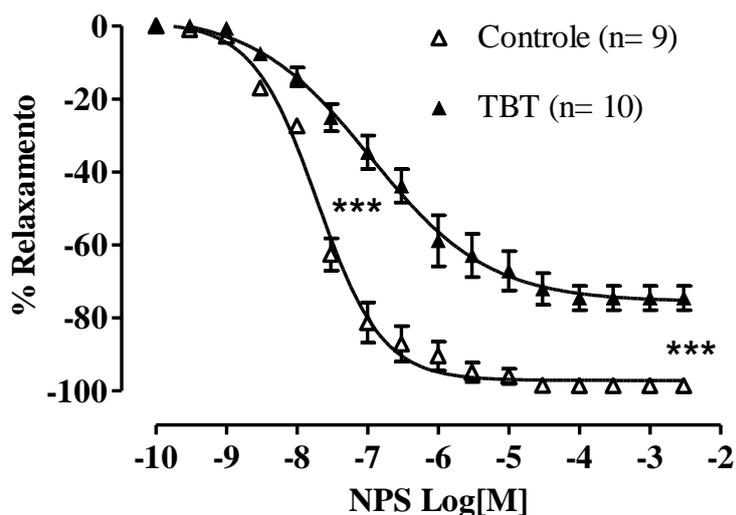


Figura 14: Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina. Teste *t* não pareado. ****p* < 0,001.

Tabela 6: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) induzida pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta intactos de animais dos grupos: Controle e TBT. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina.

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	-99,37 ± 1,65	-7,64 ± 0,08
TBT	-80,68 ± 2,78***	3,63 ± 0,57***

Valores expressos em média ± EPM; ***p < 0,001.

4.8 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NA EXPOSIÇÃO POR QUINZE DIAS COM TRIBUTILESTANHO SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que a exposição por quinze dias com TBT (500 ng/kg) foi capaz de aumentar a pD_2 e a $R_{m\acute{a}x}$ à fenilefrina e este aumento foi maior após a lesão endotelial em ambos grupos. Com a finalidade de avaliar a participação dos fatores endoteliais nessa resposta, foram realizados os protocolos a seguir com seus respectivos resultados.

4.8.1 Participação da via do óxido nítrico na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

Após o bloqueio da via do NO com L-NAME (100 μ M) ocorreu aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e TBT, aumentando tanto a $R_{m\acute{a}x}$, quanto a pD_2 à fenilefrina (Tabela 7; Figura 15 A). Todavia, no grupo TBT, esse aumento foi em maior magnitude (Tabela 7; Figura 15 B).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Assim, foi possível observar um aumento na biodisponibilidade de NO no grupo exposto ao composto (% dAUC CT= $55,69 \pm 12,95$ vs TBT= $102,68 \pm 16,78$ %, $p < 0,05$, Teste t) Figura 15 C.

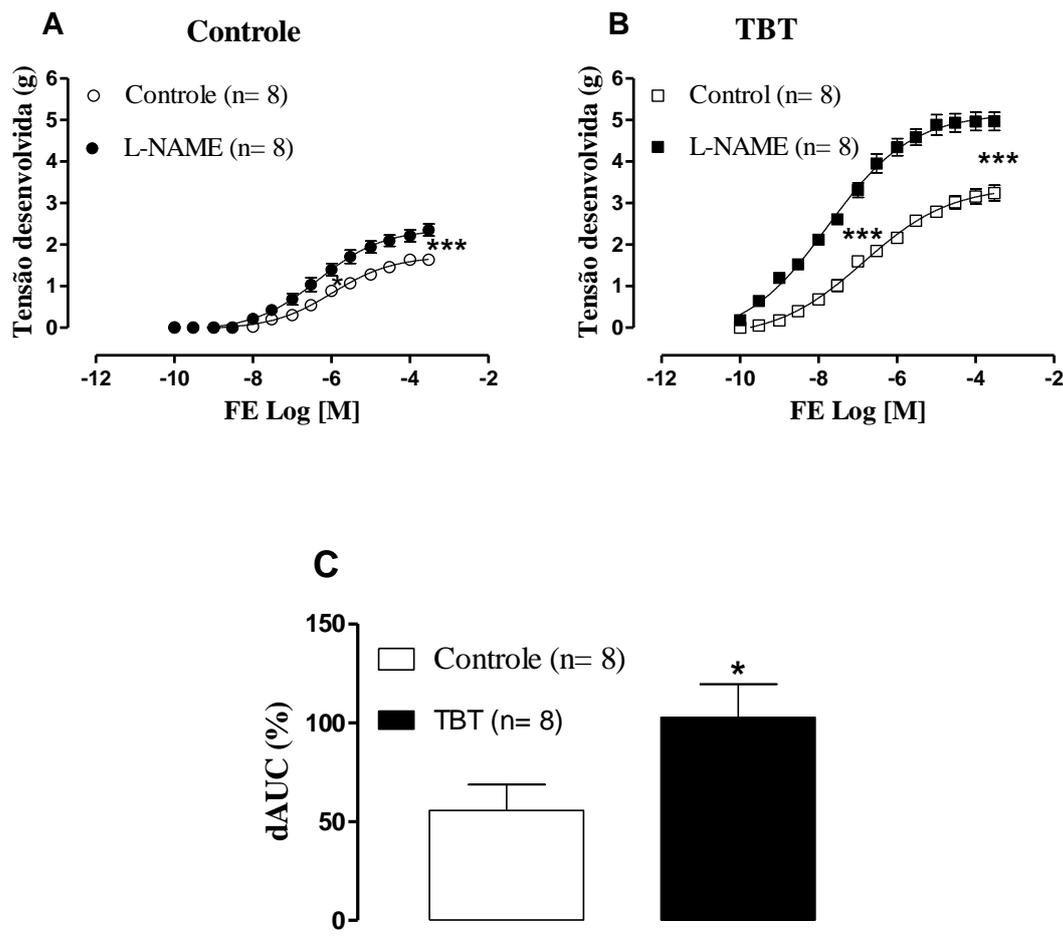


Figura 15: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Controle L-NAME); (B) TBT e após a incubação com L-NAME (TBT L-NAME); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos: Controle e Tributilestanho. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste *t* não pareado. **p* < 0,5 e ****p* < 0,001.

Tabela 7: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

	R _{máx} (g)	pD ₂
Controle	1,72 ± 0,04	-5,96 ± 0,02
Controle L-NAME	2,35 ± 0,14***	-6,33 ± 0,15*
TBT	3,47 ± 0,29	-6,79 ± 0,19
TBT L-NAME	5,24 ± 0,24***	-7,75 ± 0,07***

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não pareado. *p < 0,5, e ***p < 0,001.

4.8.2 Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

4.8.2.1 Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A apocinina (30 μM), não alterou a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta do grupo Controle (Figura 16 A). Todavia, houve uma redução da reatividade vascular no grupo exposto ao TBT por quinze dias (Figura 16 B) (Tabela 8).

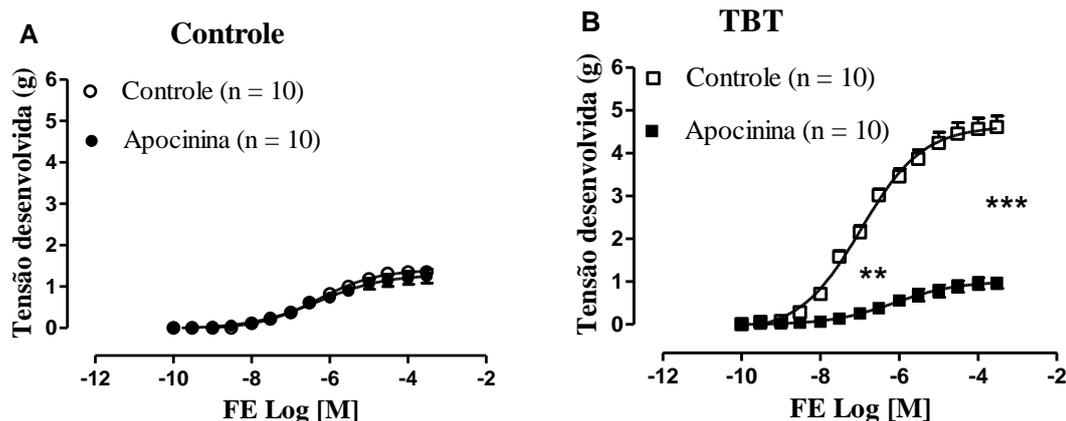


Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Apocinina (Controle Apo); (B) TBT e após a incubação com Apocinina (TBT Apo). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 8: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Apocinina (Apo).

	$R_{m\acute{a}x}$ (g)	pD_2
Controle	$1,39 \pm 0,08$	$-6,34 \pm 0,09$
Controle Apo	$1,30 \pm 0,18$	$-6,38 \pm 0,16$
TBT	$4,63 \pm 0,26$	$-6,75 \pm 0,11$
TBT Apo	$1,12 \pm 0,13^{***}$	$-5,68 \pm 0,30^{**}$

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não pareado. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.8.2.2 Influência da superóxido dismutase (SOD) na exposição por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A avaliação da presença do $O_2^{\cdot-}$ nas aortas isoladas foi realizada através da incubação de SOD ($150 U ml^{-1}$) no banho. A SOD não alterou a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta do grupo Controle (Figura 17 A). Entretanto,

houve uma redução da reatividade vascular no grupo tratado com tributilestanho por quinze dias tanto na pD_2 , quanto na $R_{m\acute{a}x}$ (Figura 17 B) (Tabela 9).

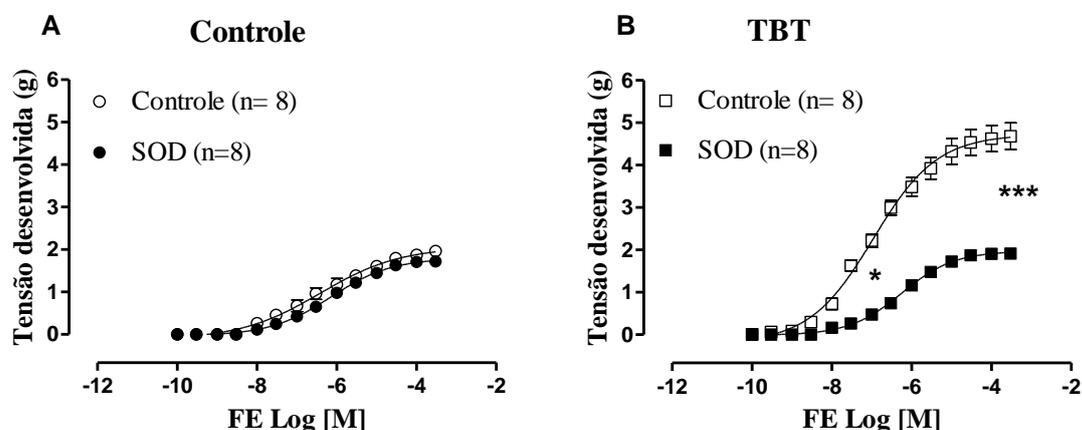


Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com SOD (Controle SOD); (B) TBT e após a incubação com SOD (TBT SOD). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; * $p < 0,5$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 9: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de SOD.

	$R_{m\acute{a}x}$ (g)	pD_2
Controle	$2,03 \pm 0,03$	$-6,45 \pm 0,23$
Controle SOD	$1,84 \pm 0,08$	$-6,14 \pm 0,20$
TBT	$4,73 \pm 0,32$	$-6,97 \pm 0,10$
TBT SOD	$1,94 \pm 0,06^{***}$	$-6,39 \pm 0,16^*$

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não pareado. * $p < 0,5$ e *** $p < 0,001$.

4.8.2.3 Influência da administração da catalase no tratamento por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A participação do H_2O_2 na resposta contrátil à fenilefrina foi avaliada em experimentos em que os anéis foram incubados com a catalase (1000 U/ml) e foi observada que houve alteração na resposta vascular à fenilefrina em ambos os grupos, porém no grupo Controle (Figura 18 A) apenas na $R_{m\acute{a}x}$ e no grupo tratado com tributilestanho por quinze dias houve uma redução da reatividade vascular na $R_{m\acute{a}x}$ e na pD_2 (Figura 18 B) (Tabela 10).

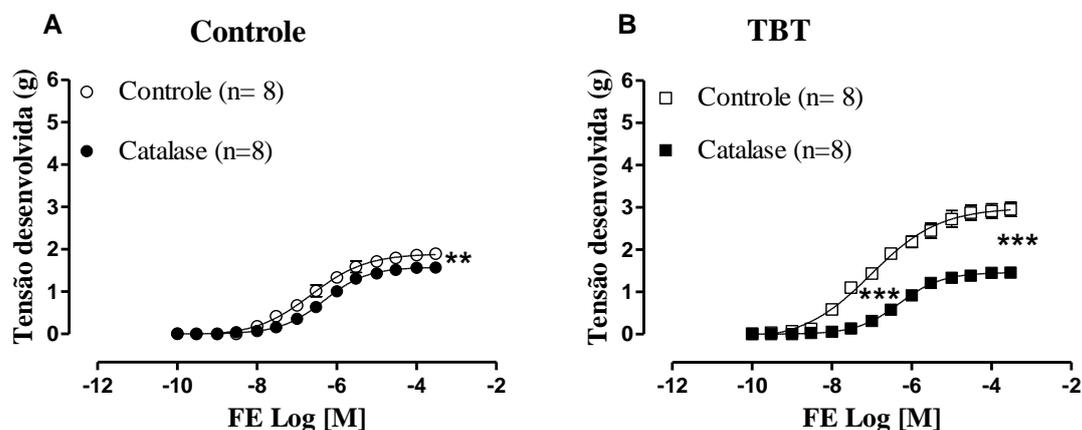


Figura 18: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Catalase (Controle Catalase); (B) TBT e após a incubação com Catalase (TBT Catalase). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 10: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Catalase.

	$R_{m\acute{a}x}$ (g)	pD_2
Controle	1,95 ± 0,06	-6,54 ± 0,18
Controle Catalase	1,58 ± 0,07**	-6,32 ± 0,14
TBT	3,02 ± 0,17	-7,14 ± 0,14
TBT Catalase	1,46 ± 0,08***	-6,29 ± 0,14***

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não pareado. ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001.

4.8.2.4 Influência da administração do tiron no tratamento por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

A avaliação da presença do $O_2^{\cdot-}$ nas aortas isoladas foi realizada através da incubação do tiron (1 mM) no banho. O tiron não alterou a reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta do grupo Controle (Figura 19 A). Entretanto, houve uma redução da reatividade vascular no grupo tratado com tributilestanho por quinze dias tanto na pD_2 , quanto na $R_{m\acute{a}x}$ (Figura 19 B) (Tabela 11).

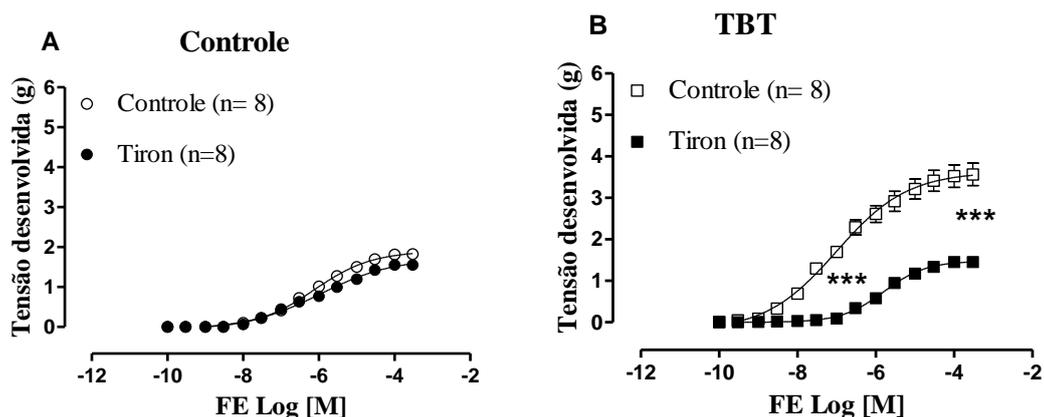


Figura 19: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Tiron (Controle Tiron); (B) TBT e após a incubação com Tiron (TBT Tiron). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; *** $p < 0,001$.

Tabela 11: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Tiron.

	$R_{m\acute{a}x}$ (g)	pD_2
Controle	$1,89 \pm 0,03$	$-6,17 \pm 0,09$
Controle Tiron	$1,75 \pm 0,11$	$-5,95 \pm 0,10$
TBT	$3,63 \pm 0,25$	$-7,06 \pm 0,09$
TBT Tiron	$1,48 \pm 0,06^{***}$	$-5,75 \pm 0,11^{***}$

Valores expressos em média \pm EPM; Teste t não pareado. *** $p < 0,001$.

4.8.2.5 Influência da administração do inibidor da xantina oxidase, alopurinol, no tratamento por quinze dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica.

O alopurinol (100 μ M) alterou a pD_2 da reatividade vascular à fenilefrina nos segmentos de aorta do grupo Controle (Figura 20 A). Além disso, houve uma redução da reatividade vascular no grupo tratado com tributilestanho por quinze dias tanto na pD_2 , como na $R_{m\acute{a}x}$ (Figura 20 B) (Tabela 12).

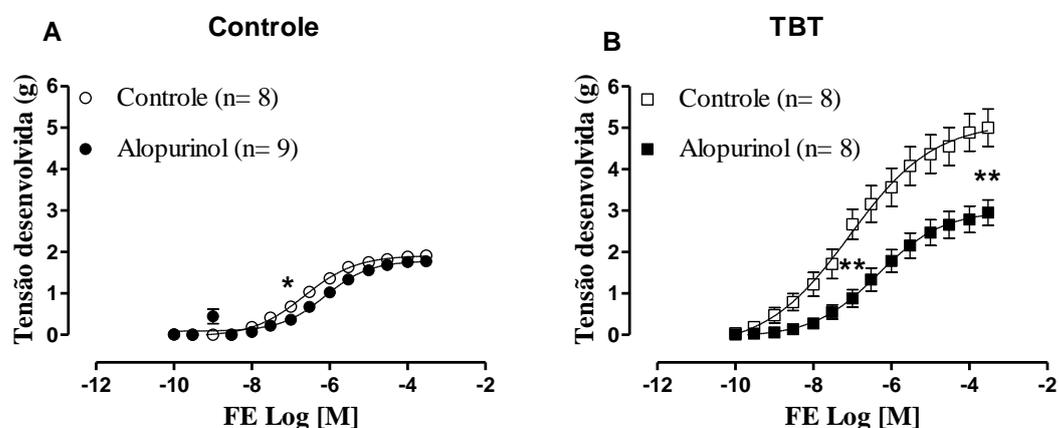


Figura 20: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas Wistar dos grupos: (A) Controle e após a incubação com Alopurinol (Controle Alopurinol); (B) TBT e após a incubação com Alopurinol (TBT Alopurinol). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 12: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar dos grupos: Controle e TBT, na presença e na ausência de Alopurinol.

	R _{máx} (g)	pD ₂
Controle	1,97 ± 0,05	-6,56 ± 0,16
Controle Alopurinol	1,82 ± 0,06	-6,10 ± 0,11*
TBT	5,04 ± 0,52	-7,02 ± 0,20
TBT Alopurinol	2,97 ± 0,32**	-6,28 ± 0,14**

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não pareado. *p < 0,5, **p < 0,01 e ***p < 0,001.

4.8.2.6 Quantificação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) “in situ” através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE).

A técnica utilizada para verificar a influência da exposição ao tributilestanho por quinze dias sobre a produção de $O_2^{\cdot-}$ “in situ” foi a fluorescência produzida pela oxidação do DHE (Figura 21).

A produção de $O_2^{\cdot-}$ foi significativamente maior nos anéis de aortas dos animais expostos ao tributilestanho (B) quando comparados aos anéis de aortas dos animais do grupo Controle (A). A remoção mecânica do endotélio não alterou estatisticamente a produção de fluorescência nos anéis de aorta das ratas do grupo Controle (C), assim como também não modificou a produção de $O_2^{\cdot-}$ “in situ” em anéis de aorta de ratas do grupo TBT (D).

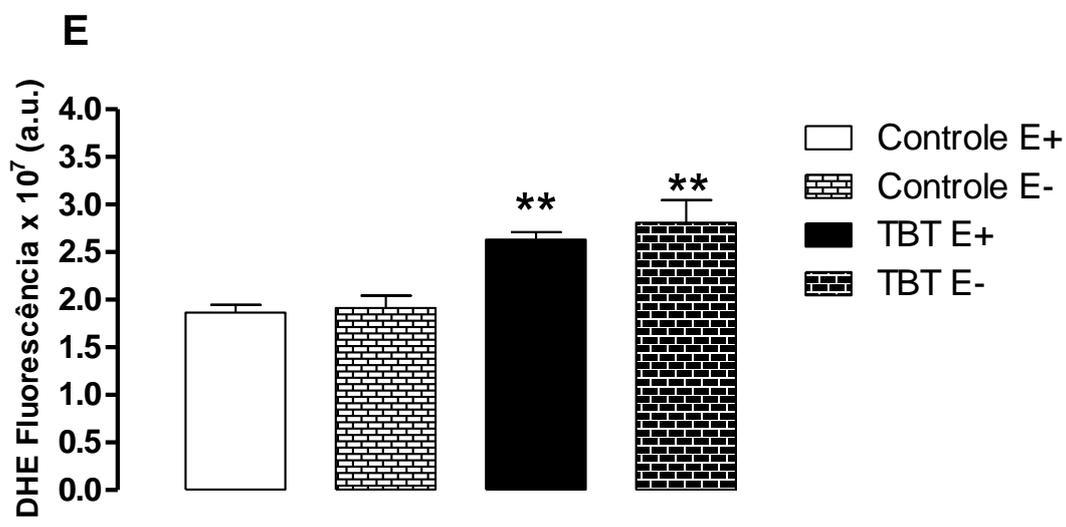
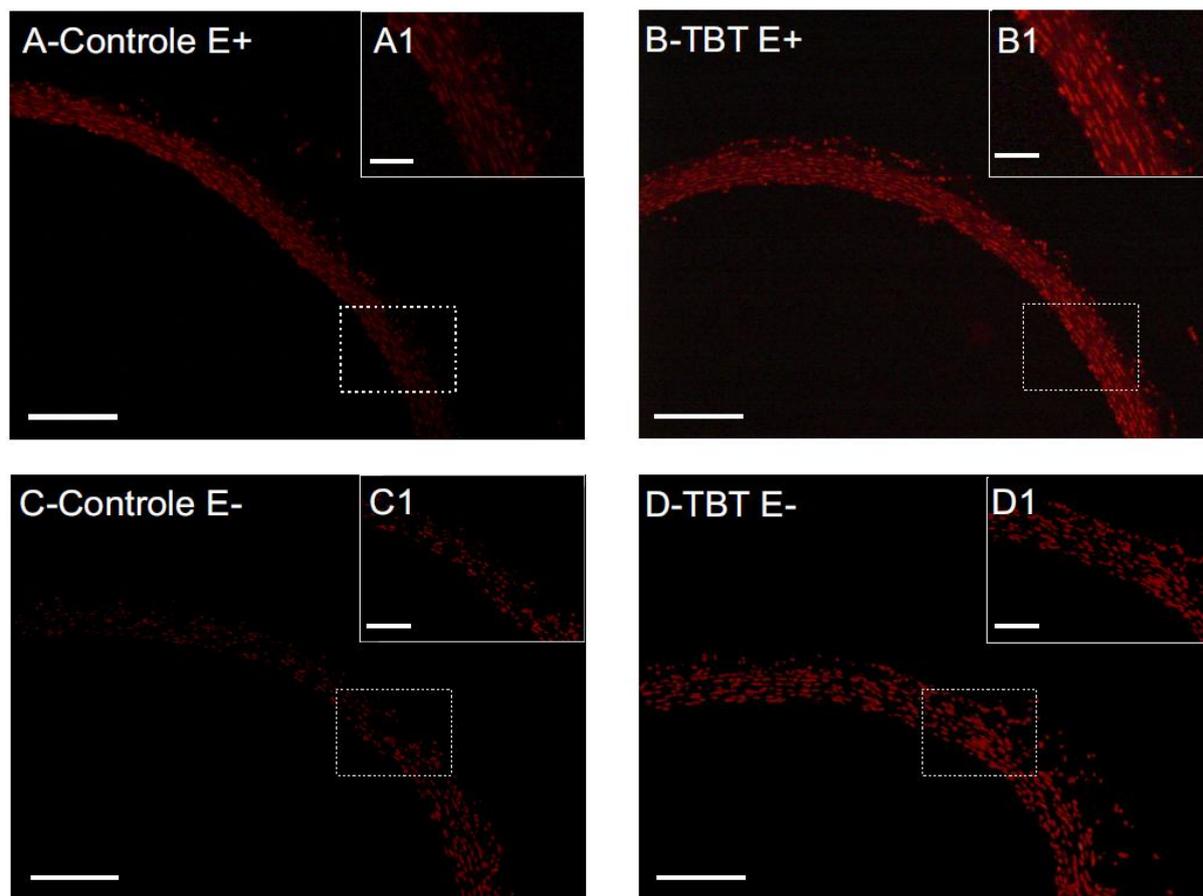


Figura 21: Avaliação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) "in situ" por Imagens de micrografia representando a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de ratas dos grupos: (A-A1) Controle (Controle E+) e (C-C1) após a retirada do endotélio (Controle E-); (B-B1) TBT (TBT E-). (E) Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio. Valores expressos em média \pm EPM; teste ANOVA uma via. ** $p < 0,01$.

4.8.2.7 Quantificação da peroxidação lipídica através das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A exposição ao TBT durante quinze dias exerceu efeito sobre a peroxidação lipídica em tecido aórtico, visto que, proporcionou um aumento das concentrações de TBARS comparado com a peroxidação lipídica em tecido aórtico do grupo Controle (Controle: $7,53 \pm 1,02$; TBT: $12,33 \pm 0,81$ mol/mg proteína $n=3-5$ $p < 0,05$) (Figura 22).

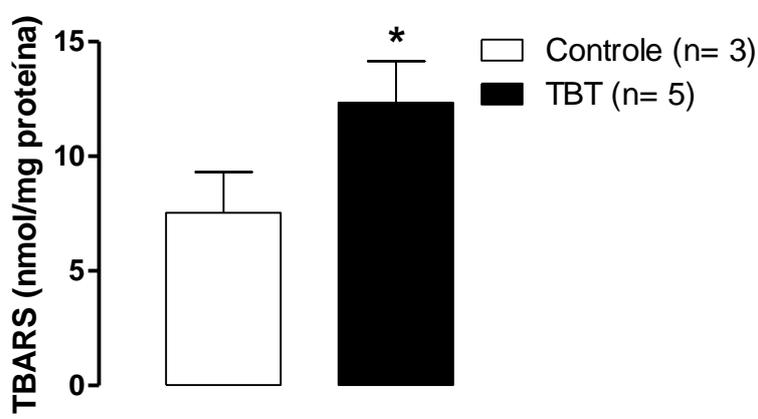


Figura 22: Avaliação da peroxidação lipídica dos anéis de aorta de ratos dos grupos Controle e TBT. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,5$, Teste *t* de Student não pareado.

4.9 Quantificação da deposição de colágeno na aorta através pela coloração *picrosirius red*.

A deposição de colágeno, identificada pela coloração *picrosirius red*, foi maior nas aortas das ratas expostas ao TBT durante quinze dias quando comparado com as aortas das ratas Controles (Controle: $84,27 \pm 2,32$; TBT: $103,87 \pm 1,93$, $n = 5$, $p \leq 0,001$) (Figura 23).

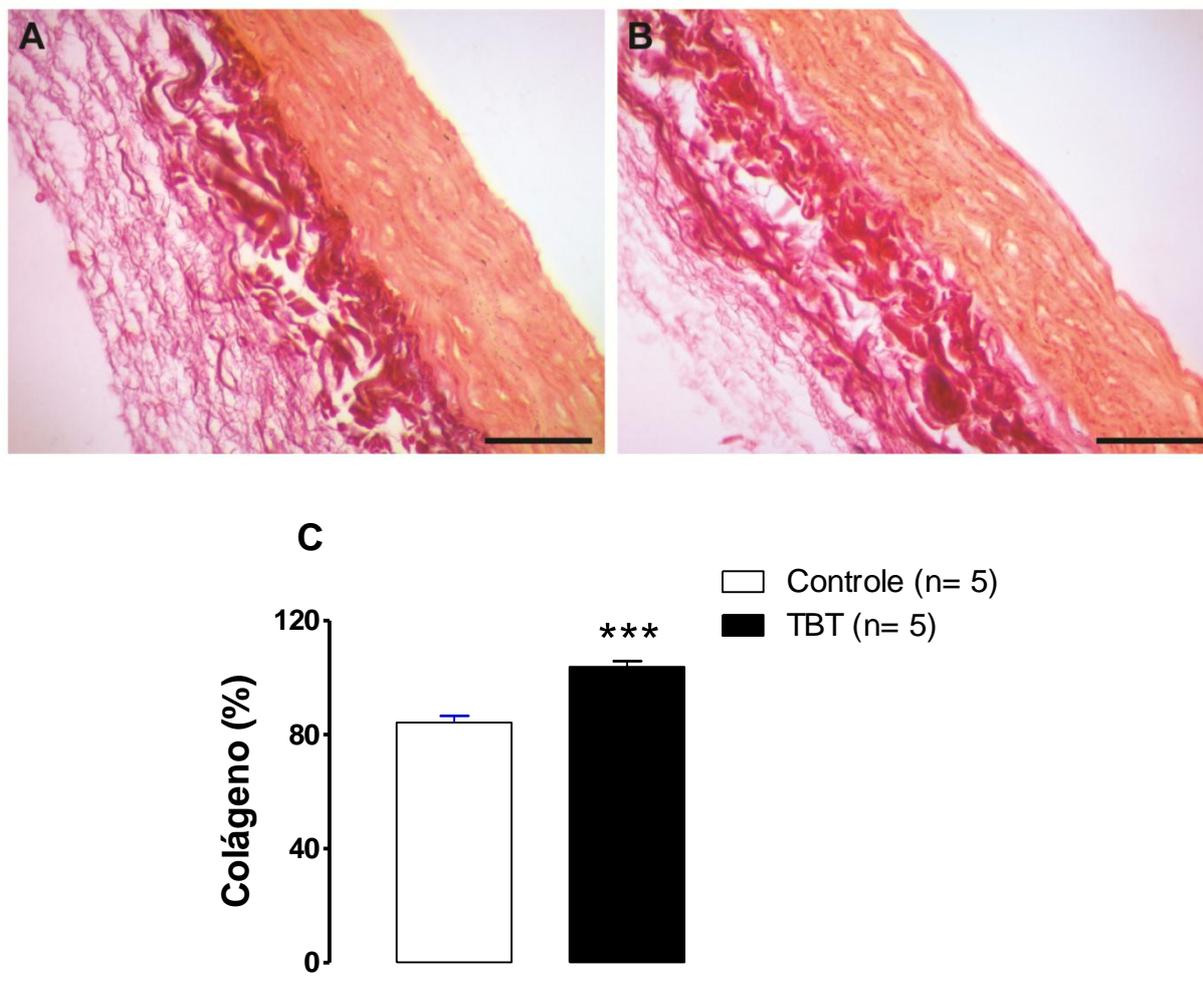


Figura 23: Imagem representativa da densidade superficial de colágeno em segmentos de aorta de ratas dos grupos: (A) Controle e (B) TBT. (C) Gráfico com percentuais da deposição de colágeno. Valores expressos em média \pm EPM; Teste *t* não pareado. *** $p < 0,001$. Barra = 20 μ m.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigados os efeitos vasculares da exposição ao TBT 500 ng/kg em ratas fêmeas com ciclo estral normal, avaliando possíveis mecanismos envolvidos na resposta vasoconstritora alterada da aorta. Os resultados demonstraram que a exposição ao TBT 500 ng/kg de ratas Wistar fêmeas, durante quinze dias, diminui a concentração de E_2 no soro e induzindo anormalidades na aorta, como aumento da reatividade vascular ao KCl e à felinefrina, diminuição do relaxamento vascular induzido pela ACh (dependente do endotélio) e pelo NPS (independente do endotélio). Ademais, os resultados da reatividade vascular foram associados com um desequilíbrio dos fatores endoteliais, como o aumento da biodisponibilidade de NO e da produção de radicais livres como o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 .

A exposição de TBT produziu um aumento transitório da massa total de gordura que não foi mantida após o dia 60 do período de tratamento. Porém, a exposição ao TBT não foi capaz de promover alteração significativa no peso corporal e a ingestão de alimentos dos camundongos (PENZA *et al.*, 2011). Em concordância com o nosso resultado de avaliação ponderal, que demonstrou que a exposição ao TBT não modificou o peso corporal das ratas.

Nesta pesquisa houve uma diminuição do nível de E_2 no soro, induzida pela exposição ao TBT. Vários estudos reportaram que o hormônio E_2 tem um importante papel em na aorta, tanto nas CMLVs como nas células endoteliais, a fim de controlar a função vascular, promovendo assim, uma proteção cardiovascular através de efeitos diretos e indiretos na parede do vaso (CHENG *et al.*, 1994; BARBACANNE 1999; TOSTES *et al.*, 2003). Barbacanne (1999) demonstrou que o E_2 é um hormônio esteroide ovariano que foi capaz de modular os mecanismos responsáveis do relaxamento e da contração dependente do endotélio (CHENG *et al.*, 1994; CERAVOLO *et al.*, 2012). Barbacanne (1999) reportou que a reposição de E_2 é capaz de originar uma diminuição da produção de $O_2^{\cdot-}$ em ratas ovariectomizadas, promovendo uma melhora da reatividade vascular.

Outros estudos demonstraram que um desequilíbrio das vias do estresse oxidativo pode prejudicar a reatividade vascular (SAGREDO *et al.*, 2013; CAMPOREZ *et al.*, 2011). Similarmente, estudos do nosso laboratório relataram que

uma exposição ao TBT a uma concentração de 100 ng/kg reduziu em 31,56% as concentrações plasmáticas de E₂ comparado com as ratas do grupo Controle (RODRIGUES *et al.*, 2014). Em concordância com os resultados anteriores, o presente estudo demonstrou que a exposição a uma maior concentração de TBT (500 ng/kg) durante quinze dias também diminuiu as concentrações de E₂ no soro, sugerindo que esta redução do E₂ pode prejudicar a reatividade vascular desse modelo experimental. Correlacionando as concentrações de E₂ de ambos os grupos, podemos observar que as variações das concentrações de E₂ não foram dose-dependentes, sugerindo uma ação direta do TBT no tecido aórtico ou ação de outro mecanismo ainda não estudado.

A aorta é uma artéria de condutância e a sua regulação vascular é atribuída a vários fatores (FURCHGOTT, 1983; HUTCHINSON *et al.*, 1987; VANHOUTTE, 1988). Uma possibilidade é que o meio ambiente também interfere na reatividade vascular, pois estudos experimentais têm sugerido uma associação dos elementos contaminantes do meio ambiente, cádmio, chumbo e TBT, com a disfunção vascular (FIORIM *et al.*, 2012; ALMENARA *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014). Poucos estudos têm demonstrado uma discrepância da reatividade vascular de aorta após ação de OTs (SOLOMON & KRISHNAMURTY, 1992; ALLY & REUHL, 1993; RODRIGUES *et al.*, 2014). Solomon and Krishnamurty (1992) demonstraram que incubações de anéis de aorta de ratos de ambos os gêneros com TBT nas concentrações 10⁻⁶ e 10⁻⁷ M durante o tempo de 1 h não interferem na contração promovida pela norepinefrina e no relaxamento induzido por NPS.

No entanto, o mesmo estudo demonstrou que o TBT produziu uma inibição dose-dependente do relaxamento de artérias aortas promovido pelo peptídeo natriurético atrial acompanhado por uma inibição paralela da geração de Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) induzida pelo peptídeo natriurético atrial. Nosso laboratório demonstrou anteriormente que ratas fêmeas expostas à baixa concentração de TBT (100 ng/kg), durante quinze dias, apresentaram uma diminuição da reatividade vascular de anéis de aorta à felinefrina dependente do endotélio (RODRIGUES *et al.*, 2014). Os resultados do presente estudo revelaram que aorta de ratas expostas ao TBT 500 ng Kg apresentaram aumento da resposta contrátil ao KCl (75 mM) e à felinefrina, sugerindo que a exposição de ratas ao TBT promoveu uma lesão vascular, principalmente do músculo liso vascular.

Além disso, o relaxamento induzido por ACh e NPS foram reduzidos em anéis de aorta de ratas expostas ao TBT em nosso estudo. O prejuízo do relaxamento de aorta tem sido demonstrado na literatura, principalmente uma redução do relaxamento induzido pela ACh. Este dano tem sido associado com doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio induzido pela oclusão de artéria coronária em ratos (SARTORIO *et al.*, 2005) e hipertensão arterial induzida pela exposição de acetato de chumbo em ratos (MARQUES *et al.*, 2001). Da mesma forma, o prejuízo do relaxamento dependente e independente do endotélio foi observado em ratos expostos ao cádmio e acetato de chumbo durante 30 dias (ALMENARA *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2014).

Em outro estudo, utilizando uma exposição à concentração semelhante de TBT, observou-se uma desnudação da superfície endotelial e número de mastócitos aumentados em artérias coronárias de ratas (DOS SANTOS *et al.*, 2012). Por outro lado, para avaliar a participação do endotélio na resposta da reatividade vascular, comparamos a magnitude das respostas dos anéis de aorta com endotélio e após a remoção mecânica (sem endotélio). Os resultados demonstraram que houve diferença entre a reatividade vascular da aorta de ratas do grupo Controle e ratas do grupo TBT. Estes achados sugerem que a capacidade do endotélio em modular negativamente a resposta contrátil induzida pela felinefrina foi preservada, apesar da exposição ao TBT. Ao avaliar a superfície endotelial pelo método de MEV também encontramos uma desnudação da superfície endotelial e acumulação de glóbulos vermelhos, plaquetas, fibrina e sinais de inflamação em artérias aorta de ratas expostas ao TBT.

As células endoteliais vasculares geram NO a partir da L-arginina, promovendo uma resposta de relaxamento por mecanismos de ação intracelular nas CMLVs (PALMER e MONCADA, 1988). A exposição a metais como o cádmio e o acetato de chumbo por trinta dias aumenta a resposta vasoconstrictora à felinefrina associada com uma redução da produção de NO em anéis de aorta de ratas (ALMENARA *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2014). Rodrigues *et al.*, 2014 demonstraram que a exposição à baixa concentração de TBT (100 ng/kg) reduziu a produção de NO. Em contrapartida, no presente estudo após incubação com L-NAME, que é um inibidor da NOS, observamos que ele foi capaz de aumentar a reatividade vascular em ambos os grupos como esperado, porém a magnitude da resposta foi maior nos anéis

de aorta de ratas do grupo TBT comparado com as ratas do grupo Controle. Estes resultados sugerem que, diferente do que ocorreu na exposição à baixa concentração de TBT, a produção ou a biodisponibilidade de NO está aumentada na aorta dos animais expostos ao TBT 500 ng Kg por 15 dias. Sugerindo um papel importante para o NO vascular como um mecanismo de compensação para o aumento na via de vasoconstritores que é ativada pela exposição ao TBT.

Diversos estudos demonstraram que a exposição ao TBT induziu o aumento da geração de estresse oxidativo, bem como EROs, com subsequentes danos oxidativos em diversos sistemas como o vascular, neural, reprodutivo, imunológico, células linfócitos-T e neuroblastoma em modelos *in vivo* e *in vitro* (ISHIHARA *et al.*, 2012; KATIKA *et al.*, 2011; KATO *et al.*, 2013; ISOMURA *et al.*, 2013; MITRA *et al.*, 2014, RODRIGUES *et al.*, 2014, NISHIMURA *et al.*, 2015). De modo semelhante, nossos dados demonstraram um aumento da produção de EROs em aorta de ratas pertencentes ao grupo TBT quando comparado com a aorta de ratas do grupo Controle. Adicionalmente o inibidor da NADPH oxidase, bem como a SOD, alopurinol, tiron e catalase reduziram, em maior magnitude, a resposta vasoconstrictora induzida pela felinefrina somente em aorta de ratas do grupo TBT sugerindo que ambos, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , estão envolvidos principalmente nas anormalidades vasculares promovidas pela exposição ao TBT.

A disfunção endotelial foi associada com aumento da produção de EROs, como descrito em muitas doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes e insuficiência cardíaca. (DURANTE *et al.*, 1988; OHARA *et al.*, 1993; CARDILLO *et al.*, 1997; ZALBA *et al.*, 2000). RODRIGUES *et al.*, (2014) demonstraram que a exposição durante quinze dias com TBT em baixas concentrações (100 ng/kg) aumentou a atividade da NADPH oxidase consequentemente produzindo concentrações maiores de EROs em anéis de aorta. De comum acordo com nossos resultados, Tang *et al.*, (2007) demonstraram que a ação de EROs nas células endoteliais de aorta podendo ser uma ação de fatores derivados do endotélio que promovem vasoconstrição.

A via NADPH oxidase é uma importante fonte de produção de EROs na vasculatura, produzindo $O_2^{\cdot-}$, utilizando a NADPH oxidase como doador de elétron

(GUZIK *et al.*, 2000b). Em nosso estudo, a incubação com a apocinina (inibidor da NADPH oxidase) reduziu significativamente a resposta contrátil à felinefrina dos anéis de aorta das ratas pertencentes do grupo TBT, quando comparada com anéis de aorta de ratas do grupo Controle, sugerindo um aumento da atividade local da NADPH oxidase. Tem sido demonstrado que a biodisponibilidade de NO foi prejudicada pela reação com $O_2^{\cdot-}$, promovendo uma resposta vasoconstrictora em vários vasos, como resultado uma produção de ONOO⁻ (KARBACH *et al.*, 2014; SCHECHOWITSCH *et al.*, 2015). Entretanto, a biodisponibilidade de NO pode estar normal ou até mesmo elevada, embora sua degradação esteja potencializada devido ao aumento na produção de radicais livres (BRIONES *et al.*, 2002).

O ONOO⁻ gerado no meio extracelular; que tem um 1,9 segundo de meia-vida, pH 7,4 que permite a difusão ao longo de vários diâmetros de células, que se decompõe para gerar um potente oxidante semelhante ao HO• na reatividade vascular (LYNCH & FRIDOVICH, 1978). Nossos dados demonstram uma diminuição da reatividade vascular à felinefrina após a incubação com a catalase (varredor de H₂O₂) nos anéis de aorta de ratas expostas ao TBT. Além disso, nós avaliamos a produção local de $O_2^{\cdot-}$ com e sem a presença do endotélio pelo DHE. O sinal da intensidade de fluorescência na camada média foi maior em anéis de aorta do grupo TBT quando comparada ao grupo Controle. A exposição ao TBT foi capaz de aumentar a produção “in situ” de $O_2^{\cdot-}$ na aorta. Após a remoção mecânica do endotélio o sinal da intensidade de fluorescência dentro da camada média também foi maior em anéis de aorta de ratas do grupo TBT, não havendo diferença entre a intensidade de fluorescência entre anéis de aorta com endotélio e sem endotélio. Estes resultados sugerem que a detecção da produção de $O_2^{\cdot-}$ “in situ” foi maior no músculo liso de aorta de ratas expostas ao TBT. Corroborando com nosso resultado, ratas expostas ao TBT em baixa concentração (100 ng/kg) durante quinze dias apresentaram aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ “in situ”. (RODRIGUES *et al.*, 2014).

As reações de radicais livres com lipídios da membrana celular provocam aumento do estresse oxidativo (JANIECK *et al.*, 1985; CHEESEMAN *et al.*, 1988). Esta alteração provocada pela peroxidação lipídica inativa enzimas e receptores ligados à membrana, aumenta a permeabilidade de vários tecidos e pode promover uma lesão celular (POLI *et al.*, 1985; JANERO & BURGARDT, 1989). RAKESH *et al.*, (1996) demonstraram que o modelo de ratos diabéticos tiveram um aumento de

peroxidação lipídica em tecido aórtico, como demonstrado pelo aumento das concentrações de TBARS. Estudo recente demonstrou um aumento das concentrações de TBARS em tecido cerebral de modo dose-dependente, observado após sete dias de exposição ao TBT nas concentrações de 10, 20 e 30 mg/Kg (MITRA *et al.*, 2014). De acordo com estes resultados, nossos dados mostraram um aumento das concentrações de TBARS no tecido de aorta de ratas expostas ao TBT. Assim, o aumento do estresse oxidativo pode ser atribuído à exposição das ratas ao TBT durante quinze dias.

Diversos estudos relataram que doença metabólica ou exposição à xenobióticos podem levar a anormalidades morfológicas da aorta (YOSHIZUKA *et al.*, 1992; DOS SANTOS *et al.*, 2012; AGUADO *et al.*, 2013; DÍAZ *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014). Em ratos diabéticos foram observados irregularidades da artéria aorta, tais como um aumento da espessura da parede vascular, fibrose perivascular e deposição de colágeno com fragmentação e desarranjo das fibras elásticas (TI *et al.*, 2015). Yoshizuka *et al.*, (1992) investigaram alterações da aorta, assinalado como inchaço das mitocôndrias das células endoteliais após 4 horas a exposição a óxido de tributilestanho (0,05 ml/kg). Nosso laboratório, anteriormente, demonstrou uma redução da área de parede da aorta e um aumento da deposição de colágeno em ratas fêmeas expostas ao TBT (100 ng/kg) durante quinze dias (RODRIGUES *et al.*, 2014).

A aorta de ratas expostas com TBT 500 ng Kg por 15 dias apresentou aumento da deposição de colágeno, superfície endotelial irregular e acúmulo de glóbulos vermelhos, plaquetas, fibrina e sinais de inflamação vascular. Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram que a exposição durante quinze dias com TBT na concentração de 500 ng/kg aumenta o estresse oxidativo da aorta, a reatividade vascular à fenilefrina e diminui o relaxamento dependente e independente do endotélio induzido por ACh e NPS, respectivamente. Essas disfunções vasculares também foram associadas com anormalidades morfológicas em anéis de aorta, como o endotélio desnudado, sinais inflamatórios e aumento da deposição de colágeno. Portanto, a exposição ao TBT poderia ser considerada um importante fator de risco para doença cardiovascular.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A exposição de ratas ao TBT (500 ng/kg) durante quinze dias, concentração encontrada no meio ambiente e que está acima do limite considerado seguro pela OMS, alterou concentração sérica de E_2 e a reatividade da aorta. Neste estudo, o TBT (500 ng/kg), alterou as concentrações de E_2 e a reatividade vascular.

O aumento da reatividade da aorta à felinefrina está associado com o aumento da deposição de colágeno, da produção de EROs, da biodisponibilidade de NO, apesar do endotélio estar desnudado com sinais de inflamação, reforçando a hipótese de que esse metal deve ser considerado um fator de risco para doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS

AGUADO, A.; GALÁN, M.; ZHENYUKH, O.; WIGGERS, G. A.; ROQUE, F. R.; REDONDO, S.; PEÇANHA, F.; MARTÍN, A.; FORTUÑO, A.; CACHOFEIRO, V.; TEJERINA, T.; SALAICES, M.; BRIONES, A. M. Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. **Toxicol. Appl. Pharm.** v. 268, n. 2, p. 188–200, 2013.

ALLY, A.; BUIST, R.; MILLS, P.; REUHL, K. Effects of methylmercury and trimethyltin on cardiac, platelet, and aorta eicosanoid biosynthesis and platelet serotonin release. **Pharmacol. Biochem.** v. 44, n. 3, p. 555–63, 1993.

ALMENARA, C. C. P.; BROSEGHINI-FILHO, G. B.; VESCOVI, V. A. V.; ANGELI, J. K.; FARIA, T. O.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V.; PADILHA, A. S. Chronic cadmium Treatment promotes oxidative stress and endothelial damage in isolated rat aorta. **PLoS One.** v. 8, n. 7, p. e68418, 2013.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research.** v. 43, p. 521–531, 1999.

ANGELI, J. K.; RAMOS, D. B.; CASALI, E. A.; SOUZA, D. O.; SARKIS, J. J.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V.; Fürstenau, C. R. Gadolinium increases the vascular reactivity of rat aortic rings. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 44, p. 445–452, 2011.

ANSELM, E., M.; CHATAIGNEAU, NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINKERTH, V. B. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt- dependent activation of eNOS. **Cardiovasc. Res.** v. 73, n. 2, p. 404–13, 2007.

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

ARNAL, J.F.; GOURDY P.; ELHAGE, R.; GARMY-SUSINI, B.; DELMAS, E.; BROUCHET, L.; CASTANO, C; BARREIRA, Y.; COULOUMIERS, J.C.; PRATS H.; PRATS A. C.; BAYARD, F. Estrogens and atherosclerosis. **Eur. J. Endocrinol.** v. 150, p. 113–117, 2004.

BARBACANNE, M. A.; RAMI, J.; MICHEL, J. B; SOUCHARD, J. P.; PHILIPPE, M.; BESOMBES, J. P.; BAYARD, F.; ARNAL, J. F. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. **Cardiovasc. Res.** v. 41, n. 3, p. 672–681, 1999.

BARREIRA, A. L.; TAKIYA, C. M.; CASTIGLIONE, R. C.; MARON-GUTIERREZ, T.; BARBOSA, C. M.; ORNELLAS, D. S.; VERDOORN, K. S.; PASCARELLI, B. M.; EINICKER-LAMAS, M.; LEITE J. R., M.; MORALES, M. M.; VIEYRA, A. Bone

marrow mononuclear cells attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells after unilateral ureteral obstruction. **Cell Physiol. Biochem.** v. 24, 585–594, 2009.

BARTON, M.; MEYER, M. R. Hormone Replacement Therapy and Atherosclerosis in Postmenopausal Women Arterioscler. **Thromb. Vasc. Biol.** v. 27, p.1669–1672, 2007.

BEAL, M. F. Serial review: Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 32, n. 9, p. 797–803, 2002.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews.** v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BIAN, K. M.; DOURSOUT, F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **J Clin Hypertens (Greenwich).** v.10, n. 4, p. 304–10, 2008.

BLAUSTEIN, M. P.; HAMLYN, J. M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na⁺ pump, the Na⁺/Ca²⁺ exchanger and TRPC proteins. **Biochimica Biophysica Acta.** v. 1802, n. 12, p. 1219–1229, 2010.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature.** v. 351, n. 6329, p. 714–718, 1991.

BRIONES, A. M.; ALONSO, M. J.; HERMANZ, R.; MIGUEL, M. SALAICES. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology.** v. 39, n. 3, p. 378–388, 2002.

BRYAN, G. W.; GIBBS, P. E.; HUMMERSTONE, L. G.; BURT, G. R. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. **J. Mar. Biol. Assoc. UK.** v. 66, p. 611–640, 1986.

CAI, H.; HARRINSON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. **Circulation Research.** v. 87, p. 840–844, 2000.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research.** v. 68, p. 26–36, 2005.

CAMPOREZ, J. P.; AKAMINE, E. H.; DAVEL, A. P.; FRANCI C. R.; ROSSONI, L. V; CARVALHO, C. R. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. **J. Physiol.** v. 589, n. 10, p. 2585–2596, 2011.

CANNON III R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clinical Chemistry.** v. 44 n. 8, p. 1809–1819, 1998.

CARDILLO, C.; KILCOYNE, C. M.; CANNON, R. O.; QUYYUMI, A. A.; PANZA, J. A. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. **Hypertension**. v. 30, p. 57–63, 1997.

CERAVOLO, G. S.; FILGUEIRA, F. P.; COSTA, T.J.; LOBATO, N. S.; CHIGNALIA, A. Z.; ARAUJO, P. X.; TOSTES, R. C.; DANTAS, A. P.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**. v. 78, n. 3, p. 341–346, 2012.

CHAGOT, D.; ALZIEU, C.; SANJUAN, J.; GRIZE, H. Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. **Aquat. Living Resour.** v. 3, p. 121–130, 1990.

CHAMP, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Sci.Total Environ.** v. 258, n. 1–2, p. 21–71, 2000.

CHEESEMAN, K. H.; BEAVIS, A.; ESTERBAUER, H. Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. **Biochem J**. v. 252, n. 3, p. 649–653, 1988.

CHENG, D. Y.; FENG, C. J.; KADOWITZ, P. J.; GRUETTER, C. A. Effects of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in female rat aorta. **Life Sci**. v. 55, n. 10, p. 187–191, 1994.

CHOI, M.; MOON, H. B.; YU, J.; EOM, J. Y.; CHOI, H. G. Temporal trend of butyltins in seawater, sediments, and mussels from Busan harbor of Korea between 2002 and 2007: tracking the effectiveness of tributyltin regulation. **Arch. Environ. Con. Tox.** v. 58, n. 2, p. 394–402, 2010.

COOKE, G. M. Toxicology of tributyltin in mammalian animal models. **Immunol, Endoc. & Metabol. Agents Med. Chem.** v. 6, p. 63–71, 2006.

COSTA, M. B.; ZAMPROGNO, G. C.; PEDRUZZI, F. C.; MORAIS, L.; TOGNETTA, M. M. P.; GODOI, A. F. L.; SANTOS, D. M.; MARCHI, M. R. R.; FERNANDEZ, M. A. Differential organotin sensitivity in two *Leucostonia* species from a ship traffic area southeastern Brazil. **Mar. Biol. Res.** v. 10, n. 7, p. 712–724, 2014.

CRUZADO, M. C.; RISLER, N. R.; MIATELLO, R. M.; YAO, G.; SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, M. Vascular smooth muscle cell NA(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. **American Journal of Hypertension**. v. 18, p. 81–87, 2005.

DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F. I.; PODRATZ, P. L.; GRACELI, J. B. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 44, n. 9, p. 958–965, 2011.

DÍAZ, M. F. F. P.; ACOSTA, M.; MOHAMED, F. H.; FERRAMOLA, M. L.; OLIVEROS, L. B.; GIMENEZ, M. S. Protective effect of soybeans as protein source

in the diet against cadmium-aorta redox and morphological alteration. **Toxicol. Appl. Pharm.** v. 272, n. 3, p. 806–815, 2013.

DIEZ, S.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELO, D.; BAYONA, J. M. Survey of organotin compounds in rivers and coastal environments in Portugal 1999–2000. **Environ. Pollut.** v. 136, n. 3, p. 525–36, 2005.

DOS SANTOS, R. L.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F.I.; GONÇALVES, W. L. S.; ALVES, L. M.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; MIGUEL, E. C.; MOYSES, M. R.; GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 beta-estradiol in the isolated rat heart. **J. Toxicol. Env. Heal. A.** v. 75, n. 16–17, p. 1–13, 2012.

DURANTE, W.; SEN, A. K.; SUNAHARA, F. A. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. **Br J Pharmacol** v 94, n. 2, p. 463–468, 1988.

DRUMMOND, G. R.; SELEMIDIS, S.; SOBEY, C. G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery.** v. 10, n. 6, p. 453–471, 2011.

EUROPE. European Commission **Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for tributyltin chloride SCOEL/SUM/138**, 2011.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.** v. 93, n. 3, p. 515–524, 1988.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Crit. Rev. Toxicol.** v. 26, p. 1–117, 1996.

FIORIM, J.; JÚNIOR, R. F. R.; AZEVEDO, B. F.; SIMÕES, M. R.; PADILHA, A. S.; STEFANON, I.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M.; VASSALLO, D. V. Activation of K⁺ channels and Na⁺/K⁺ ATPase prevents aortic endothelial dysfunction in 7-day lead-treated rats. **Toxicol. Appl. Pharm.** v. 262, n.1, p. 22–31, 2012.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal.** v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FROLISH, J. C.; FORSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Advanced Prostaglandin.Tromboxane and leukotriene research.** v. 19, p. 211–215, 1989.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** v. 288, p. 373–6, 1980

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.** v. 53, n.5, p. 557–73, 1983.

FURCHGOTT, R. F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: VANHOUTTE, P.M. **Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium**. New York: Raven Press. p. 401–414, 1988.

GALLOWAY, T. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. **Mar. Pollut. Bull.** v. 53, n.10-12, p. 606–13, 2006.

GARG, A.; MEENA, R. M.; JADHAV, S.; BHOSLE, N. B. Distribution of butyltins in the waters and sediments along the coast of India. **Mar. Pollut. Bull.** v. 62, n. 2, p. 423–431, 2011.

GARRIDO, A. M.; GRIENDLING, K. K. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 302, p. 148–158, 2009.

GRACE, C. T.; NG, S. K.; CHEONG, L. L. Recurrent irritant contact dermatitis due to tributyltin oxide on work clothes. **Contact Dermatitis**. v. 25, p. 250–251, 1991.

GRIENDLING, K.; SORESCU K. D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ. Res.** v. 86, n. 5, p. 494–501, 2000.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**. v. 108, p. 1912–1916, 2003.

GUZIK, T. J.; WEST N. E.; BLACK, E.; MCDONALD, D.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R.; CHANNON, K. M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ. Res.** v.86, n. 9, p. 85–90, 2000.

HAMILTON, C. A.; BROSNAM, M. J.; AL-BENNA, S.; BERG, G.; DOMINICZACK, A. F. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. **Hypertension**. v. 40, p. 755–762, 2002.

HARINO, H.; YAMAMOTO, Y.; EGUCHI, S.; KAWAI, S.; KUROKAWA, Y.; ARAI, T.; OHJI, M.; OKAMURA, H.; MIYAZAKI, N. Concentrations of antifouling biocides in sediment and mussel samples collected from Otsuchi Bay, Japan. **Arch. Environ. Con. Tox.** v. 52, n. 2, p. 179–188, 2007.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Bio. Med.** v. 19, n. 3, p. 271–280, 1995.

HINK, U.; LI H., MOLLNAU, H.; OELZE, M.; MATHEIS, E.; HARTMANN, M.; SKATCHKOV, M.; THAISS, F.; STAHL, R. A.; WARNHOLTZ, A.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; HOCH, M. Organotin compounds in the environment – an overview. **Appl. Geochem.** v. 16, p. 719–743, 2001.

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

HUTCHINSON, P. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur. J. Pharmacol.* v. 141, n. 3, p. 445–451, 1987.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* v. 61, n. 6, p. 866–79, 1987.

IPCS. Tributyltin compounds. Geneva: WHO. (International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 116), 1990.

IPCS. Tributyltin Oxide. Geneva: WHO. (International Programme on Chemical Safety. Concise International Chemical Assessment Document 14), 1999.

ISHIHARA, Y.; KAWAMI, T.; ISHIDA, A.; YAMAZAKI, T. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem. Int.* v. 60, n. 8, p. 782–790, 2012.

ISOMURA, M.; KOTAK, Y.; MASUDA, K.; MIYARA, M.; OKUDA, K.; SAMIZO, S.; SANOH, S.; HOSOI, T.; OZAWA, K.; OHTA, S. Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca²⁺-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharm.* v. 272, n. 1, p.137–146, 2013.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. v. 35, n. 1, p. 173-178, 2000.

JANERO, D. R.; BURGHARDT, B. Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-promoted lipid peroxidation: influence of peroxidation conditions. *Lipids*. v. 24, n. 2 p.125–131, 1989.

JANIECK, M. F.; HASELTINE, W. A; HENNER, W. D. Malondialdehyde precursors in gamma-irradiated DNA, deoxynucleotides, deoxynucleosides. *Nucleic Acids Res.* v. 13, n. 24, p. 9011–9029, 1985.

KANG, L. S.; CHEN, B.; REYES, R. A.; LEBLANC, A. J.; TENG, B.; MUSTAFA, S. J.; MULLER-DELP, J. M. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* v. 300, p. 2105–2115, 2011.

KANNAN, K.; FALANDYSZ, J. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* v. 34, n. 3, p. 203–207, 1997.

KANNAN, K.; SENTHILKUMAR, K.; GIESY, J. P. Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environ. Sci. Technol.* v. 33, n. 10, p. 1776–1779, 1999.

KARBACH, S.; CROXFORD, A. L.; OELZE, M.; SCHÜLER, R.; MINWEGEN, D.; WEGNER, J.; KOUKES, L.; YOGEV, N.; NIKOLAEV, A.; REIßIG, S.; ULLMANN, A.; KNORR, M.; WALDNER, M.; NEURATH, M. F.; LI, H.; WU, Z.; BROCHHAUSEN, C.; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S.; PIOTROWSKI, C.; BECHMANN, I.; RADSAK, M.; WILD, P.; DAIBER, A.; VON STEBUT, E.; WENZEL, P.; WAISMAN, A.; MÜNZEL, T. Interleukin 17 drives vascular inflammation, endothelial dysfunction, and arterial hypertension in psoriasis-like skin disease. **Arterioscl. Throm. Vasc.** v. 34, n. 12, p. 2658–68, 2014.

KATIKA, M. R.; HENDRIKSEN, P. J. M.; LOVEREN, H. V.; PEIJNENBURG, A. Exposure of Jurkat cells to bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) induces transcriptomics changes indicative for ER- and oxidative stress, T cell activation and apoptosis. **Toxicol. Appl. Pharm.** v. 254, n. 3, p. 311–322, 2011.

KATO, T.; TADA-OIKAWA, S.; WANG, L.; MURATA, M.; KURIBAYASHI, K. Endocrine disruptors found in food contaminants enhance allergic sensitization through an oxidative stress that promotes the development of allergic airway inflammation. **Toxicol. Appl. Pharm.** v. 273, n. 1 p. 10–18, 2013.

KERR, S.; BROSNAN, J.; MCINTYRE, M.; REID, J. L.; DOMINICZAK, A. F.; HAMILTON, C. A. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: Role of endothelium. **Hypertension.** v. 33, p. 1353–1358, 1999.

KIM, N. S.; SHIM, W. J.; YIM, U. H.; HA, S. Y.; AN, J. G.; SHIN, K. H. Three decades of TBT contamination in sediments around a large scale shipyard. **J. Hazard Mater.** v. 192, n. 2, p. 634–642, 2011.

KOH, K. K.; OH, P. C.; QUON, M. J. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? **Cardiovascular Research.** v. 81, n. 4, p. 649–659, 2009.

KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environ. Int.** v. 30, n. 2, p. 235–48, 2004.

LAGADIC, L.; COUTELLEC, M. A.; CAQUET, T. Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs: few evidences, many challenges. **Ecotoxicology.** v. 16, n.1, p. 45–59, 2007.

LINCOLN, T.; DEY, N.; SELLAH, H. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal Applied Physiology.** v. 91, n. 3, p. 1421–1430, 2001.

LYNCH, R. E.; FRIDOVICH, I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. **J. Biol. Chem.** v. 253, n. 13, p. 4697–4699, 1978.

MA, F. X.; LIU, L. Y.; XIONG, X. M. Protective effects of lovastatin on vascular endothelium injured by low density lipoprotein. **Acta Pharmacol. Sin.** v. 24, n. 10, p. 1027–1032, 2003.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 75, n. 2, p. 111–134, 1997.

MARQUES, M.; MILLÁS, I.; JIMÉNES, A.; GÁRCIA-COLIS, E.; RODRIGUES-FEO, J. A.; VELASCO, S.; BARRIENTOS, A.; CASADO, S.; LÓPEZ-FARRÉ, A. Alteration of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead induced hypertension in rats. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 12, n. 12, p. 2594–2600, 2001.

MARUMO, T.; SCHINI-KERTH, V. B.; BUSSE, R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappa B and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. **Diabetes**. v. 48, n. 5, p. 1131–1137, 1999.

MICHEL, T.; VANHOUTTE, P. M. Cellular signaling and NO production. **Pflugers Arch.** v. 450, n. 6, p. 807–16, 2010.

MILLER, F. J.; GUTTERMAN, D. D.; RIOS, D. C.; HEISTAD, D. D.; DAVIDSON, B. L. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in arterosclerosis. **Circulation Research**. v. 82, p. 1289–1305, 1998.

MITRA, S.; SIDDIQUI, W. A.; KHANDELWAL, S. Differential Susceptibility of Brain Regions to Tributyltin Chloride Toxicity. **Environ. Toxicol.** DOI 10.1002/tox.22009, 2014.

MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, VANE J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**. 263(5579):663–665, 1976

MONCADA, M.; PALMER, R. M. J.; HIGGES, E. A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 43, p.109–142, 1991.

MUELLER, C. F.; LAUDE, M. K.; MCNALLY, J. S.; HARRISON, D. V. Redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 25, n. 2, p. 274–278, 2005.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**. v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.

MUNZEL, T.; AFANAS'EV I. B. KLESCHYOV, A. L.; HARRISON, D. G. Detection of superoxide in vascular tissue. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 22, n. 11, p. 1761–1768, 2002.

NAKANISHI, T. Potential toxicity of organotin compound via nuclear receptor signalling in mammals. **J. Health Sci.** v. 53, n. 1, p. 1–9, 2007.

NHAN, D. D.; LOAN, D. T.; TOLOSA, I.; DE MORA, S. J. Occurrence of butyltin compounds in marine sediments and bivalves from three harbour areas (Saigon, Da Nang and Hai Phong) in Vietnam. **Appl. Organomet. Chem.** v. 19, p. 811–8, 2005.

NDIAYE, M., CHATAIGNEAU T., CHATAIGNEAU, M. ; SCHINI-KERTH, V. B. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. **Br. J. Pharmacol.** v. 142, n. 7, p. 1131–6, 2004.

NIELSEN, J. B.; STRAND, J. Butyltin compounds in human liver. **Environ Res.** v. 88, n. 2, p. 129–133, 2002.

Nishimura, T.; DUEREH, M.; SUGITA, Y.; YOSHIDA, Y.; HIGUCHI, K.; TOMI, M. Protective effect of hypotaurine against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat placental trophoblasts. **Placenta** v. 36, n. 6,;p. 693–698 2015.

OEHLMANN, J.; DI BENEDETTO, P.; TILMANN, M.; DUFT, M.; OETKEN, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. **Ecotoxicology** v. 16, n. 1, p. 29–43, 2007.

OHARA, Y.; PETERSON, T. E.; HARRISON, D. G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **J. Clin. Invest.** v. 91, p. 2546–2551, 1993.

OHTAK, K.; AIHARA, M.; TAKAHASHI, H.; FUJITA, H.; TAKAHASHI, K.; FUNABASHI, T.; HIRASAWA, T.; IKEZAWA, Z. Effects of tributyltin on the emotional behavior of C57BL/6 mice and the development of atopic dermatitis-like lesions in DS-Nh mice. **J. Dermatol. Sci.** v. 47, n. 3, p. 209–216, 2007.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PENNINKS, A. H. The evaluation of data-derived safety factors for bis (tri-n-butyltin) oxide. **Food Addit. Contam.** v. 10, n. 3, p. 351–61, 1993.

PENZA, M.; JEREMIC, M.; MARRAZZO, E.; MAGGI, A.; CIANA, P.; RANDO G.; GRIGOLATO, P. G.; DI LORENZO, D. The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. **Toxicol. Appl. Pharm.** v. 255, n. 1, p. 65–75, 2011.

PIVER, W. T. Organotin compounds: Industrial applications and biological investigation. **Environ. Health Perspect.** v. 4, p. 61–79, 1973.

PODRATZ, P. L.; MERLO, E.; SENA, G. C.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; MATSUMOTO, S.; T, DA COSTA, M. B.; ZAMPROGNO, G. C.; BRANDÃO, P. A. A.; CARNEIRO, M. T. W. D.; MIGUEL, E. C.; MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reprod. Toxicol.** v. 57, p. 29–42, 2015.

POLI, G.; DIANZANI, M. U.; CHEESEMAN, K. H.; STALER, T. F.; LANG, J.; ESTERBAUER, H. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. **Biochem. J.** v. 227, n. 2, p. 629–638, 1985.

RAKESH, K.; SUBRAHMANYAM, V. M.; JAWAHAR, K.; KAILASH, P. Time course study of oxidative stress in aorta and heart of diabetic rat. **Clin. Sci.** v. 91, n. 4, p. 441-448 (Printed in Great Britain), 1996.

RODRIGUES, S. M. L.; XIMENES, C. F.; BATISTA, P. R.; SIMÕES, F. V.; COSER, P. H. P.; SENA, G. C.; PODRATZ, P. L.; SOUZA, L. N. G.; VASSALLO, D. V.; GRACELI, J. B.; STEFANON, I. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicol Lett.** v. 225, n. 3, p. 378–385, 2014.

RONIS, M. J. J.; MASON, A. Z. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: Effects of tributyltin. **Mar. Environ. Res.** v. 42, p. 161–166, 1996.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology.** v. 250, n. 19, p. 815–821, 1986.

SAGREDO, A.; CAMPO, L.; MARTORELL, A.; NAVARRO, R.; MARTÍN, M. C.; RIVERO, J. B.; FERRER, M. Ovariectomy Increases the Participation of Hyperpolarizing Mechanisms in the Relaxation of Rat Aorta. **PLoS One.** v. 8, n. 9, p. 734–774, 2013.

SARTORIO, C. L.; PINTO, V. D.; CUTINI, S. VASSALLO, V. V.; STEFANON, I. Effects of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition on the Rat Tail Vascular Bed Reactivity Three Days After Myocardium Infarction. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 45, n. 4, 2005

SCHESCHOWITSCH, K.; MORAES, J.A.; SORDI, R.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Res.** v. 100, p. 73–84, 2015.

SILVEIRA, E. A.; SIMAM, F. D. M.; FARIA, T. O.; VESCOVI, M. V. A.; FURIERI, L.B; LIZARDO, J. H. F.; STEFANON, I.; PADILHA, A. S.; VASSALLO, D. V. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. **Free Radical Bio. Med.** v. 67, p. 366–376, 2014.

SINDHU, R. K.; EHDAIE, A.; FARMAND, F.; DHALIWAL, K. K.; NGUYEN, T.; ZHAN, C.D.; ROBERTS, C. K.; VAZIRI, N. D. et al. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. **Biochimica Biophysica Acta.** v. 1743, n. 1–2, p. 86–92, 2005.

SKEEGS, L. T. The existence of two forms of hyperensin. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 100, p. 363, 1954.

SOLOMON, R.; KRISHNAMURTY, V. The effect of tributyltin chloride on vascular responses to atrial natriuretic peptide. **Toxicology.** v. 76, n. 1, p. 39–47, 1992.

SONG, J.; KIM, M.; JO H.; HWANG, S.; CHA, B.; CHUNG, J.; KWON, D.; LEW, Y.; LIM, Y.; KIM, J.; KIM, J.; KIM, M. Antioxidant effect of estrogen on bovine aortic endothelial cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v. 117, p. 74–80, 2009.

STEVENS-TRUSS, R.; BECKINGHAM, K.; MARLETTA, M. A. Calcium binding sites of calmodulin and electron transfer by neuronal nitric oxide synthase. **Biochemistry**. v. 36, n. 40, p.12337–12345, 1997.

STREHLOW, K.; ROTTER, S.; WASSMANN, S.; ADAM, O.; GROHE, C.; LAUFS, K.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation Research**. v. 93, p. 70–177, 2003.

SUMPTER, J. P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. **Acta Hydroch. Hydrob.** v. 33, n. 1, p. 9–16, 2005.

SZOCS, K.; LASSGUE, B.; SORESCU, D.; HILENSKI, L. L.; VALPPU, L.; COUSE, T. L.; WILCOK, J. N.; QUINN, M. T.; LAMBETH, J. D.; GRIENGLING, K. K. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 22, n. 1, p. 21-27, 2002.

TAKAHASHI, S.; MUKAI, H.; TANABE, S.; SAKAYAMA, K.; MIYAZAKI, T.; MASUNO, H. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. **Environ. Pollut.** v. 106, n. 2, p. 213–218, 1999.

TAKAYA, T.; HIRATA, K.; YAMASHITA, T.; SHINOHARA, M.; SASAKI, N.; INOUE, N.; YADA, T.; GOTO, M.; FUKATSU, A.; HAYASHI, T.; ALP, N. J.; CHANNON, M. K.; YOKOYAMA, M.; KAWASHIMA, S. A. Especific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. v. 27, p. 1632–1637, 2007.

TANG, E. H.; LEUNG, F. P.; HUANG, Y.; FELETOU, M.; SO, K. F.; MAN, R. Y.; VANHOUTTE, P. M. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **Brit. J. Pharmacol.** v. 151, n. 1, p. 15–23, 2007.

TANIYAMA Y, GRIENGLING KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**. v. 42, p. 1075–1081, 2003.

TI, Y.; XIE, G.; WANG, Z.; DING, W.; ZHANG, Y.; ZHONG, M.; TRIBBLES, W. Z. A potential player in diabetic aortic remodeling. **Diabetes Vas. Dis. Re.** 1–12 DOI: 10.1177/1479164115605645, 2015.

TOSTES, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. Effects of estrogen on the vascular system. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 36, n. 9, p. 1143–1158, 2003.

TOUZY, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacological Reviews**. v. 52, p. 639–672, 2000.

TRIGGLE, C. R.; HOLLENBERG, M.; ANDERSON, T. J.; DING, H.; JIANG, Y.; CERONI, L.; WIEHLER, W. B.; ELLA, S. M. N.; ELLIS, A.; ANDREWS, K. MCGUIRE, J. J.; PANNIRSELVAM, M. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. **Journal of Smooth Muscle Research**. v. 39, n. 6, p. 249–267, 2003.

VANHOUTTE, P. M.; KATUSIC, Z. S. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? **Trends Pharmacol. Sci.** v. 9, n. 7, p. 229–30, 1988.

VELTMAN, K.; HUIJBREGTS, M. A. J.; VAN DEN HEUVEL-GREVE, M. J.; VETHAAK, A. D.; HENDRIKS, A. J. Organotin accumulation in an estuarine food chain: comparing field measurements with model estimations. **Mar Environ Res**. v. 61, n. 5, p. 511–30, 2006.

VELTMAR, A.; GOHLKE, P.; UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **Am. J. Hypertens**. v. 4, n. 3, p. 263S–269S, 1991.

VIGLINO, L.; PELLETIER, E.; ST-LOUIS, R. Highly persistent butyltins in northern marine sediments: A longterm threat for the Saguenay Fjord (Canada). **Environ.Toxicol. Chem.** v. 23, n. 11, p. 2673–2681, 2004.

WESELER, A. R.; BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Current Hypertension Reports**. v. 12, n. 3, p. 154–161, 2010.

WHALEN, M. M.; LOGANATHAN, B. G.; KANNAN, K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. **Environ. Res**. v. 81, n. 2, p. 108–116, 1999.

WHO. Toxicological review tributyltin oxide [Online] 1997 <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0349tr.pdf> (accessed May 2013).

WOLIN, M. S., GUPTA S. A.; OECKLER, R. A. Superoxide in the vascular system. **J Vasc. Res**. v. 39, n. 3, p.191–207, 2002.

WWF Factsheet. Organotin compounds – incl. butyltins (TBT) – WWF. <www.wwf.org.uk/filelibrary/pdf/factsheet_organotins_food.pdf>.

WHALEN, M. M.; LOGANATHAN, B. G.; KANNAN, K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. **Environ. Res**. v. 81, n. 2, p. 108–116, 1999.

XING, D.; NOZELL, S.; CHEN, Y. F.; HAGE, F.; OPARIL, S. Estrogen and Mechanisms of Vascular Protection. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** V. 29, n. 3, p. 289–295, 2009.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature.** v. 332, n. 6163, p. 411–5, 1988.

YOSHIZUKA, M.; HARA, K.; DOI, Y.; MORI, N.; YOKOYAMA, M.; ONO, E.; FUJIMOTO, S. The toxic effects of bis (tributyltin) oxide on the rat thoracic aorta. **Histol. Histopathol.** v. 7, n. 3, p. 445–449, 1992.

ZALBA, G.; BEAUMONT, F. J.; SAN JOSE, G.; FORTUNO, A.; FORTUNO, M. A.; ETAYO, J. C.; DIEZ, J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.** v. 35, n. 5, p. 1055–1061, 2000.

ZUO, Z.; CHEN, S.; WU, T.; ZHANG, J.; SU, Y.; CHEN, Y.; WANG, C. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. **Environ. Toxicol.** v. 26, n. 1, p. 79–85, 2011.