

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Esdras Barbosa Garcia

**ESTUDO DA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL AO FILTRO SOLAR OCTIL
METOXICINAMATO E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NEURO-
IMUNE-ENDÓCRINO DE ROEDORES**

Rio de Janeiro

2019

Esdras Barbosa Garcia

**ESTUDO DA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL AO FILTRO SOLAR OCTIL
METOXICINAMATO E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NEURO-
IMUNE-ENDÓCRINO DE ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientador: Dr. Fabio Coelho Amendoeira
Coorientador: Dr. Fausto Klabund Ferraris

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Biblioteca

Garcia, Esdras Barbosa

Estudo da exposição pós-natal ao filtro solar octil metoxi cinamato e seus efeitos sobre o sistema neuro-imune-endócrino de roedores . / Esdras Barbosa Garcia. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

129 f. : fig. ; graf. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: Fabio Coelho Amendoeira.

Co-orientador: Fausto Klabund Ferraris.

1. Filtro Solar. 2. Neuro-Imune-Endócrino. 3. Manifestações Neurocomportamentais. 4. Alterações Imunológicas. 5. Vigilância Sanitária. I. Título.

Study of post-natal exposure to octyl methoxy cinnamate sunscreen and its effects on the rodents neuro-immune-endocrine system.

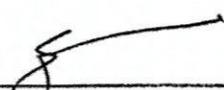
Esdras Barbosa Garcia

**ESTUDO DA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL AO FILTRO SOLAR OCTIL
METOXICINAMATO E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NEURO-IMUNE-
ENDÓCRINO DE ROEDORES**

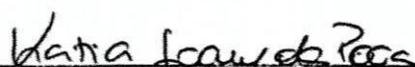
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor em
Vigilância Sanitária

Aprovado em 28/02/2019

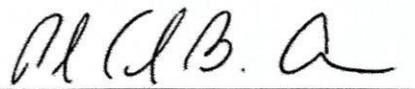
BANCA EXAMINADORA



Isabella Fernandes Delgado (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)



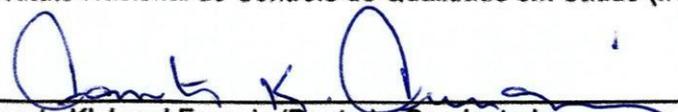
Katia Soares da Poça (Doutora)
Instituto Nacional de Câncer (INCA)



Pedro Celso Braga Alexandre (Doutor)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)



Fabio Coelho Amendoeira (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)



Fausto Klabund Ferraris (Doutor) - Coorientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

Dedico este trabalho a todos os que caíram,
mas principalmente aos esforços de todos que
lutaram para me manter de pé.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão...

A Deus por ter me dado força, saúde e muita sabedoria para continuar seguindo em frente mesmo diante de tantas dificuldades.

Aos Anjos e Santos, em especial São Jorge e São Miguel Arcanjo por me cobrirem e me protegerem nessa cidade maravilhosa, mas que anda tão violenta e perigosa.

A Maria, Mãe do filho de Deus e minha Mãe por me cobrir com seu manto sagrado me consolando em todas as minhas dores e aflições.

A minha amada Tia Verinha, meu porto seguro, minha mãe do coração, minha mentora nessa peregrinação terrestre. A responsável por me motivar e patrocinar meus sonhos. A mola propulsora que me impulsiona sempre e que não importa a circunstância não me deixa desanimar. A coluna mestra.

A Tia Pretinha, que mesmo com seu jeito rabugento de ser, não esconde sua admiração por mim.

Ao Tio Serginho, o flamenguista mais “doente” que eu conheço nesse planeta, por seu amor, por seu afeto e por sua maneira singela de demonstrar esses sentimentos mesmo com suas limitações físicas.

A minha amada irmãzinha do coração, Jacxilaine, “Jacxi”, por seu amor insistente, por seu ciúme protetor, por sua intensa afetuosidade.

A minha mulher, Julianna, “Juh” por seu companheirismo diário, por sua doçura, por sua ternura, por sua constante preocupação com minha saúde, aparência e bem estar. Por estar do meu lado no tempo das vacas magras e no tempo das vacas gordas. Por todo o seu amor.

Ao meu Pai, “Coronel” por suas ligações e cobranças para visitá-lo e para não esquecer-lo quando eu fosse pra minha terra natal.

A sua esposa Geni, por me tratar como filho e só deixar sair da mesa depois de repetir a comida, tomar suco de goiaba e comer pudim.

A minha irmã Meguilane, “Megui”, por sua humanidade, por sempre demonstrar que se importa comigo, por sua gargalhada escandalosa.

Ao tio Ivan, que enganou a morte algumas vezes e a quem Deus deu mais uma oportunidade de me ver triunfar mesmo com um aneurisma em uma artéria abdominal. Obrigado por suas bênçãos e por torcer pelo meu sucesso.

Ao meu amigo João Domingos, pelo apoio, companheirismo, preocupação e ajuda incondicional.

Ao meu grande amigo Celcimar, “O Velho”, por sua lealdade, por sua hombridade, por sua motivação, por sua energia leve e por boas risadas que já demos juntos.

A minha comadre e amiga de infância Jacqueline, por ter me cobrado o tempo todo a minha presença de forma insistente. Por seu amor e carinho, pelas “gordices” infinitas, pelos Shows do Celebrare, mas essencialmente por sua amizade incondicional, por ser uma irmã.

A minha afilhada Larah, meu docinho, por seu amor puro e terno. Por sempre me perguntar: - Ô “Dindo”, quando você vai vir aqui em casa? E por fazer ligação de vídeo só para me mostrar o que tem de gostoso que eu não tenho. Pra eu passar raiva mesmo.

A Marildinha, mãe da Jacqueline, vó da Larah, filha da dona Neide. Isso mesmo galera, para conversar com a gente sobre alguém ela necessita informar a árvore genealógica completa do indivíduo em questão. Marildinha, agradecer por aquele último copo de Coca-Cola que você deu pra mim e não pra sua filha, pelo caldo verde gostoso que você faz e pelas duas conchas de feijão cheias que eu como aí quando almoço, quando janto ou quando almoço e janto.

A minha amiga Josiane, por sua constante preocupação via WhatsApp e pelas piadas enviadas pelo Instagram. Pela amizade.

A Paty e família pelo companheirismo e amizade. De vizinhos na infância para vizinhos na vida adulta.

Ao meu Orientador Dr. Fabio Amendoeira, minha bússola acadêmica, por ter me guiado durante esses 6 anos. Por seu acólito em seu Laboratório. Por ter me orientado com questões extra científicas, por sua amizade valorosa, por sua expertise em Farmacologia e Toxicologia. E por forjar hoje uma “espada” afiada.

Ao meu Coorientador Dr. Fausto Ferraris, pelo frescor da juventude na Ciência, por vibrar com meus resultados experimentais mesmo quando eles eram de fato nada animadores. Por me mostrar a beleza existente no mundo da Imunologia. Por sua amizade e constante motivação.

Ao meu colaborador, mas também meu Coorientador na prática Dr. Tiago Savignon, “O Detona Ralf”, por ter quebrado muitos galhos, portas e alicates de ossos. Por ter me auxiliado com as ideias dos testes comportamentais, por ter me ensinado tanta coisa de estatística, por ajudar-me na análise crítica da mesma.

As meninas Superpoderosas do Laboratório, engrenagens fundamentais na realização de boa parte dos experimentos:

Amanda, “A Fada”, por seu “encanto” e ajuda com os tratamentos, por atuar como um “coringa” em múltiplas tarefas. Por sua amizade e pelos passeios juntos.

Thais, “Honey”, pela ajuda na execução dos testes comportamentais, por ter presenciado meus banhos no labirinto aquático de Morris. Pelas muitas risadas diárias, por sua paciência constante. Por sua amizade e pelas festinhas juntos.

Flávia, “Flavinha”, pela ajuda nos dias de eutanásia, pelas risadas, pela amizade. Pelas caronas e ótima Cia no Estágio em Docência.

Laís, “Don’t worry”, pelo apoio na citometria, pelo altruísmo, pela gentileza, por suas pérolas diárias como gás encanado, namoradeira na janela entre outras. Pela amizade.

Naína, pela ajuda nos ensaios de citotoxicidade e proliferação, por indiretamente me “forçar” a ser um Cientista melhor, me instigando sempre a ter ou buscar as respostas para seus dilemas acadêmicos. Pelas palestras agendadas. Pela amizade da minha futura Bióloga.

Amanda, “A Birigui”, pelo apoio nos experimentos de citotoxicidade e proliferação, por seu jeito pitoresco de falar do interior de São Paulo, por seu carinho, por sua voz aguda que vai ao fundo do tímpano e por seu jeito espontâneo e expansivo. Por sua amizade.

Yasmin, “A Chaveirinho”, minha Coorientada, espero ter deixado um legado pra você. Por esta oportunidade e por induzir com sucesso o diabetes do tipo II em todos os membros do Laboratório, pelo fato de todos os dias religiosamente levar uma guloseima para a turma. Por seu comprometimento com as leituras dos artigos, experimentos e pesquisas. Pela amizade da minha futura Médica Veterinária.

A colaboração da UERJ em meus experimentos e todo meu agradecimento a Dra. Patricia Lisboa, Dr. Egberto Gaspar, Dr. Alex Manhães, Dra. Viviane Raposo, Dra. Camila Calviño, Dra. Janaine Cavalcanti e a toda equipe do Laboratório de Fisiologia Endócrina do Departamento de Ciências Fisiológicas da UERJ (LabFisEnd).

Ao Dr. Vinícius Carvalho do Laboratório de Inflamação do IOC por suas sugestões com o projeto filtro solar, por suas instruções durante o Estágio em Docência. Por sua amizade.

Ao Dr. Pedro Braga da UNIRIO por ter me acolhido muito bem na universidade e por ter sido meu Preceptor durante o Treinamento Didático I e II no Estágio em Docência. Por suas dicas valiosas.

Ao Professor Francisco Alves da UNISUAM por suas dicas e recomendações no Estágio em Docência.

Pela minha Trupe da Iniciação científica, Sergio pela inserção na Ciência e pelos convites para Workshops, Leon pelos convites para sociais e Camille pelas suas mensagens lá da Irlanda de ânimo e amizade.

A Dra. Renata Medeiros do LABFIS por ter me cedido o uso do espectrofotômetro.

Ao Dr. Octávio Presgrave e sua equipe do Pirogênio pelo uso do freezer – 70°C e pelo espectrofotômetro.

Ao Dr. Wlamir da Imunologia pelo uso do freezer – 70°C.

A Taline e a Me. Renata Calil da Citogen pela estufa de CO₂, microscópio invertido, ultrassom, micro-ondas, agitador magnético, pela amizade.

Ao Nelson e ao Dr. Fernando Fingola do LAL pelas brincadeiras. Pela amizade.

Dona Dalva, Geralda e Luziana por manterem nossas dependências sempre limpinhas e cheirosas.

A todo o Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT).

A Microbiologia pela água destilada.

Ao INCQS e toda a sua equipe.

Ao ilustre diretor do INCQS Dr. Antônio Eugênio.

Aos coordenadores da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, Katia Leandro por sua doçura e profissionalismo e Ivano de Filippis por sua pro atividade e competência.

Aos professores da Pós-graduação pelos conhecimentos veiculados.

A equipe de ouro da Secretaria da Pós-graduação, Alícia, Sâmela, Jéssica, Gisele, Gorete por tamanho empenho e dedicação para resolução dos problemas. Pela amizade.

A equipe do Serviço de Animais de Laboratório (SAL), Reginaldo pelo profissionalismo, respeito e compreensão, Thais por sua capacidade rápida de resolução de problemas, Marcos por sua dinâmica com os animais e pelas ótimas discussões sobre política. Júlio Careca, Júlio Mudinho, André e Dona Tereza pela manutenção das salas do Biotério.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ), pelo fornecimento dos ratos e camundongos bem como as análises bioquímicas e hematológicas na Plataforma.

A equipe da Manutenção, Sergio, Amarildo, Damião, Alex, por terem ajustado as medidas da minha caixa d'água para realização do Labirinto Aquático de Morris. A todos dessa equipe por esse e por outros serviços prestados com maestria.

Ao RH por suporte aos alunos e confecção dos certificados e a ACS pela confecção dos pôsteres para congresso.

Ao SGT, pelo envio dos memorandos nos incontáveis feriados e finais de semana trabalhados, Dona Lourdes, Anderson e toda a equipe.

A recepção do INCQS por nos receberem bem e aos seguranças e bombeiros por nos protegerem.

Ao Senhor Gerard, nosso copeiro, e Antônio da Gaita por me incluírem na organização dos eventos.

A Biblioteca, a Informática, ao Patrimônio, a Metrologia, o Almoxarifado.

Ao meu suporte financeiro PAPES, APQ1, FIOCRUZ e a toda FIOCRUZ por minha formação nessa escola de Ciência e patrimônio mundial.

Um pouco de Ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.

Louis Pasteur

RESUMO

INTRODUÇÃO: A radiação ultravioleta (UV) pode gerar vários efeitos nocivos à saúde humana, dentre eles danos no DNA, catarata, melanoma, dentre outras malignidades. Em função desses efeitos existe a necessidade de proteger a saúde da população dos raios UV utilizando-se de cosméticos que atuem como filtros contra essa radiação. O octil metoxi cinamato (OMC) é um deles. Diversos estudos têm apontado o OMC como potencial desregulador da tireoide, além da sua presença em fluidos biológicos como o leite materno humano, sangue e urina. Em humanos, alterações na função tireoidiana durante períodos críticos do desenvolvimento podem gerar comprometimentos como hiperatividade, problemas motores e déficit de memória e aprendizagem. **OBJETIVO:** O presente trabalho visa avaliar se a exposição ao OMC no período lactacional é capaz de induzir a desregulação tireoidiana e alterações neurocomportamentais em ratos, bem como, a desregulação tireoidiana e do sistema imune em camundongos. **METODOLOGIA:** Foram utilizados ratos Wistar e camundongos Swiss de ambos os sexos. As gestantes foram acompanhadas do dia gestacional 0 ao 22. Os ratos filhotes foram divididos nos 3 grupos de exposição no dia pós-natal 1 (PN): óleo de milho, PTU (4mg/Kg/dia) ou OMC (500 mg/Kg/dia) e receberam diariamente uma dose de OMC 500 mg/kg/dia ou dos controles. No PN23 o sangue foi coletado de metade dos filhotes para dosagem de T4, análise bioquímica e hematológica e a outra metade seguiu durante a pré-puberdade para serem submetidos a testes comportamentais. Os camundongos Swiss filhotes e as mães foram divididos em 5 grupos de exposição no dia pós-natal 1: óleo de milho, PTU (4mg/Kg/dia), OMC (1.000 mg/Kg/dia) e apenas as lactantes (mães) receberam diariamente uma das doses de OMC ou dos controles. No PN23, o sangue foi coletado de todos os filhotes para dosagem de T4, contagem de leucócitos totais e contagem diferencial no sangue periférico. O baço, timo e os linfonodos inguinais foram pesados. Também, foi realizado o ensaio de citotoxicidade e de proliferação celular do OMC no baço de camundongos Swiss. E realizado o ensaio com baço de camundongos Swiss. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A exposição dos ratos ao OMC durante o período lactacional reduziu 20% do T4 total, atrasou a abertura de olhos de 93,5% da prole e reduziu o ganho de peso corporal. A análise hematológica evidenciou uma redução em 27% do número de plaquetas e 36% do número de glóbulos brancos apenas nas fêmeas. Nos testes comportamentais foi observada uma alteração na deambulação apenas dos machos sem alteração na neofilia no teste do campo vazado. O labirinto aquático de Morris revelou alteração no aprendizado dos ratos de ambos os sexos. A exposição dos camundongos ao OMC via leite materno reduziu 19% do T4 total, gerou atraso na abertura de olhos dos expostos na dose de 1.000 mg/Kg/dia. Além disso, o filtro solar gerou uma redução no ganho de peso dos roedores de ambos os sexos na maior

dose. Essa mesma dose gerou aumento no peso relativo do baço. No ensaio de atividade mitocondrial com MTT, as concentrações de 10, 100 e 200 µg/mL e no ensaio de proliferação celular com CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster) as concentrações de 10 e 100 µg/mL reduziram a proliferação de células do baço de camundongos expostos ao OMC. No ensaio com CFSE, a suplementação com T4 a 10^{-5} M aos animais expostos ao OMC restabeleceu a proliferação celular. **CONCLUSÃO:** O filtro solar OMC causou várias alterações no desenvolvimento, sistema imune, parâmetros hematológicos, comportamento e proliferação celular e ao que tudo indica sugere-se que grande parte dessas alterações pode ser atribuída a desregulação tireoideana induzida por essa substância. Tais alterações servem de alerta para o uso de OMC em infantes expostos em períodos críticos do desenvolvimento.

Palavras-chave: Filtro solar, OMC, desregulador da tireóide, sistema imune, neurocomportamental, desenvolvimento, período lactacional, infantes.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The ultraviolet radiation may induce several adverse effects for human health, as well DNA damage, cataract, immunosuppression, melanoma and others malignancies. Because these effects is necessary to protect the population health of ultraviolet (UV) using cosmetics that act like filters against this radiation and octyl methoxycinnamate (OMC) is one these. Several studies shows the OMC like potential thyroid disruptor that may to be in biologics fluids such as blood, urine and human breast milk. It is well knew that disturbances in the thyroid axis during critical period of development may cause hyperactivity, motor disorders and deficit in memory and learning. **OBJETIVE:** This present work aim to evaluate if the thyroid disruption induced by administration of OMC in rats in lactacional period cause neurobehavioral alterations in rats such as in mice immune system. **METODOLOGY:** It was used Wistar rats and Swiss mice both sexes. The pregnant were accompanied at gestational day 0 to 22. The pups rats were divided in 3 groups of exposition in the post-natal day 1 (PND): corn oil, PTU (4mg/Kg/day) or OMC (500 mg/Kg/day) and received daily one dose OMC 500 mg/kg/day or controls. In the PND23 the blood were collected of half pups for total T4 dosage, biochemistry analysis and hematologic and the other half followed during the pre-puberty for to be submitted to behavioral tests. The Swiss mice pups and the dams were divided in 5 groups of exposition in the PND1: corn oil, PTU (4mg/Kg/day), OMC (1.000 mg/Kg/day) and only the dams received daily one of doses OMC or controls. In the PND23, the blood were collected of all pups for total T4 dosage, count of total leukocytes and differential count in the peripheral blood. The spleen, thymus and inguinal lymph nodes were weighed. Moreover, were done the assay of cytotoxicity and proliferation cell of OMC in spleen of mice Swiss. **RESULTS AND DISCUSSION:** The exposition of rats to the OMC during lactacional period decreased 20% of total T4, delayed the eyes opening of 93,5% of pups and decreased the gain of body weight. The hematologic analysis showed reduction in 27% of platelets number and 36% of leukocytes number only in the females. In the behavioral tests was displayed change in the locomotor activity just male less change in the neophilia in the hole board test. The Morris water maze showed alteration in the learning of rats both sexes. The exposition of mice to OMC via breast milk decreased 19% total T4, induce delay in the eyes opening exposed dose 1.000 mg/Kg/day. Furthermore, the sunscreen induced reduction in the weight gain in rodents of both sexes in the higher dose. This same dose induced increase in the relative weight of spleen. In the assay of mitochondrial activity with MTT, the concentrations 10, 100 and 200 µg/mL and in the assay of cell proliferation with CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester), the concentrations 10 and 100 µg/mL decreased the cells proliferation of spleen of mice exposed to the OMC. However, in the assay with CFSE, the supplementation with total T4

10^{-5} M reestablished the cell proliferation. **CONCLUSION:** The sunscreen OMC induced several alterations in the development, immune system, hematologic parameters, behavior and cell proliferation and suggest that most of these changes may be attributed to thyroid disruption induced by OMC. Such alterations serve as a warning for the use of OMC in infants exposed in critical periods of development.

Key words: Sunscreens, OMC, thyroid disruptor, immune system, neurobehavioral alterations, development, lactacional period, infants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espectro eletromagnético	22
Tabela 1. Tipo de radiação UV	23
Figura 2. Labirinto em Cruz Elevado	41
Figura 3. Campo Vazado.....	42
Figura 4. Labirinto Aquático de Morris	43
Tabela 2. Pontos de partida (seções) durante as duas etapas do teste	45
Figura 5. Desenho da piscina com plataforma.....	45
Figura 6. Desenho da piscina sem plataforma.....	46
Figura 7. Desenho experimental do ensaio com os ratos.....	47
Quadro 1: Anticorpos usados na marcação de triturado de baço e timo	49
Figura 8. Desenho experimental do ensaio com os camundongos.	51
Figura 9. Esquema da placa de 96 poços do ensaio de citotoxicidade em baço de camundongos	54
Figura 10. Esquema para obtenção das concentrações individualizadas do filtro solar OMC no ensaio de citotoxicidade.....	55
Figura 11. Esquema da placa de 96 poços do ensaio de atividade mitocondrial em camundongos.....	58
Figura 12. Esquema para obtenção das concentrações individualizadas do filtro solar OMC no ensaio de atividade mitocondrial.....	60
Figura 13. Esquema da placa de 96 poços do ensaio de Proliferação celular com CFSE	62
Figura 14. Esquema para obtenção das concentrações individualizadas do filtro solar OMC na proliferação celular com CFSE	64
Gráfico 1 – Percentual de sobrevivência.....	66
Tabela 3. Efeito da exposição ao OMC sobre o desenvolvimento de ratos recém- nascidos de ambos os sexos.....	68
Gráfico 2 - Ganho de peso durante o período lactacional de ratos.....	69
Gráfico 3 - Ganho de peso durante o período lactacional de ratas.....	70
Gráfico 4. Dosagem hormonal de tiroxina (T4 total)	71

Tabela 4. Análise bioquímica sérica de ratos de ambos os sexos.	72
Tabela 5. Análise hematológica do sangue total de ratos de ambos os sexos.....	73
Gráfico 5 - Teste do labirinto em cruz elevado em ratos no dia PN25	74
Gráfico 6 - Teste do campo vazado (deambulação) em ratos no dia PN26	75
Gráfico 7 - Teste do campo vazado (neofilia) em ratos no dia PN26	76
Gráfico 8 – Teste do labirinto aquático de Morris machos Etapa 1	77
Gráfico 9 – Teste do labirinto aquático de Morris fêmeas Etapa 1	78
Gráfico 10 – Teste do labirinto aquático de Morris Etapa 2	79
Tabela 6. Efeito da exposição ao OMC sobre desenvolvimento de camundongos de ambos os sexos.	80
Gráfico 11 - Ganho de peso durante o período lactacional de camundongos machos durante 22 dias de exposição ao OMC.	81
Gráfico 12 - Ganho de peso durante o período lactacional de camundongos fêmeas durante 22 dias de exposição ao OMC.....	82
Gráfico 13 – Dosagem hormonal de tiroxina (T4 total) camundongos.....	83
Gráfico 14 – Peso e celularidade relativas dos órgãos linfoides de camundongos no PN23 de ambos os sexos	85
Gráfico 15 – Contagem de leucócitos totais e diferenciais de camundongos no PN23 de ambos os sexos.....	86
Gráfico 16 – N° de linfócitos B e T em camundongos no PN23 de ambos os sexos.	87
Gráfico 17 – N° de timócitos em camundongos no PN23 de ambos os sexos.	88
Gráfico 18 – Avaliação de Citotoxicidade no baço de camundongos.....	89
Gráfico 19 – Avaliação de Atividade Mitocondrial no baço de camundongos.....	90
Figura 15 – Imagem da Atividade Mitocondrial.....	91
Gráfico 20 – Avaliação da Proliferação Celular com CFSE no baço de camundongos.....	92
Gráfico 21 – Histograma do ensaio de Proliferação Celular	93

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ALT	Alanina transaminase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato transaminase
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
cm	Centímetro
CV	Campo Vazado
dL	decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAL	Fosfatase alcalina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Fibra musgosa
g	Gramma
G	Força G
GD	Dia gestacional
h	Hora
HC	Hipotireoidismo congênito
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HPT	Hipotálamo-Pituitária-Tireóide
HT	Hormônios tireoideanos
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Kg	Quilograma

LAM	Labirinto aquático de Morris
LCE	Labirinto em cruz elevado
LDH	Lactato desidrogenase
MBC	Metil benzilideno cânfora
MCV	Volume corpuscular médio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NKT	Células Natural Killer T
PBS	Tampão fosfato salinizado
PN	Pós-natal
PTU	Propiltiouracil
RBC	Células vermelhas do sangue
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TRH	Hormônio tireotrófico
TSH	Hormônio tireoestimulante
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina ou tetraiodotironina
µg	Micrograma
µL	Microlitro
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
WBC	Células brancas do sangue

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Relação tireóide e sistema nervoso	26
1.2 Relação tireóide e sistema imunológico	28
2- JUSTIFICATIVA	31
3- OBJETIVO GERAL	32
3.1 - Objetivos Específicos.....	32
4- METODOLOGIA	33
4.1 Animais.....	33
4.1.1 Ratos e Camundongos.....	33
4.2 Administração de drogas e formação dos grupos	34
4.3 - PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	35
4.3.1 OMC e Veículo.....	35
4.3.2 PTU e Veículo	35
4.3.3 Tiroxina e Veículo	36
4.4 PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO	36
4.5 ENSAIO DE SOBREVIDA E DEFINIÇÕES DE DOSES.....	36
4.6 Coleta de sangue.....	37
4.7 DOSAGEM HORMONAL DE Tiroxina TOTAL (T4)	38
4.8 Análise de parâmetros bioquímicos e hematológicos (RATOS).....	40
4.9 Testes comportamentais (ratos).....	41
4.9.1 Labirinto em cruz elevado (LCE).....	41
4.9.2 Campo vazado (CV)	42
4.9.3 Labirinto aquático de Morris (LAM)	43
4.10 Coleta de órgãos (CAMUNDONGOS).....	48
4.11 Análises da expressão de marcadores de diferenciação em timócitos e esplenócitos por citometria de fluxo	48

4.12	Marcação de superfície dos linfócitos.....	49
4.13	Avaliação da Citotoxicidade NO BAÇO DE CAMUNDONGOS	52
4.14	avaliação da atividade mitocondrial NO BAÇO DE CAMUNDONGO	56
4.14.1	Procedimentos para sensibilização com anti CD3.....	57
4.14.2	Procedimentos para a obtenção das concentrações de OMC	59
4.14.3	Procedimentos para adição do MTT e revelação da placa.....	61
4.15	AVALIAÇÃO DA Proliferação Celular NO BAÇO DE CAMUNDONGOS.....	61
4.15.1	Procedimentos para sensibilização com anti CD3.....	61
4.15.2	Procedimentos para o preparo do filtro solar OMC e T4	63
4.16	análise estatística	65
5	– RESULTADOS	66
5.1	Percentual de Sobrevida (RATOS)	66
5.2	Desenvolvimento	67
5.3	Ganho de Peso	69
5.4	Dosagem hormonal.....	71
5.5	Análise bioquímica E HEMATOLÓGICA	72
5.6	testes comportamentais	74
5.6.1	Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	74
5.6.2	Campo Vazado (CV).....	75
5.6.3	Labirinto Aquático de Morris (LAM)	77
5.6.3.1	Etapa de aquisição de memória (aprendizagem).....	77
5.6.3.2	Teste de memória no LAM (5º dia)	79
5.7	DESENVOLVIMENTO (CAMUNDONGOS).....	80
5.8	Ganho de Peso	81
5.9	DOSAGEM HORMONAL.....	83
5.10	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO OMC SOBRE ÓRGÃOS LINFÓIDES	84
5.11	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO OMC SOBRE SANGUE PERIFÉRICO.....	86

5.12 EFEITOS DO OMC SOBRE OS LINFÓCITOS B E T.....	87
5.13 EFEITOS DO OMC SOBRE OS TIMÓCITOS.....	88
5.14 AVALIAÇÃO DA Citotoxicidade.....	89
5.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL.....	90
5.16 AVALIAÇÃO DA Proliferação Celular.....	92
6 – DISCUSSÃO.....	94
7 – CONCLUSÃO.....	113
REFERÊNCIAS.....	114

1- INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta (UV) pode desencadear diversos efeitos nocivos à saúde humana, dentre eles: envelhecimento precoce, catarata, alterações químicas e histológicas na pele, imunossupressão, melanoma, danos no DNA, dentre outras malignidades (BALOGH et al., 2011).

A radiação UV emitida pelos raios solares é parte do espectro eletromagnético referente aos comprimentos de onda entre 100 e 400 nm como mostra a figura 1. Em função da intensidade com que essa radiação UV é absorvida pelo oxigênio e pelo ozônio, bem como seus efeitos fotobiológicos, a região UV pode ser subdividida em 3 intervalos espectrais como mostra a tabela 1.

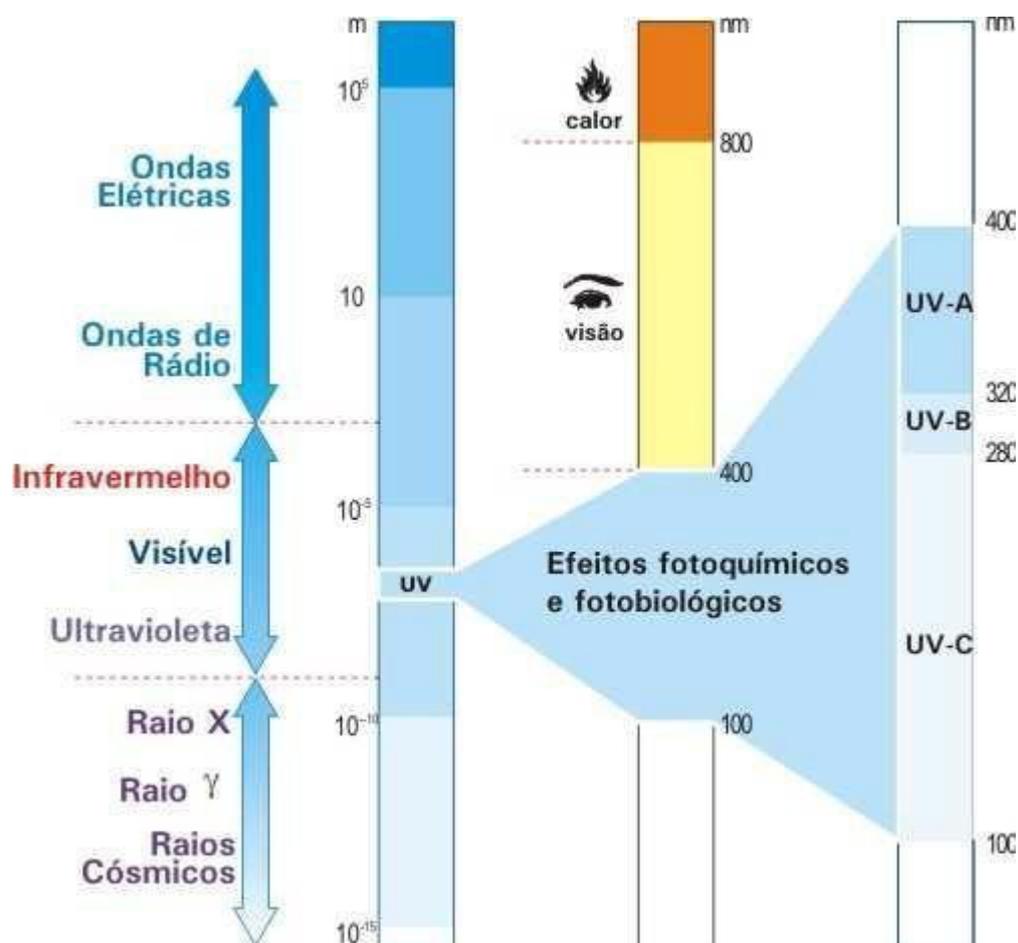


Figura 1. Espectro eletromagnético

Fonte: INPE

Tabela 1. Tipo de radiação ultravioleta

Fonte: Adaptado do INPE

Nome	Intervalo Espectral (nm)	Características e Efeitos
UVC	100 - 280	Totalmente absorvida pelo oxigênio e pelo ozônio estratosférico. Portanto, não atinge a superfície terrestre. É utilizada na esterilização de água e materiais cirúrgicos.
UVB	280 - 320	Fortemente absorvida pelo ozônio estratosférico. É prejudicial à saúde humana, podendo causar queimaduras e câncer de pele a longo prazo.
UVA	320 - 400	Sofre pouca absorção pelo ozônio estratosférico. É importante para síntese de vitamina D no organismo. Contudo, o excesso de exposição pode causar queimaduras e envelhecimento precoce a longo prazo.

Em função desses efeitos deletérios causados pela radiação UV, o uso dos filtros UV tem crescido no mundo todo nas últimas décadas, como forma de prevenção aos efeitos danosos desta radiação (WANG et al., 2001; KRAUSE et al., 2012).

Os filtros UV são altamente lipofílicos e podem ser classificados em inorgânicos ou orgânicos. O primeiro grupo tem como principais representantes o dióxido de titânio (TiO₂) e o óxido de zinco (ZnO), que por serem impermeáveis aos raios UV agem refletindo a radiação em sua maior parte. O segundo grupo tem como representantes as benzofenonas, os derivados dos benzilidenos cânfora, salicilatos, benzimidazóis, para-aminobenzóicos e os cinamatos, que agem absorvendo a radiação UV de alta energia, nociva aos seres humanos, transformando-as em radiação de baixa energia (CABRAL et al., 2011).

Dentre os vários produtos de cuidado pessoal presentes no mercado, diversos cosméticos possuem uma ou mais associações dessas substâncias anteriormente mencionadas em sua composição, sendo eles: protetores solares, xampus, sprays para cabelo, tonalizantes, batons, protetores labiais, sabonetes líquidos entre outros, produtos esses que se encontram registrados no Brasil. Além de produtos de cuidado pessoal, os filtros solares também podem ser encontrados em aditivos plásticos, tapetes, roupas e sabão em pó, o que ressalta ainda mais a aplicação espectral destes compostos (SCHLUMPF et al., 2004).

Observações realizadas em voluntários humanos no ano de 1990 mostraram que as substâncias orgânicas presentes nos protetores solares penetram na pele e podem ser encontradas no nível sistêmico (HAYDEN et al., 1997; FELIX et al., 1998). Alguns estudos têm reportado a presença de filtros UV orgânicos em vários fluídos corporais, tais como urina (CALAFAT et al., 2008), sangue (YE et al., 2005), leite materno (YE et al., 2005) e sêmen (LEON et al., 2010). Além disso, os filtros UV têm sido encontrados em ecossistemas aquáticos (FENT et al., 2010), apontando a presença dessas substâncias na água de torneira (DÍAZ-CRUZ et al., 2012), águas residuais e lodo de esgoto tratado (GAGO-FERRERO et al., 2011), tecido muscular de peixes da espécie *Salmo trutta* (BUSER et al., 2006) e em aves mergulhadoras (FENT et al., 2010), sugerindo a possibilidade da presença sistêmica destas substâncias.

Diversos dados na literatura têm demonstrado que os filtros UV orgânicos apresentam atividade desreguladora endócrina, podendo atuar no eixo hipotálamo-pituitária-tireóide (HPT), além de afetar também a capacidade reprodutiva e diferentes aspectos do desenvolvimento de humanos e roedores (KRAUSE et al., 2012). Vários são os agentes já conhecidos que podem desregular o eixo HPT, especialmente se a exposição ocorrer em períodos precoces do desenvolvimento. As alterações podem ser diretas, na glândula, e/ou nos centros reguladores superiores, a saber, o hipotálamo e a hipófise, afetando os níveis de hormônios tireotróficos (TRH) e/ou tireoestimulante (TSH), hormônios estes diretamente relacionados à síntese dos hormônios tireoidianos. Dentre os disruptores endócrinos que podem alterar o eixo HPT, podemos citar: o alaclor (agrotóxicos) (WILSON et

al., 1996), as isoflavonas (fitoesteróides da soja), a etilenourea (presente em fungicidas), as tionamidas (fármacos) (DIVI et al., 1997), os tetrabromobisfenóis A (retardantes de chama) (SCHUUR et al., 1998; DARNERUD et al., 2003) e os filtros UV, podendo ser incluídos neste grupo as benzofenonas 2 e 3, os benzilidenos cânfora e o octil metoxicinamato ($C_{18}H_{26}O_3$) (SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2006; KLAMMER et al., 2007).

O octil metoxicinamato (OMC) é provavelmente o filtro orgânico mais amplamente utilizado em todo o mundo. É um filtro solar UVB líquido, com pico de absorção em 308 nm. É insolúvel em água e miscível em etanol e em diversos lipídeos utilizados em formulações dermocosméticas (vaselina líquida, óleo de amêndoas, óleo de oliva, ciclometicona, dipropilenoglicol, ésteres graxos e óleos vegetais) (SCHNEIDER et al., 2004). Com relação à capacidade de absorção sistêmica do OMC pela pele, já foi demonstrado sua presença em amostras de urina e sangue após aplicação dérmica (JANJUA et al., 2004). Esta substância também foi encontrada em amostras de leite materno de mulheres que foram expostas ao OMC (SCHLUMPF et al., 2008). Nas últimas décadas, os estudos que avaliavam a exposição ao OMC tinham como foco os efeitos estrogênicos e anti-androgênicos tanto em animais selvagens como em animais de laboratório (GELBKE et al., 2004; OWENS et al., 2006; SAFE et al., 2004), sendo demonstrado efeitos tóxicos em vários órgãos, como útero, vagina e fígado (SEIDLOVA-WUTTKE et al., 2006; KLAMMER et al., 2007). Contudo poucos foram os estudos que avaliaram a influência do OMC sobre o eixo HPT.

Os hormônios tireoidianos desempenham papel fundamental durante o desenvolvimento de diversos sistemas em mamíferos, com especial atenção para o desenvolvimento do sistema nervoso central e no sistema imunológico (CHROUSOS et al., 2000; ARLT et al., 2004).

1.1 RELAÇÃO TIREÓIDE E SISTEMA NERVOSO

Vários fenômenos do neurodesenvolvimento são influenciados pelos hormônios da tireóide, como: crescimento axonal e dendrítico, migração, sinaptogênese e sobrevivência neuronal, proliferação e diferenciação de oligodendrócitos e mielinização, bem como a eficácia sináptica (ANDERSON et al., 2003).

A importância dos hormônios da tireóide no desenvolvimento é observada durante situações em que ocorre o excesso ou déficit destes. Prejuízos intelectuais marcantes ocorrem em recém-nascidos com hipotireoidismo congênito decorrentes da ausência de hormônios tireoideanos (ausência do suprimento desses hormônios pela mãe e/ou pelo feto), resultando em uma redução generalizada dos processos metabólicos (HEYERDAHL et al., 1991; KLEIN et al., 1999; BONGERS-SCHOKKING et al., 2001; ROVET et al., 2003). O hipertireoidismo durante a infância pode também levar a uma significativa deficiência intelectual, embora esses efeitos não tenham sido muito bem detalhados ainda (KOPELMAN et al., 1983; BOYAGES et al., 2000; WHYBROW et al., 2000).

O hipotireoidismo congênito (HC) é a causa mais comum e tratável de retardo mental e a sua prevalência é de aproximadamente 1/3.000 nascimentos (BUYUKGEBIZ et al., 2003), sendo que os efeitos relacionados ao HC variam com a intensidade da deficiência. O cretinismo é o quadro mais severo relacionado ao HC e compreende sintomas como espasticidade, retardo mental severo e surdez (MORREALE DE ESCOBAR et al., 1987). Efeitos de coordenação motora pobre, ataxias, displegia espástica, hipotonia muscular, estrabismo e distúrbios de aprendizado também relacionam-se com o HC (BUYUKGEBIZ et al., 2003). Quadros de depressão e distúrbios de memória também se fazem presentes no adulto (RIVAS & NARANJO et al., 2007).

Estudos realizados em camundongos por SCHWEGLER e colaboradores (1991) mostram que o hipertireoidismo pode aumentar o tamanho da fibra musgosa (fm), um grupo de axônios terminais que surgem de células granulares do giro denteado situado na região hipocampal do cérebro (FROTSCHER et al., 2006). Esse aumento confere uma vantagem aos animais com maior projeção dessa fibra em

relação ao grupo controle no teste do labirinto radial (usado para avaliar memória e aprendizagem), uma vez que foi evidenciado que os animais hipertireoideos cometiam menos erros para cumprir a tarefa (SCHWEGLER et al., 1991). Por outro lado, segundo Madeira e Paula-Barbosa (1993), o hipotireoidismo desencadeia diminuição da proliferação das células granulares, atrofia de dendritos apicais em neurônios piramidais na região CA3 do hipocampo, alterando a morfologia da fm, além de gerar déficits cognitivos na aprendizagem espacial e na memória.

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* têm evidenciado que substâncias como a benzofenona 2, benzofenona 3, metilbenzilideno cânfora (MBC) e o octil metoxicinamato (OMC) atuam como desreguladores endócrinos, sendo até então descritos na literatura científica, como os capazes de perturbar o eixo HPT, além dos já descritos efeitos de toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento (KRAUSE et al., 2012). Estudos comparativos entre a ação do OMC e do MBC têm demonstrado que o MBC em pequenas doses, de 59 mg/kg/dia, administrado oralmente em ratas adultas da cepa Sprague Dawley por quatorze dias, é capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de tiroxina (T4), levando a hipotireoidismo (SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2006). Os estudos envolvendo a exposição de ratas ovariectomizadas ao OMC têm mostrado redução nos níveis séricos de tiroxina (T4) e aumento em TSH (SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2006), e diminuição da atividade deiodase do tipo 1, enzima responsável pela conversão do T4 em T3, a forma ativa do hormônio (KLAMMER et al., 2007). Em estudo de exposição transgeracional ao OMC, ratos neonatos expostos apresentaram hipoatividade e alterações na memória e aprendizado, sem comprometimentos no eixo reprodutivo (AXELSTAD et al., 2011).

Não está claro ainda o real risco da exposição aos filtros UV e a indução ao hipotireoidismo, principalmente em uma janela temporal do desenvolvimento extremamente vulnerável, a infância. Logo, a avaliação do potencial risco ao OMC no período pós-natal sobre a homeostase do eixo HPT e seu impacto sobre o neurodesenvolvimento e a possível persistência destes danos até a vida adulta, se faz necessário, uma vez que estamos diariamente expostos a estas substâncias.

1.2 RELAÇÃO TIREÓIDE E SISTEMA IMUNOLÓGICO

A regulação homeostática da imunidade envolve fatores que são intrínsecos e extrínsecos ao sistema imune, dentre os fatores extrínsecos podem ser considerados os hormônios e neurotransmissores. A comunicação bidirecional entre os sistemas nervoso e imunológico é mediada muitas vezes por hormônios, em especial pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, quando há estímulo por estresse físico ou emocional (CHROUSOS et al., 2000; ARLT et al., 2004). Poucos são os estudos mostrando a influência dos hormônios tireoideanos na resposta imune normal, mas diversos estudos demonstram a inter-relação da função imune em resposta a estímulos ambientais e imunossupressão mediada por estresse (DAVIS et al., 1998; DORSHKIND & HORSEMAN, 2000; DORSHKIND & HORSEMANELSON, 2001).

Já é bem conhecido o papel dos hormônios tireoideanos e o seu envolvimento em inúmeros processos fisiológicos, tais como desenvolvimento tecidual e o metabolismo de lipídeos e carboidratos (YEN et al., 2001). A relação recíproca entre a glândula tireóide e a função imunológica tem sido pouco explorada em indivíduos aparentemente saudáveis, sendo que investigações prévias da interação entre esses hormônios e o sistema imune têm sido predominantemente restritos a uma gama limitada de populações clinicamente afetadas por distúrbios da função da tireóide (PALMBLAD et al., 1981; NAKANISHI et al., 1991; COVAS et al., 1992; MARIOTTI et al., 1992; KRETOWSKI et al., 1999; BOSSOWSKI et al., 2003). Enquanto estes estudos demonstram que a concentração do hormônio tireoideano está associada com a alteração da imunidade, não está claro se estas observações são diretamente devido a ações dos hormônios da tireóide ou da autoimunidade subjacente. Apesar de já ter sido demonstrado que os hormônios da tireóide participam da linfopoiiese primária e secundária (FABRIS et al., 1995), os seus efeitos sobre o sistema imune recebem menos atenção quando comparados aos hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (DORSHKIND & HORSEMAN, 2000; WANG & KLEIN, 2001). Este fato poderia ser relacionado com o papel dominante da autoimunidade na patogênese de distúrbios da tireóide (PAWLIKOWSKI et al., 1994).

Seres humanos com hipotireoidismo, ou animais em que o hipotireoidismo foi induzido experimentalmente (utilizando tratamento com propiltiouracil – PTU ou por tireoidectomia) apresentam uma diminuição da atividade tímica, somada a involução do baço e de linfonodos, gerando depressão na resposta imune humoral e celular (FABRIS et al., 1995). A suplementação com hormônios tireoideanos recompõem essa resposta humoral (CHATTERJEE & CHANDEL, 1983; OHASHI & ITOH, 1994; KLECHA et al., 2000).

Interações entre os hormônios da pituitária-tireóide e o sistema imunológico baseiam-se principalmente sobre a expressão de receptores do hormônio tireotrófico (TSH) e hormônios da tireóide pelos linfócitos, ou nas alterações imunológicas observadas em flutuações fisiológicas e patológicas de hormônios da tireóide. A triiodotironina (T3) é capaz de modular a função imune de linfócitos via receptores nucleares regulando alvos gênicos, e por interações não-genômicas com receptores de membrana independente da síntese proteica (YEN et al., 2001; CSABA et al., 2005; PALLINGER et al., 2005). Em estudo de HODKINSON e colaboradores (2009), foi sugerido que a elevação das concentrações de T3 e T4, dentro de uma escala fisiológica considerada normal, forneceria efeitos benéficos a imunidade inata e adaptativa através da manutenção de populações celulares específicas e aumentando a responsividade a estímulos imunes. Concentrações elevadas de hormônios tireoideanos estão associadas com os números elevados de células *natural killer T* (NKT) (HODKINSON et al., 2009).

Números alterados de células NKT estão ligados a aumento na incidência de desordens autoimunes (MIYAKE & YAMAMURA, 2007), sendo que indivíduos idosos com as funções tireoidianas normais apresentam números de células NKT aumentadas (PAOLISSO et al., 2000; MOCCHIGIANI & MALAVOLTA, 2004; ABEDIN et al., 2005). Somado a isso, evidências de que os hormônios tireoideanos atuam regulando a resposta linfocitária foi demonstrada previamente em trabalhos de KLECHA e colaboradores (2006), no entanto os mecanismos celulares e moleculares desta regulação permanecem ainda não esclarecidos.

Tendo em vista os dados descritos acima, fica evidente que a desregulação hormonal da tireóide, desencadeada por agentes exógenos como os filtros UV

orgânicos, podem gerar efeitos sistêmicos, dentre eles alterações na função imunológica.

Portanto, a conexão existente entre os sistemas neuro-imune-endócrino é fortemente estabelecida na literatura, visto que os mensageiros desta relação são os hormônios entre outros como os neuropeptídeos, neurotransmissores e citocinas. O sistema neuro-imune-endócrino tem a capacidade de sintetizar e liberar estas moléculas, que por sua vez podem estimular ou suprimir a atividade de células neuroendócrinas ou imunes por ligarem-se aos receptores (JARA et al., 2006).

2- JUSTIFICATIVA

A importância deste trabalho reside no fato de que os protetores solares têm sido cada vez mais utilizados pela população, e mesmo recomendados por médicos e especialistas na prevenção de danos causados pelas radiações UV, e pela virtual inexistência de dados sobre a potencial toxicidade do OMC em uma janela temporal do desenvolvimento, a saber a infância. Crianças potencialmente formam um subgrupo da população exposta a estes compostos, os protetores solares, com maior vulnerabilidade do que adultos. Isto se dá pelos prováveis efeitos destes compostos, como a desregulação do eixo tireoidiano e mesmo hormônios sexuais e de crescimento, além de consequentemente prejudicar os sistemas nervoso e imunológico, visto a inter-relação entre estes sistemas.

Os potenciais desfechos induzidos pelo OMC sobre parâmetros renais, hepáticos, neurocomportamentais, além de possíveis efeitos citotóxicos e interferências sobre proliferação celular devem servir como ferramentas preditivas no estabelecimento de uma relação translacional entre roedores e humanos.

Estes dados podem ter papel extremamente relevante na tomada de decisões regulatórias, por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Saúde (MS), acerca de compostos com potencial toxicidade, especialmente para a faixa etária estudada, a infância.

3- OBJETIVO GERAL

Avaliar os potenciais danos causados pela exposição ao octil metoxicinamato (OMC) no período lactacional e seu impacto logo após o desmame, através de uma análise integrativa dos sistemas imunológico, nervoso e da tireoide em roedores.

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a interferência da exposição ao OMC diretamente e via leite materno sobre parâmetros de desenvolvimento, tais como descolamento de orelhas, crescimento de pelos, erupção dos incisivos, abertura de olhos e o ganho de peso;
- Verificar se o OMC administrado em roedores no período lactacional, direta e indiretamente via leite materno, modula os hormônios tireoideanos;
- Examinar se o OMC administrado durante o período lactacional induz alterações sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- Investigar alterações de ansiedade, atividade locomotora, neofilia e capacidade cognitiva através de testes comportamentais realizados em ratos jovens expostos ao OMC durante a lactação;
- Quantificar o peso relativo bem como a celularidade do baço, timo e linfonodos de camundongos expostos ao OMC via leite materno;
- Avaliar se a exposição ao OMC via leite materno interfere com a contagem de leucócitos, mononucleares e polimorfonucleares totais.
- Investigar o efeito da exposição ao OMC sobre o número e fenótipo de populações celulares do sistema imune presentes em órgãos linfóides primário (timo) e secundário (baço);
- Apurar se a exposição *in vitro* de células do baço ao OMC gera efeitos citotóxicos, interfere com a atividade mitocondrial e/ou proliferação celular e se a adição de tiroxina restabelece essa proliferação celular.

4- METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

4.1.1 Ratos e Camundongos

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, a partir do 5º dia de vida e camundongos Swiss de ambos os sexos a partir do 1º dia de vida. As fêmeas grávidas foram fornecidas pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB) entre o 14º e 15º dia de gestação. Todos os animais utilizados neste estudo nasceram no biotério do INCQS. Os animais tiveram livre acesso à água e comida, e foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada à aproximadamente 22°C±2°C e ciclo alternado de claro e escuro de 12h com umidade de 55% ± 5%. Todos os experimentos que incluíram manipulação animal neste projeto foram realizados de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (licença de aprovação LW-30/14).

Os ensaios *in vitro* (citotoxicidade, atividade mitocondrial e proliferação celular) foram realizados com os baços de 2 camundongos/ensaio, da linhagem Swiss com 8 semanas de vida pesando aproximadamente 30 gramas; Os animais foram previamente eutanasiados com solução de Cloridrato de Cetamina 10% da marca CETAMIN (35 mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina 2% da marca XILAZIN (5 mg/Kg), ambos produzidos pelo laboratório Syntec do Brasil e administrados por via intraperitoneal. O volume de administração da solução foi de 500 µL/animal com o objetivo de atingir a overdose. A confirmação do plano anestésico foi verificada através de reflexo palpebral, caudal e interdigital. Em seguida foi verificado se o coração do animal havia parado de bater. Uma vez garantida a ausência de sinais de nocicepção, bem como a eutanásia, os roedores foram submetidos a uma assepsia com álcool etílico a 70%.

4.2 ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS E FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Os ratos filhotes foram expostos por via oral (v.o.) com o auxílio de uma sonda gástrica apropriada para animais nesta idade (WATANABE et al., 2003). A sonda era feita de polietileno com uma luz interna 0,28 mm x 0,61 mm x 30,5m da marca BECTON DICKINSON. A exposição foi realizada do 5º ao 22º dia pós-natal. Ninhadas com 8 animais foram formadas a partir de um *pool* de filhotes nascidos a termo no mesmo dia, sem intervenção do experimentador, ou seja, de forma aleatória. Em cada ninhada formada havia 4 machos e 4 fêmeas, com um casal para os grupos controles cada um e dois casais para o grupo OMC:

- (i) Veículo (óleo de milho);
- (ii) Controle para hipotireoidismo (PTU – propil tiouracil – 4 mg/Kg/dia);
- (iii) OMC (500 mg/kg/dia).

Enquanto que nos camundongos, as mães foram expostas por via oral (v.o.) com o auxílio de uma sonda gástrica apropriada para animais nesta idade (WATANABE et al., 2003). A sonda era de aço inox BD-10 com uma cânula de 1,0 mm de diâmetro, com esfera de 1,7 mm, raio de 40 mm e 31 mm de comprimento. A exposição foi realizada do 1º ao 22º dia pós-natal. A exposição da prole às substâncias foi de forma indireta via leite materno. Ninhadas com 8 animais foram formadas a partir de um *pool* de filhotes nascidos a termo no mesmo dia, sem intervenção do experimentador, ou seja, de forma aleatória. Em cada ninhada formada havia 4 machos e 4 fêmeas. Um total de 39 mães com 8 filhotes cada foram utilizados neste estudo divididos em 5 grupos de exposição:

- 9 mães receberam: (i) Veículo (óleo de milho);
- 6 mães receberam: (ii) Controle para hipotireoidismo (PTU – propil tiouracil – 4 mg/Kg/dia);
- 7 mães receberam: (iii) OMC (250 mg/kg/dia);
- 8 mães receberam: (iv) OMC (500 mg/kg/dia);
- 9 mães receberam: (v) OMC (1.000 mg/kg/dia).

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES.

4.3.1 OMC e Veículo

O Octil Metoxicinamato (OMC), de nomenclatura 2-etilhexil-4-metoxicinamato segundo a IUPAC, CAS 78848 com 98% de pureza, marca SIGMA ALDRICH, nos ensaios *in vivo* foi preparado nas doses de 250 mg/kg/dia, 500 mg/kg/dia, 1.000 mg/kg/dia e 1500 mg/kg/dia de peso corpóreo do animal utilizando óleo de milho como veículo. O OMC foi homogeneizado em vórtex PHOENIX LUFERCO e modelo AP59 durante aproximadamente 5 minutos. A solução foi preparada de modo a utilizar um volume de administração de 5 mL/kg/dia de peso corpóreo do animal.

O óleo de milho marca LIZA com teor de 100% foi incorporado como veículo na solução do grupo OMC. Além disso, foi o controle negativo do experimento e seu volume de administração foi de 5 mL/kg/dia de peso corpóreo do animal.

Nos ensaios *in vitro*, o OMC foi preparado nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 10, 1 µg/mL. O veículo foi o meio de cultura RPMI contendo soro fetal bovino, marca SIGMA ALDRICH. Nestas condições, o OMC foi homogeneizado em sonicador da marca Ultrasonic Cleaner e modelo USC 1400 por 30 minutos.

4.3.2 PTU e Veículo

O propil tiouracil (PTU), de nomenclatura 6-Propil-2-tioxo-2,3-di-hidro-4 (1H) - pirimidina segundo a IUPAC, CAS 51-52-5 com 98% pureza, marca SIGMA ALDRICH foi preparado na dose de 4 mg/Kg/dia de peso corpóreo do animal utilizando água destilada como veículo. O PTU foi homogeneizado com agitador magnético marca KASVI durante aproximadamente 30 minutos. A solução foi preparada de modo a utilizar um volume de administração de 5 mL/kg/dia de peso corpóreo do animal.

A água destilada foi incorporada como veículo na solução do grupo PTU.

4.3.3 Tiroxina e Veículo

A levotiroxina (T4), de nomenclatura 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina segundo a IUPAC, CAS 51-48-9 com 98% pureza, marca SIGMA ALDRICH foi preparada na concentração de 10^{-5} molar. O veículo foi o meio de cultura RPMI contendo soro fetal bovino, marca SIGMA ALDRICH. O T4 foi homogeneizado em vórtex PHOENIX LUFERCO e modelo AP59 durante aproximadamente 8 minutos.

4.4 PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO

Os animais foram pesados diariamente em balanças semi-analíticas da marca PRECISA modelo 3000D com sensibilidade de 0,1 g a fim de se ajustar o volume de administração das substâncias (5 mL/Kg de peso corpóreo) dos filhotes e das mães bem como para observação do desenvolvimento das lactantes e dos lactentes, além da avaliação da toxicidade da substância teste. Além disso, até o dia pós-natal 16 para os ratos e até o pós-natal 14 para os camundongos, os animais foram observados a fim de se verificar o dia exato do desfecho de parâmetros de desenvolvimento como crescimento de pelos, erupção dos incisivos e abertura de olhos para ratos e camundongos e descolamento de orelhas apenas para camundongos. O estudo com os ratos foi realizado em quadruplicata com cerca de 80 filhotes para cada ensaio e com camundongos em duplicata com cerca de 136 filhotes no primeiro ensaio e 176 filhotes no segundo ensaio.

4.5 ENSAIO DE SOBREVIDA E DEFINIÇÕES DE DOSES

O ensaio de sobrevivência foi realizado para definir a dose de OMC a ser utilizada nos ensaios subsequentes. A dose de 500 mg/Kg/dia, foi definida com base neste ensaio previamente realizado usando o mesmo tempo de exposição, mesma via de ação utilizando as doses de 500, 1.000 ou 1500 mg/Kg/dia de OMC. Neste ensaio o filtro UV OMC foi administrado durante 18 dias (período lactacional) observando-se

durante esse tempo, dia após dia, se o OMC apresentava como desfecho a morte dos ratos filhotes.

Embora não tenha sido realizado um ensaio de sobrevivência com os camundongos, o ensaio de sobrevivência realizado com os ratos serviu como base para a escolha das doses a serem adotadas para os camundongos. A dose que gerou efeitos nos ratos sem desencadear morte foi também utilizada para os camundongos. Tomando esta dose como partida, escolhemos o dobro e a metade desta para criarmos nossa curva de doses. Os resultados obtidos com base no ganho de peso, abertura de olhos e dosagem hormonal, nos ofereceram subsídios para definição da dose a ser empregada nas avaliações subsequentes.

4.6 COLETA DE SANGUE

Nos ratos, após o período de administração das substâncias (PN23), parte dos animais de ambos os sexos foram eutanaziados com Tiopental a 4% da marca CRISTÁLIA para coleta de sangue do ventrículo esquerdo por punção cardíaca até exsanguinação do roedor. Do sangue total obtido, 250 μL /animal foram encaminhados para análise hematológica, 300 μL /animal para bioquímica e 450 μL /animal para dosagem hormonal de tiroxina total. Os animais que não foram eutanaziados foram acompanhados até o PN32 a fim de serem submetidos a uma bateria de testes comportamentais, que ocorreu entre PN25 e PN32.

Nos camundongos, após o período de administração das substâncias (PN23), todos os animais, mães e filhotes de ambos os sexos foram eutanaziados com overdose de solução de Cloridrato de Cetamina 10% da marca CETAMIN (140 mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina 2% da marca XILAZIN (20 mg/Kg), ambos produzidos pelo laboratório Syntec do Brasil e administrados por via intraperitoneal. Após isso, uma pequena incisão foi feita na cauda de cada roedor a fim de se coletar uma gota de sangue. Essa gota de sangue foi pingada diretamente em lâminas de vidro individualizadas, submetidas ao esfregaço e coradas com um Kit Panótico Rápido da Marca LaborClin. Posteriormente foi realizada a contagem de células mononucleares e polimorfonucleares em um microscópio óptico.

Mais 10 μL de sangue foram coletados da cauda e homogeneizados em placa de 96 poços contendo 190 μL de solução Turk (1:20). Para o preparo da solução de Turk foram utilizados 2% de ácido acético glacial 100% PA da marca SIGMA ALDRICH, água destilada e uma pitada de violeta de genciana. Desse preparado, pipetou-se uma alíquota de 10 μL de solução que foi inserida em uma Câmara de Neubauer da marca KASVI para contagem de leucócitos totais em microscópio óptico.

Após a coleta de sangue da cauda, os animais foram exsanguinados por punção cardíaca pelo ventrículo esquerdo. O sangue total obtido foi colocado em um microtubo com gel separador e ativador de coágulo do fabricante Vacuplast e capacidade para 500 μL . O tubo foi submetido a centrifugação a 13.226 G por 10 minutos em uma centrífuga da marca ZENTRIFUGEN, modelo MIKRO 20. Após a centrifugação, apenas o soro foi coletado em microtubos individuais de polipropileno com tampa da marca EPPENDORF e armazenados em freezer a -70°C para posterior dosagem hormonal de tiroxina total.

4.7 DOSAGEM HORMONAL DE TIROXINA TOTAL (T4)

Nos ratos, o volume de sangue coletado foi de até 5 mL sendo colocado em tubos de ensaio de vidro previamente identificados. O sangue foi mantido no tubo *overnight* e no dia seguinte com a separação entre as fases após a formação e retração do coágulo e separação do soro, este foi coletado em triplicata, alíquotas de 70 μL por eppendorf. Os soros foram acondicionados em freezer a -20°C para posterior dosagem hormonal de T4 total.

A determinação da concentração de tiroxina total (T4 total) em soro de ratos (*Ratus norvegicus*) foi realizada através de kits RIA (*Radio Immune Assay*) de acordo com os protocolos descritos nos próprios kits.

Marcaram-se os tubos revestidos em duplicata para um dos padrões, amostras e controles. Para a determinação das contagem Total, marcou-se 2 tubos normais. Em seguida, agitou-se os padrões, amostras e controles brevemente e distribuiu-se 50 μL de cada um em seus respectivos tubos. Dispensou-se 200 μL de T4 marcado com iodo radioativo [^{125}I] em cada tubo, incluindo os tubos não

revestidos para contagem total. Dispensou-se 100 µL de anti-T4 em cada tubo, exceto nos tubos da contagem total. Agitou-se suavemente a estante de tubos para remover quaisquer bolhas. Incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação contínua. Descartou-se o conteúdo de cada tubo exceto dos da contagem total. Lavou-se os tubos com 2 mL de Solução de Lavagem exceto os da contagem total e decantou-se. Evitou-se a formação de espuma durante a adição da solução de lavagem. Os tubos foram deixados na posição inversa por 2 minutos e removeu-se o líquido restante.

A leitura de cada tubo foi realizada por 1 minuto no contador de partículas gama da marca ISOMEDIC-ICN e modelo 4/600.

O kit usado da MP Biomedicals utiliza Radioimunoensaio em fase sólida com tiroxina marcada com iodo radioativo [¹²⁵I] e usa tubos com anticorpos monoclonais de T4.

Por fim, após a leitura dos tubos calculou-se a média dos valores de radioatividade para os padrões, controles e amostras. Em seguida construiu-se uma curva padrão plotando a média de radioatividade obtida para cada padrão de referência contra as concentrações em µg/dL no gráfico linear, com a radioatividade no eixo y e a concentração no eixo x. Usando o valor de radioatividade médio para cada amostra, determinou-se a concentração correspondente de T4 em µg/dL com base na curva padrão.

Nos camundongos, as amostras de soro dos animais que foram eutanasiados no PN23 e armazenadas a - 70 °C foram descongeladas para dosagem de T4 total utilizando kits EIA (*Enzimatic Immune Assay*) de acordo com os protocolos descritos nos próprios kits. Os kits utilizados foram da ACCU Bind fornecidos pela USA DIAGNÓSTICA.

Em seguida, pipetou-se 25 µL dos padrões, controles e amostras em suas respectivas microcavidades. Após a adição, pipetou-se 100 µL do reagente de trabalho – conjugado enzimático T4 em todas as microcavidades. Homogenizou-se gentilmente por 30 segundos e cobriu-se a placa. A mesma foi incubada ao abrigo da luz com papel alumínio por um período de 1 hora. Após esse período, descartou-se o conteúdo das microcavidades e adicionou-se 300 µL da solução de lavagem

previamente preparada em todas as microcavidades. Esse passo foi repetido por mais 4 vezes, totalizando assim 5 lavagens. Ao final a placa foi seca batendo-a em papel absorvente. Pipetou-se 100 μL do substrato – solução de trabalho em todas as microcavidades. Os reagentes foram pipetados sempre na mesma ordem para minimizar o intervalo de tempo de reação entre as microcavidades. A placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se 50 μL da solução de parada em todas as microcavidades. Homogenizou-se gentilmente por 20 segundos. Novamente os reagentes foram pipetados sempre na mesma ordem para minimizar o intervalo de tempo de reação entre as microcavidades.

A leitura da placa de 96 poços presente no kit foi realizada no espectrofotômetro da marca VERSA MAX modelo CA94089 em um comprimento de onda de 450 nm com uma programação de 10 segundos de agitação utilizando o programa SOFT MAX PRO para Windows 2000.

Por fim, após a leitura da placa calculou-se a média dos valores de absorbância para os padrões, controles e amostras. Em seguida, construiu-se uma curva padrão plotando a média de absorbância obtida para cada padrão de referência contra as concentrações em $\mu\text{g/dL}$ no gráfico linear, com a absorbância no eixo y e a concentração no eixo x. Usando o valor de absorbância médio para cada amostra, determinou-se a concentração correspondente de T4 em $\mu\text{g/dL}$ com base na curva padrão.

4.8 ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS (RATOS)

As análises sanguíneas dos ratos foram realizadas pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ). As análises bioquímicas foram realizadas em amostras séricas usando um analisador automático para química clínica (JOHNSON & JOHNSON). O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos contendo ativador de coagulação e gel separador sem anticoagulantes, a 13.226 G por 10 minutos em uma centrífuga da marca ZENTRIFUGEN, modelo MIKRO 20. O soro obtido foi aliquoteado em microtubos de polipropileno com tampa da marca EPPENDORF. Foram utilizados para as avaliações espectrofotométricas os seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, colesterol total, aspartatotransaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FAL),

proteínas totais, ureia, albumina, creatinina, creatina e ácido úrico. As análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado em tubos contendo EDTA, utilizando um analisador automatizado hematológico (Contador de sangue animal Sysmex, Kobe). Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (WBC), e plaquetas.

4.9 TESTES COMPORTAMENTAIS (RATOS)

4.9.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Este artefato é feito de madeira ou acrílico e é composto por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços circundados por paredes (braços fechados) (figura 2). Os braços têm 10 cm ou mais de largura, com 50 cm ou mais de comprimento, sendo os fechados com paredes de alturas de 40 cm ou mais, com elevação de 30 a 50 cm do chão do ambiente de teste.

Este teste foi de bastante valia no estudo do OMC, uma vez que alterações tireoidianas podem culminar com alterações no estado de ansiedade.

No PN25 (48 horas após o desmame) os ratos de cada grupo experimental



foram colocados individualmente na junção dos braços abertos com os fechados com o focinho voltado para um dos braços abertos, de costa para o avaliador. Cada animal teve 5 minutos para explorar livremente o artefato. Os animais foram testados uma única vez. Neste teste foram registrados o número de entradas dos roedores nos braços abertos, o número de entradas dos roedores nos braços fechados e o número de

Figura 2. Labirinto em cruz elevado

Fonte: Acervo Pessoal

entradas no centro. A premissa para que uma entrada fosse contabilizada é que o roedor tivesse as quatro patas na região de interesse (braço aberto, braço fechado ou centro). A expressão dos resultados é estabelecida em função do número de entradas do roedor nos braços abertos. E a interpretação dos resultados é dada da seguinte forma: quanto maior o número de entradas nos braços abertos, menos ansioso o rato foi, quanto menor o número de entradas no braço aberto, mais ansioso ele foi. O teste completo de cada roedor foi registrado através de uma câmera frontal Motorola 5 megapixels usando sistema de gravação de vídeo para registro do experimento e contabilizado através do programa ACC Plus M desenvolvido pelo Laboratório de Neurofisiologia da UERJ.

4.9.2 Campo vazado (CV)

O aparelho (figura 3) consiste de uma arena fechada, medindo 80 x 60 x 50, com 20 orifícios de 3 cm de diâmetro espaçados regularmente e contendo num total de 30 quadrantes no artefato. O aparelho ficou a 10 cm do chão.

Este ensaio foi adotado em nosso desenho experimental, pois potenciais alterações tireoideanas induzidas pelo OMC podem desencadear alterações locomotoras e na busca por novidades, parâmetros esses que são avaliados no campo vazado.

Os ratos de todos os grupos experimentais foram expostos a este ambiente por um período de 5 minutos, podendo explorá-lo livremente. Os roedores foram testados individualmente uma única vez no PN26 sempre colocados para iniciar o teste a partir da borda do artefato com o focinho voltado para a parede. A mesma



borda foi adotada para todos os animais que foram avaliados.

Cada quadrante percorrido (espaço virtual entre um orifício e outro) foi registrado quando o animal colocou as quatro patas no quadrante seguinte. Foram levados em consideração todos os quadrantes do artefato (quadrantes do centro e os quadrantes da borda). Enquanto que o *head dipping* foi contabilizado toda vez em que o animal

Figura 3. Campo vazado

Fonte: Acervo Pessoal

colocava o focinho dentro do orifício. Foram levados em consideração todos os orifícios do artefato (orifícios do centro e os orifícios da borda). A interpretação dos resultados foi dada da seguinte maneira: quanto maior o número de quadrantes percorridos pelo rato, mais hiperativo ele foi, quanto menor, mais hipoativo o rato foi. E quanto maior o número de vezes que rato colocou a cabeça nos orifícios, mais curioso ele foi, quanto menor o número de vezes, menor o interesse pela busca por novidades. O teste completo de cada roedor foi registrado através de uma câmera frontal Motorola 5 megapixels usando sistema de gravação de vídeo para registro do experimento e contabilizado através do programa ACC OpF HB desenvolvido pelo Laboratório de Neurofisiologia da UERJ.

4.9.3 Labirinto aquático de Morris (LAM)



Figura 4. Labirinto aquático de Morris

Fonte: Acervo pessoal

A arena utilizada (figura 4) possuía 210 cm de diâmetro, lateral com 51 cm de altura e superfície interior não reflexiva. A plataforma situada no interior da arena apresentava entre 10 - 12 cm de diâmetro e ficava submersa entre 1 - 2 cm abaixo da superfície da água durante a etapa de aquisição de

A temperatura da água foi mantida dentro da faixa preconizada para a realização do teste, entre 19 e 22°C.

A sala de teste continha diversas referências visuais, tanto as endógenas (portas, estantes, pia, avaliador), como aquelas que foram colocadas intencionalmente em torno do artefato, como figuras geométricas (triângulo,

retângulo, etc.). As referências permaneceram no mesmo lugar durante todos os dias de teste para minimizar os fatores de confusão para os animais.

O avaliador permaneceu dentro da sala de testes, em uma posição fixa durante todos os dias de avaliação.

Etapa 1 - Aquisição de memória:

Nesta etapa os animais foram testados a partir do PN27 durante 4 dias para aquisição de memória. Nesses quatro dias a plataforma de escape se situou sempre no meio do quadrante sudeste no interior da piscina, submersa a 1 cm da superfície da água.

Antes do teste foi adicionado à água guache não-tóxico de cor branca a fim de camuflar a plataforma para que o animal não pudesse enxergá-la.

Cada animal foi testado individualmente, realizando 4 sessões consecutivas. Cada sessão representou um ponto de partida diferente para o animal. Esses pontos de partida foram permutados durante todos os dias do teste, como mostrado na tabela 2. Cada roedor teve 1 minuto por sessão para encontrar a plataforma de escape. Ao encontrar a plataforma, o tempo no cronômetro foi parado, registrado e a partir daí o animal só era removido da mesma após 15 segundos. Em seguida, o rato foi secado com toalha limpa e colocado em uma caixa com lâmpada incandescente para auxiliar na secagem. O animal ficou na caixa por 1 minuto e após esse intervalo foi levado novamente para execução da sessão seguinte (figura 5). O roedor em cada sessão foi sempre colocado com o focinho voltado para a borda da piscina e ao término das 4 sessões, os pellets fecais deixados por ele foram recolhidos para o ensaio do animal seguinte. Quando o animal não encontrava a plataforma no intervalo de 60 segundos, este era guiado pelo avaliador até a mesma e permanecia nela por 15 segundos. Se mesmo guiado pelo avaliador, o animal se recusasse a chegar até a plataforma, ele era forçado a ficar nela (MORRIS, 1984).

Tabela 2. Pontos de partida (seções) durante as duas etapas do teste.

Etapa 1	1°	2°	3°	4°
Dia 1	Norte	Sudoeste	Oeste	Nordeste
Dia 2	Nordeste	Oeste	Sudoeste	Norte
Dia 3	Oeste	Norte	Sudoeste	Nordeste
Dia 4	Sudoeste	Nordeste	Oeste	Norte
Etapa 2	1°			
Dia 5	Norte	-	-	-

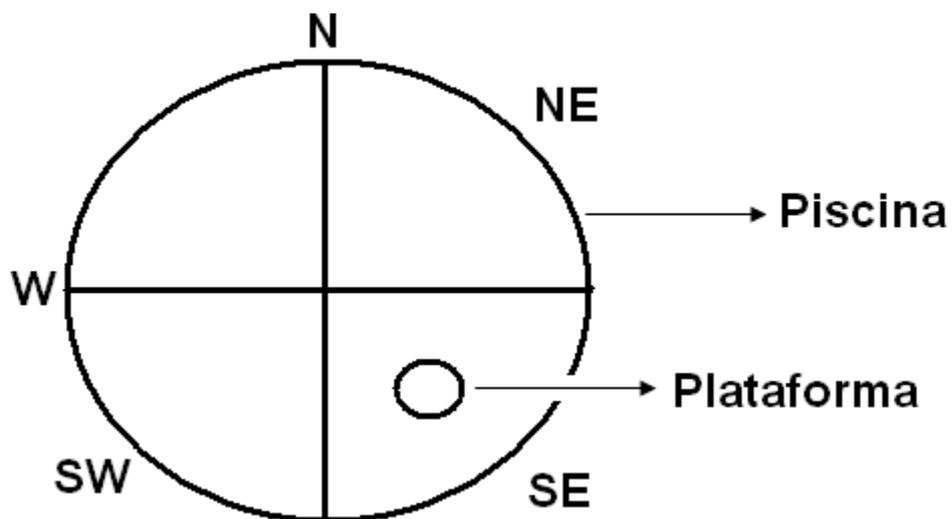


Figura 5. Desenho da piscina com plataforma e os respectivos pontos de partida dos ratos durante a primeira etapa.

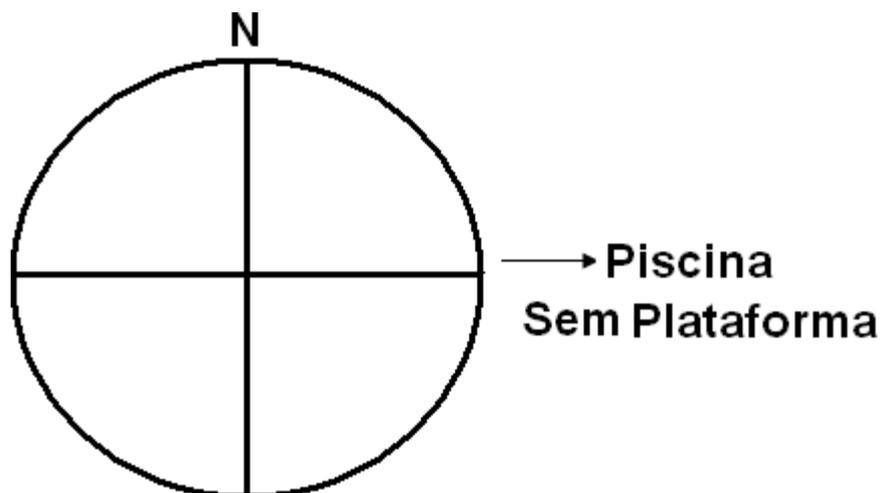


Figura 6. Desenho da piscina sem plataforma com o único ponto de partida dos ratos durante a segunda etapa

Etapa 2 – Teste:

Esta etapa foi realizada em apenas 1 dia, representando o quinto dia de ensaio, um após o último dia da etapa de aquisição de memória. Nesta etapa a plataforma foi retirada da piscina, como mostra a figura 6, e o animal realizou apenas uma única sessão, ou seja, foi solto a partir de 1 ponto de partida, sendo definido o lado norte para todos os animais. Nesta etapa o animal continuou tendo 1 minuto para realização do teste, no entanto foi avaliado o tempo em que o roedor permaneceu no quadrante onde estava a plataforma nos 4 primeiros dias. Essa avaliação foi feita posteriormente através da gravação do teste que foi filmado na íntegra com uma câmera frontal Motorola 5 megapixels usando sistema de gravação de vídeo para registro do experimento. Para essa avaliação a piscina foi dividida em quatro quadrantes e foi observado quanto tempo cada roedor ficou no quadrante sudeste, ou seja, quadrante onde se situava a plataforma durante os 4 dias de aquisição de memória. O tempo foi registrado com o auxílio de um cronômetro. Após a realização do teste, o animal foi removido da piscina, secado com toalha limpa e colocado na caixa. Os pellets fecais deixados pelo roedor em teste foram removidos para o animal subsequente ser submetido ao mesmo (MORRIS, 1984). A figura 7 detalha todo o desenho experimental utilizado com os ratos desde o acasalamento até os testes comportamentais.

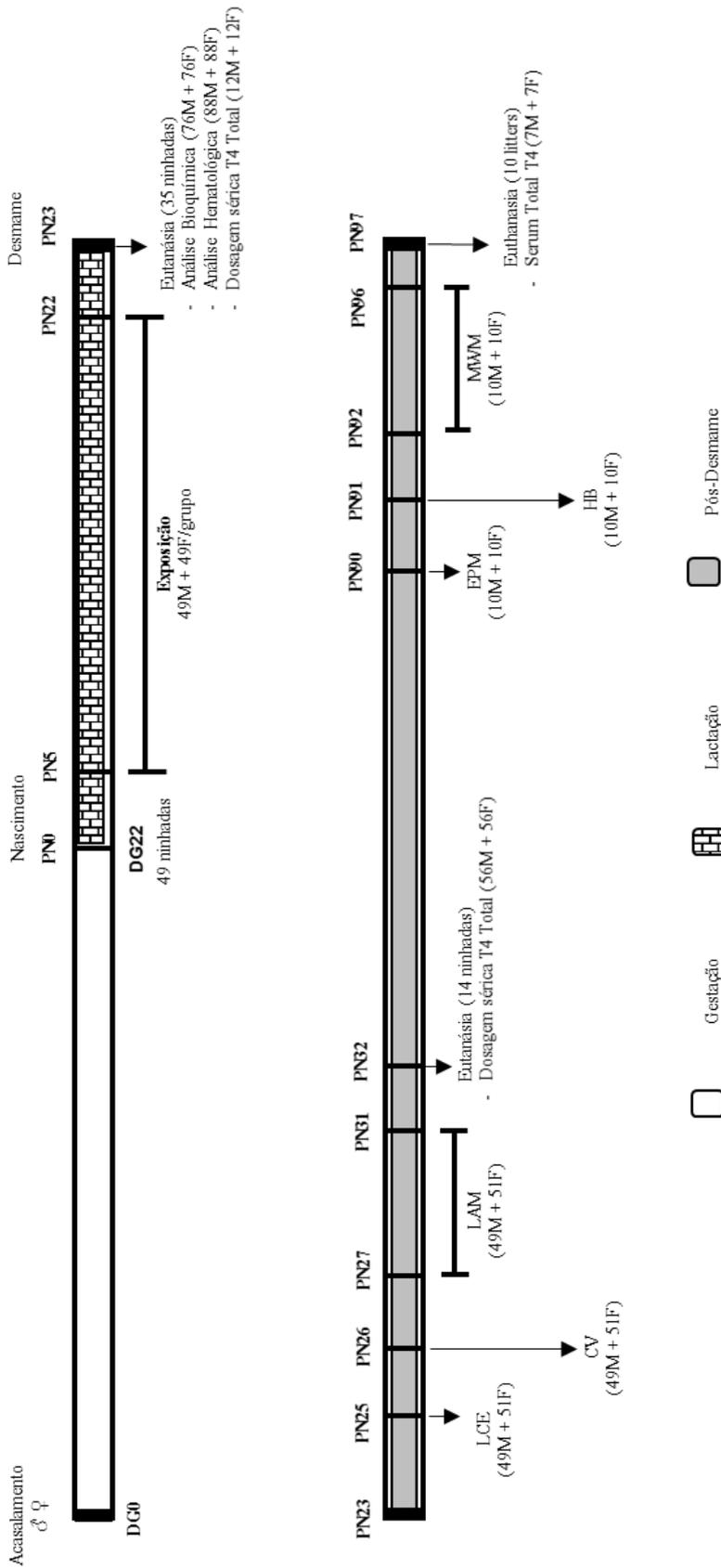


Figura 7. Desenho experimental ensaio com ratos. Ninhadas (N = 49) foram padronizadas em 8 filhotes (4 machos + 4 fêmeas) no PN1. Cada ninhada tinha todos os grupos experimentais. O experimento foi feito em quadruplicata. Do PN5-PN22, 1 casal (1 macho e 1 fêmea) de cada ninhada foram expostos por gávgamo ao Óleo de milho (veículo) ou ao PTU (4 mg/Kg/dia) e 2 casais (2 machos e 2 fêmeas) ao OMC (500 mg/Kg/dia). Filhotes foram desmamados no PN23. 35 ninhadas foram eutanasiadas no PN23 enquanto as 14 ninhadas restantes foram submetidas a testes comportamentais na pré-puberdade. Após os testes na pré-puberdade, 14 ninhadas foram eutanasiadas no PN32. Na pré-puberdade, os 3 testes comportamentais foram realizados pelos mesmos roedores. DG: dia gestacional; PN: dia pós-natal; M: macho; F: fêmea; OMC: Octil Metoxi Cinamato – Filtro solar; LCE: Labirinto em Cruz Elevado; CV: Campo Vazado; LAM: Labirinto Aquático de Morris.

COLETA DE ÓRGÃOS (CAMUNDONGOS)

Foram coletados órgãos do sistema imune como baço, timo e os dois linfonodos inguinais dos camundongos. Os órgãos coletados foram pesados individualmente em balança analítica com sensibilidade de 0,0001 g da marca KN WAAGEN e modelo FA2204B.

Após serem pesados, os órgãos coletados foram colocados em placas de 12 poços sobre gelo e triturados separadamente. Os poços que continham baço e timo receberam 1 mL de PBS + EDTA e os que continham linfonodos receberam 500 µL de PBS + EDTA. Alíquotas de cada órgão foram obtidas e preparadas com diluições ideais em placa de 96 poços com solução de TURK. Por fim, alíquotas de 10 µL dessas placas foram pipetadas e inseridas em Câmara de Neubauer para contagem total de esplenócitos, timócitos e linfócitos.

Outras alíquotas apenas do timo e do baço foram obtidas da suspensão celular triturada para aquisição das células em citometria de fluxo. Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para tubos de polipropileno de 15 mL com tampa da marca FALCON e centrifugadas a 16.100 G, à temperatura de 4°C, durante 5 minutos em centrífuga da marca HOFFMANNLAB e modelo HCL4. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados e as células foram ressuspensas em 4 mL de PBS adicionado de 3% de soro fetal bovino e 0,01% de azida sódica.

4.10 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO EM TIMÓCITOS E ESPLENÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo foi utilizada para a análise dos fenótipos dos timócitos e esplenócitos dos camundongos submetidos aos tratamentos e de animais controle. Após eutanásia dos animais, o timo e o baço foram extraídos e a suspensão celular de cada um dos órgãos foi obtida após trituração. Para avaliação do fenótipo celular foram utilizados anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície celular. Foram realizadas as seguintes marcações: anti-CD3/anti-CD4/anti-CD8 para o timo;

anti-CD3/anti-CD4/anti-CD8 para o baço. Os códigos descritos para os anticorpos segundo a EXBIO são 514 para CD3, 359 para o CD4 e 207 para o CD8. Como controle, anticorpos isotipo ligados a fluoróforos específicos, foram usados para medidas de ligações inespecíficas. As aquisições das amostras foram feitas em um Citômetro CyFlow Space da Partec, sendo coletados 10.000 eventos para cada tubo. As análises foram realizadas no programa FlowMax™, empregando-se diferentes estratégias, dependendo do fenótipo celular analisado.

4.11 MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE DOS LINFÓCITOS

Os linfócitos foram adquiridos a partir de marcadores de superfície (anticorpo monoclonal) de forma direta. Foi realizado um *pool* com uma mistura de três anticorpos listados no quadro 1, de acordo com a amostra a ser analisada. Todos os anticorpos foram fornecidos pela EXBIO.

Abaixo segue o quadro 1 com os anticorpos que foram utilizados na Citometria de Fluxo bem como os fluorocromos usados e suas respectivas características.

Quadro 1: Anticorpos usados na marcação de triturado de baço e timo de camundongos CyFlow® Space

Marcador de superfície	Fluorocromo	Excitação Máxima	Emissão Máxima	Parâmetro segundo aparelho CyFlow Space da PARTEC
Anti-CD3	PerCP-Cy 5.5 Peridinin-chlorophyll proteins	488 nm	670 nm	FL3
Anti-CD8	PE Phycoerythrin	495 nm	557 nm	FL2
Anti-CD4	FITC Fluorescein isothiocyanate	494 nm	517 nm	FL1

Fonte: PARTEC CyFlow® Space Instrument Operation Manual.

Foram utilizadas 10^5 células do triturado do baço ou do timo dos camundongos. Em seguida foi adicionado os conjuntos de marcadores (anticorpo monoclonal ligado ao fluorocromo), segundo o quadro 1 e em quantidades de acordo com as especificações do fabricante. Incubou-se por 1 hora as amostras com os anticorpos, na ausência de luz e em temperatura ambiente. Como a análise foi realizada para avaliar os linfócitos, adicionou-se em cada amostra 600 μ L de solução para lise de hemácias fornecida pela BD Biosciences (Lising Buffer), a qual agiu sobre a amostra por 15 minutos. Terminado o procedimento de lise das hemácias, as amostras receberam a adição de tampão PBS, para interromper a ação da lise. Foram adicionados 500 μ L de solução de PBS. Em seguida centrifugou-se a 447 G por 10 minutos em centrífuga da marca HOFFMANNLAB e modelo HCL4. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 800 μ L de PBS. A figura 8 detalha todo o desenho experimental utilizado com os camundongos desde o acasalamento até a eutanásia dos roedores.

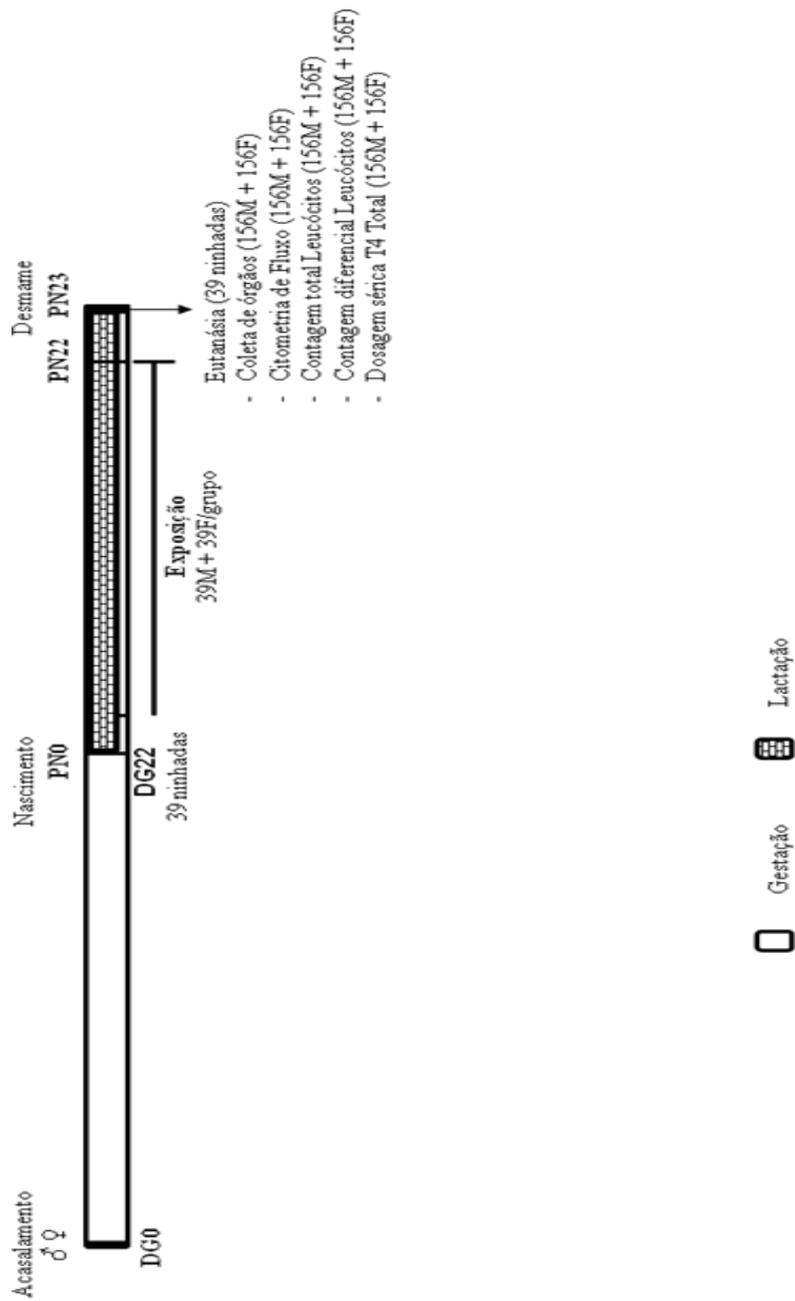


Figura 8. Desenho experimental do ensaio com camundongos. Ninhadas (N = 39) foram padronizadas em 8 filhotes (4 machos + 4 fêmeas) no PN1. O experimento foi feito em duplicata. Do PN1-PN22, mães foram expostas por gavagem ao Óleo de milho (veículo), PTU (4 mg/Kg/dia) ou OMC nas doses de (250, 500 ou 1000 mg/Kg/dia). Filhotes foram desmamados no PN23. 39 ninhadas foram eutanasiadas no PN23. 39 ninhadas foram desmamadas no PN23. DG: dia gestacional, PN: dia pós-natal, M: macho, F: fêmea, OMC: Octil Metoxi Cinamato – Filtro solar.

4.12 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE NO BAÇO DE CAMUNDONGOS

Este experimento foi realizado com a finalidade de se avaliar se o filtro UV OMC era tóxico para as células do baço dos camundongos. Os dois camundongos que foram eutanasiados previamente, mencionados no item 4.1 animais, foram conduzidos para uma cabine de fluxo laminar da marca VECO e modelo VCFS-09 para a remoção dos baços dos respectivos roedores. Deste ponto, todos os procedimentos foram executados nesta mesma condição.

Uma vez removidos, os dois baços foram prontamente triturados no interior de microplacas apropriadas com o auxílio de um êmbolo de seringa de 5 mL. O procedimento de trituração foi realizado gentilmente para garantir que apenas as células do interior do baço fossem retiradas sem a membrana externa do órgão. O baço foi triturado em meio contendo RPMI puro da marca SIGMA ALDRICH à temperatura ambiente.

A suspensão de células obtida proveniente da trituração do órgão foi transferida com o auxílio de uma pipeta para um tubo da marca GREINER de 15 mL contendo o reagente Ficoll-PaqueTM Plus da marca GE HEALTHCARE BIOSCIENCES AB. A proporção de células para Ficoll foi de 1:1. Foram usados 4 mL da suspensão de células para 4 mL de Ficoll. Nesse experimento o reagente Ficoll foi utilizado pois, cria um gradiente de densidade formando fases na mistura. A fase superior representa as células mononucleares de interesse nesse experimento.

O tubo de 15 mL foi centrifugado a 16.100 G por 20 minutos em centrífuga da marca HOFFMANNLAB e modelo HCL4 para que a diferença entre as fases ficasse mais evidente. Após o término do processo de centrifugação foi possível observar a olho nu a formação de um anel de células no interior do tubo. Essas células mononucleares foram coletadas cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de 1.000 µL efetuando movimentos circulares e transferidas para um tubo de 15 mL contendo 4 mL de RPMI puro. Esse tubo foi centrifugado novamente a 16.100 G por 10 minutos.

Enquanto a etapa de centrifugação ocorria, 1 microtubo de polipropileno com tampa de 2 mL da marca Eppendorf contendo 996 µL de RPMI + soro fetal bovino a 10% (R10) da marca SIGMA ALDRICH e 4 µL do filtro solar OMC foi

homogeneizado em um equipamento Sonicador da marca Ultrasonic Cleaner e modelo USC 1400 por 30 minutos.

Após o término da centrifugação, o sobrenadante do tubo foi descartado. Em seguida o pellet contido no interior do tubo rico em monócitos e linfócitos foi ressuspenso em 1 mL de RPMI puro. Uma diluição de 1:100 foi realizada para contagem das células em Câmara de Neubauer da marca KASVI. A leitura foi realizada em microscópio óptico da marca OLYMPUS, modelo BH2, com uma objetiva de 40x e o registro do número de células foi contabilizado em contador manual de células da marca ION modelo ION 1026.

Em seguida preparou-se uma placa de 96 poços da marca FALCON e fabricante BECTON DICKINSON para receber as células do baço e o filtro solar OMC nas diversas concentrações. Cada poço na placa recebeu 1×10^6 células com meio R10 da marca SIGMA ALDRICH e o volume de células foi ajustado de acordo com o número encontrado contabilizado no microscópio. Para mais detalhes de como foi montada a placa de 96 poços, veja a figura 9.

O tubo que foi levado ao sonicador por 30 minutos (Solução Mãe), foi aliquotado para mais 6 microtubos de 2 μ L (Soluções Filhas) em volumes pré-definidos correspondentes as 6 concentrações de OMC que foram utilizadas no ensaio. Para mais detalhes de como foram obtidas as concentrações de OMC, veja a figura 10.

Os grupos de exposição utilizados no experimento foram os seguintes:

- Meio R10 + células (controle negativo);
- 400 μ g/mL de OMC + meio R10 + células;
- 200 μ g/mL de OMC + meio R10 + células;
- 100 μ g/mL de OMC + meio R10 + células;
- 50 μ g/mL de OMC + meio R10 + células;
- 10 μ g/mL de OMC + meio R10 + células;
- 1 μ g/mL de OMC + meio R10 + células.

Em seguida, 200 μ L de cada microtubo foram pipetados em quadruplicata nos seus respectivos poços na placa já contendo células com meio R10.

Efetuu-se o cálculo da curva de concentrações de células.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONTROLE	400 µg	200 µg	100 µg	50 µg	10 µg	1 µg			Curva (10 ⁶)		
BAÇO	A									2		
	B									1		
	C									0,5		
	D									0,25		
	E									Branco		
	F											
	G											
	H											

OBSERVAÇÃO: A/B/C/D = BAÇO

Figura 9. Esquema da placa de 96 poços do ensaio de citotoxicidade em baço de camundongos. Os grupos experimentais foram realizados em quadruplicata como mostra a figura em destaque no esquema acima. Os grupos experimentais foram divididos em meio+células ou meio+ células com 6 concentrações de OMC: 400, 200, 100, 50, 10 ou 1 µg. Além disso, uma curva de células foi realizada com as concentrações de 2, 1, 0,5,0,25 e branco.

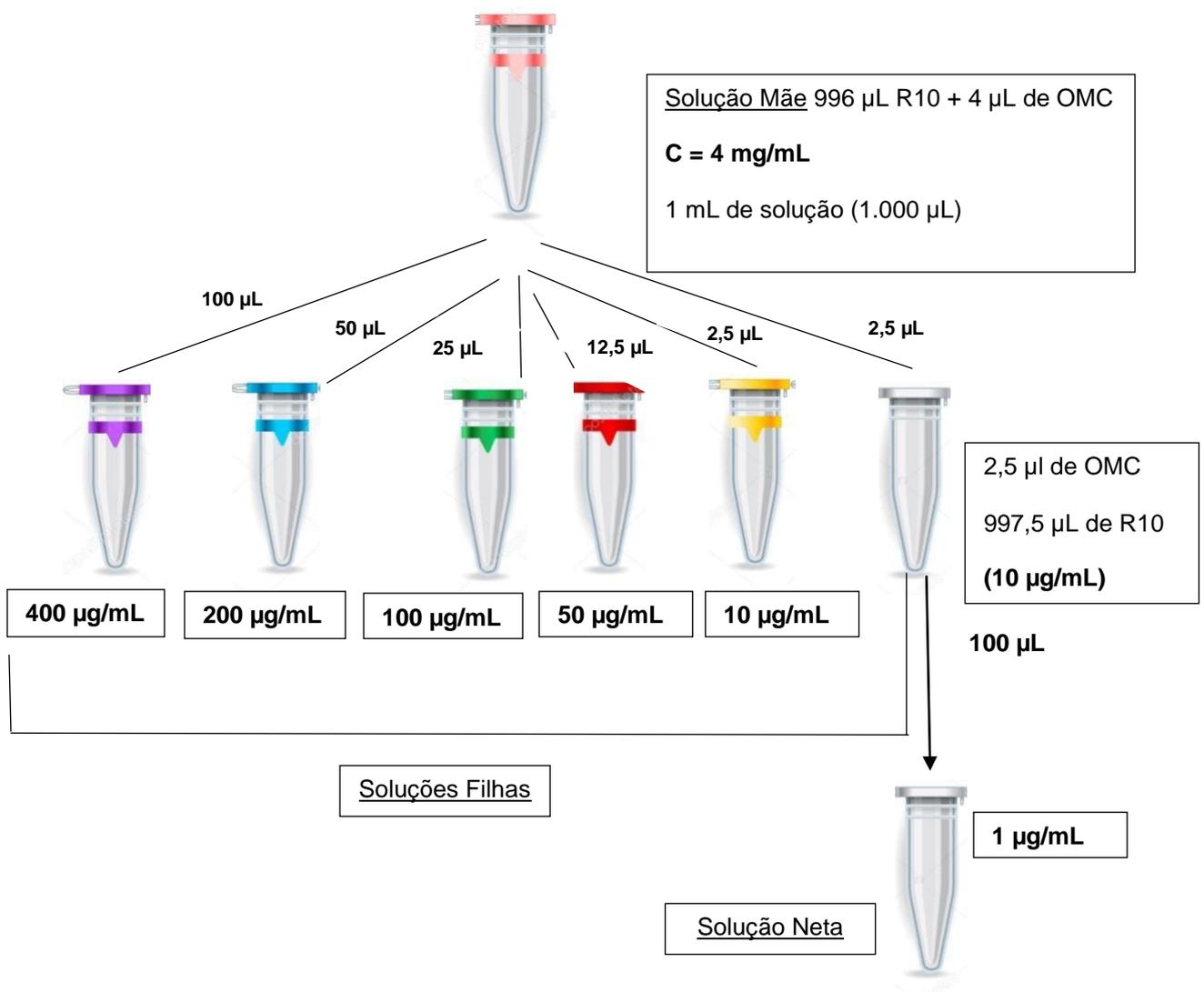


Figura 10. Esquema para obtenção das concentrações individualizadas do filtro solar OMC.

Após tal procedimento a placa de 96 poços foi levada para uma estufa de CO₂ da marca THERMO FISHER SCIENTIFIC e modelo 3425 por 44 horas para ser incubada a 37°C. Após as 44 horas de incubação, a placa de 96 poços foi retirada da estufa e levada novamente para a cabine de fluxo laminar. Na cabine com as luzes apagadas, foi adicionado 22 µL do reagente MTT da marca SIGMA ALDRICH a 5 mg/mL em todos os poços na placa. A placa foi coberta com papel alumínio da marca THERMOPRAT devido a fotossensibilidade do MTT e levada novamente para incubação na estufa de CO₂ por mais 4 horas a 37°C.

Após as 4 horas de incubação a placa foi retirada da estufa e centrifugada em uma centrífuga apropriada para placas de 96 poços da marca HT e modelo CN 5400 a 15.093 G por 5 minutos.

Após o término da centrifugação, todo o sobrenadante foi removido e adicionou-se 150 µL do reagente DMSO da marca SIGMA ALDRICH para dissolução do precipitado. Em seguida a placa foi deixada em repouso por 10 minutos.

Por fim, a placa foi analisada em um espectrofotômetro da marca VERSA MAX e modelo CA94089 em um comprimento de onda de 550 nm com uma programação de 10 segundos de agitação utilizando o programa SOFT MAX PRO para Windows 2000.

4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL NO BAÇO DE CAMUNDONGO

Este experimento foi realizado para confirmar os resultados observados no ensaio de citotoxicidade, uma vez que avaliamos o efeito do OMC sobre células mononucleares (linfócitos e monócitos) no ensaio de citotoxicidade, realizamos o ensaio de atividade mitocondrial para investigar se o OMC apresentava toxicidade para uma subpopulação celular específica, no caso para os linfócitos T, devidamente extratificados neste experimento.

4.13.1 Procedimentos para sensibilização com anti CD3

Vinte e quatro horas antes da realização do ensaio de proliferação celular, uma placa de 96 poços da marca FALCON e fabricante BECTON DICKINSON foi sensibilizada (utilizando 20 poços conforme esquema na figura 11) com anticorpo purificado anti CD3 da marca EXBIO.

Em seguida filtrou-se o reagente PBS puro 0,01M da marca SIGMA ALDRICH em um volume suficiente para cobrir o fundo dos poços da placa que seriam utilizados no ensaio.

A etapa seguinte foi diluir o anticorpo anti CD3 na concentração de 10 µg/mL no PBS previamente filtrado em filtro de seringa Milipore 0,22 µm. Após realizado tal procedimento, a solução foi homogeneizada em vórtex da marca PHOENIX LUFERCO e modelo AP59.

Em seguida transferiu-se o volume de 25 µL/poço do anticorpo em questão para seus respectivos poços na placa.

Pipetou-se um volume arbitrário de PBS filtrado entre os poços na placa como estratégia para dificultar a evaporação nos poços com as amostras.

Por fim a placa foi levada para incubação em uma estufa de CO₂ da marca THERMO FISHER SCIENTIFIC e modelo 3425 por 24 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			Meio - CD3	Meio + CD3	1 µg OMC	10 µg OMC	100 µg OMC	200 µg OMC		Curva (10 ⁶)		
A												
B										4		
C										2		
D										1		
E										0,5		
F										0,25		
G										Branco		
H												

BAÇO

Figura 11. Esquema da placa de 96 poços do ensaio de atividade mitocondrial no baço de camundongos. Cada grupo experimental foi feito em quadruplicata como mostra a região em destaque no esquema acima. Os grupos experimentais foram divididos em Meio+células sem o estímulo anti CD3 (-CD3); Meio+células com o estímulo anti CD3 (+CD3); Meio+células com CD3 + 4 concentrações de OMC: 1, 10, 100 ou 200 µg. Além desses grupos foi também montada uma curva de células com as concentrações de 4, 2, 1, 0,5, 0,25 x 10⁶ células e branco

4.13.2 Procedimentos para a obtenção das concentrações de OMC

Todos os procedimentos para a realização do ensaio de atividade mitocondrial foram os mesmos executados no ensaio de citotoxicidade desde o início do método até o procedimento de contagem das células do baço na câmara de Neubauer em microscópio óptico (ver item 4.13).

A partir daqui, por conseguinte, foram preparados 6 tubos Eppendorfs de 2 mL sendo dois deles contendo meio R10 e células e os quatro tubos restantes contendo as 4 concentrações do OMC (1, 10, 100 e 200 µg/mL) mais meio R10 e células. Para mais detalhes de como foram obtidas as concentrações de OMC, veja a figura 12. Esses eppendorfs foram incubados em uma estufa de CO₂ a 37°C da marca THERMO FISHER SCIENTIFIC e modelo 3425 por 1 hora.

Após o tempo de incubação pipetou-se 200 µL em quadruplicata das diversas concentrações dos Eppendorfs em seus respectivos poços na placa previamente sensibilizada com anti CD3.

Efetou-se o cálculo da curva de concentrações de células.

Por fim a placa foi levada a estufa de CO₂ a 37°C por 92 horas.

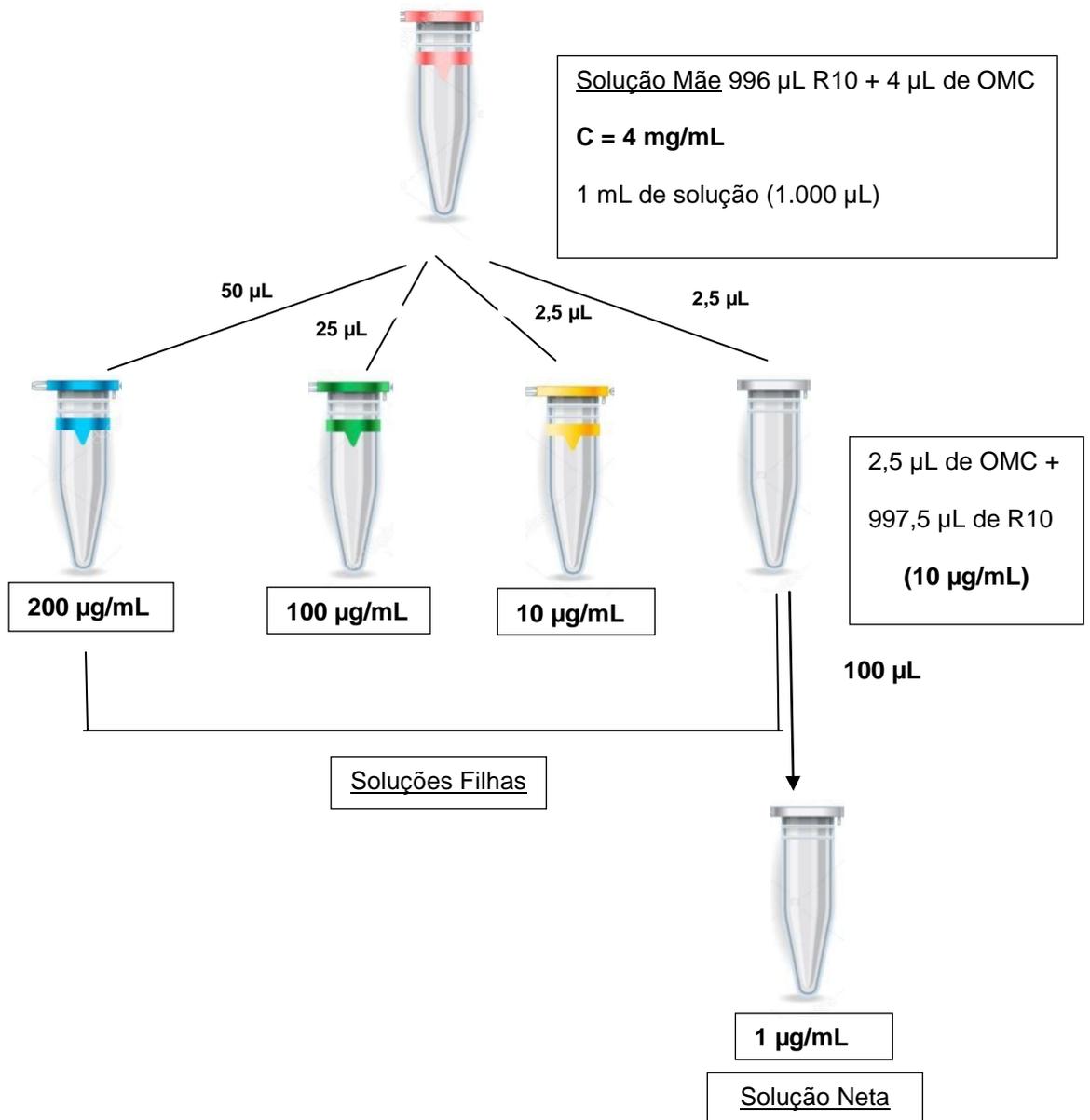


Figura 12. Esquema para obtenção das concentrações individualizadas do filtro solar OMC.

4.13.3 Procedimentos para adição do MTT e revelação da placa

Após as 92 horas de incubação, a placa de 96 poços foi retirada da estufa e levada para leitura em um microscópio invertido bem como registro fotográfico. As fotos foram feitas utilizando uma câmera *FULL HD TRUE VALUE HDMI 1080p* com lente de 0,5x apropriada para microscópio biológico invertido, marca *LEICA MICROSYSTEMS* e modelo 521227 com objetiva de 10x. Após o registro das imagens, a placa foi levada novamente para a cabine de fluxo laminar. Na cabine com as luzes apagadas, foi adicionado 22 μ L do reagente MTT da marca SIGMA ALDRICH a 5 mg/mL em todos os poços na placa. A placa foi coberta com papel alumínio da marca THERMOPRAT devido a fotossensibilidade do MTT e levada novamente para incubação na estufa de CO₂ por mais 4 horas a 37°C.

Daqui por diante, todos os procedimentos para a continuidade do ensaio, envolvendo as etapas de centrifugação, remoção do sobrenadante e adição do DMSO para solubilização do precipitado bem como a leitura da placa no espectrofotômetro, foram realizados igualmente com a mesma metodologia empregada no ensaio de citotoxicidade (ver item 4.13).

4.14 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NO BAÇO DE CAMUNDONGOS

Este experimento foi realizado para confirmar se o OMC efetivamente exerce efeitos sobre a proliferação celular de linfócitos T, uma vez que o ensaio de atividade mitocondrial sugere potencial toxicidade indireta sobre a proliferação celular.

4.14.1 Procedimentos para sensibilização com anti CD3

Os procedimentos para a sensibilização com anti CD3 foram idênticos aos realizados no ensaio de atividade mitocondrial (ver item 4.14.1).

O esquema da placa sensibilizada com o anti CD3 com as respectivas exposições aparece na figura 13.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Meio - CD3 - - -	Meio + CD3 - - -	Meio +CD3 1 µg OMC -	Meio +CD3 10 µg OMC -	Meio +CD3 100 µg OMC -	Meio +CD3 1 µg OMC T4	Meio +CD3 10 µg OMC T4	Meio +CD3 100 µg OMC T4	Meio +CD3 - - T4	Meio - - - T4	
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

BAÇO

Figura 13. Esquema da placa de 96 poços do ensaio de Proliferação celular com CFSE no baço de camundongos. Cada grupo experimental foi feito em quadruplicata como mostra a região em destaque no esquema acima. Os grupos experimentais foram divididos em Meio+células sem o estímulo anti CD3 (-CD3); Meio+células com o estímulo anti CD3 (+CD3); Meio+células com CD3 + 3 concentrações de OMC: 1, 10 ou 100 µg; Meio+células com CD3 + 3 concentrações de OMC: 1, 10 ou 100 µg + T4 10⁻⁵ M; Meio+células com o estímulo anti CD3 (+CD3) + T4 10⁻⁵ M; Meio+células sem o estímulo anti CD3 (-CD3) + T4 10⁻⁵ M.

4.14.2 Procedimentos para o preparo do filtro solar OMC e T4

Todos os procedimentos para a realização do ensaio de proliferação celular foram os mesmos executados no ensaio de citotoxicidade desde o início do método até o procedimento de contagem das células do baço na câmara de Neubauer em microscópio óptico (ver item 4.13).

A partir daqui, por conseguinte, após as células terem sido isoladas no gradiente e contadas, foi adicionado 2 μL do reagente CFSE (estoque 5 mM) da CellTrace™ Cell Proliferation Kits. O CFSE é um reagente que prontamente se difunde dentro das células ligando-se covalentemente às aminas intracelulares e emitindo uma fluorescência. A medida em que ocorre a proliferação celular, essa fluorescência vai diminuindo, uma vez que o reagente CFSE começa a ser dividido também com as novas células geradas.

Foi adicionado 1 mL de PBS a esta solução de CFSE e levada a centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas. Após o término da centrifugação, o sobrenadante é descartado e novamente adicionou-se 1 mL de PBS para a lavagem do CFSE. Pela segunda vez o CFSE foi centrifugado. Após o fim do processo o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de R10 para resuspender as células e centrifugado pela terceira vez. Após a centrifugação, as células com CFSE a 10 μM estão prontas para serem usadas.

Em seguida foram preparados 10 tubos Eppendorfs de 2 mL sendo dois deles contendo meio R10 e células, 3 tubos contendo as 3 concentrações do OMC (1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mais meio R10 e células, 3 tubos contendo as 3 concentrações do OMC (1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 2 μL de T4 + meio R10 e células, 2 tubos contendo apenas T4. Para mais detalhes de como foram obtidas as concentrações de OMC, veja a figura 14. OBS: Cada tubo recebeu 100 μL de células com CFSE.

Essas substâncias ficaram durante 30 minutos em seus respectivos tubos em contato com as células.

Após esse tempo pipetou-se 200 μL em quaduplicata dos diversos tubos em seus respectivos poços na placa previamente sensibilizada com anti CD3.

Por fim a placa foi levada a estufa de CO_2 a 37°C por 72 horas.

Após as 72 horas de incubação, a placa de 96 poços foi retirada da estufa, e com o auxílio de ponteiros individualizadas para cada grupo experimental, o fundo dos poços foi raspado, 200 μL de células foram pipetados e solubilizados em 800 μL de PBS num tubo de ensaio apropriado para Citometria de Fluxo. Por fim a aquisição das amostras contidas em seus respectivos tubos de ensaio foi realizada no Citômetro CyFlow Space da Partec, sendo coletados 10.000 eventos para cada tubo. As análises foram realizadas no programa FlowMax™.

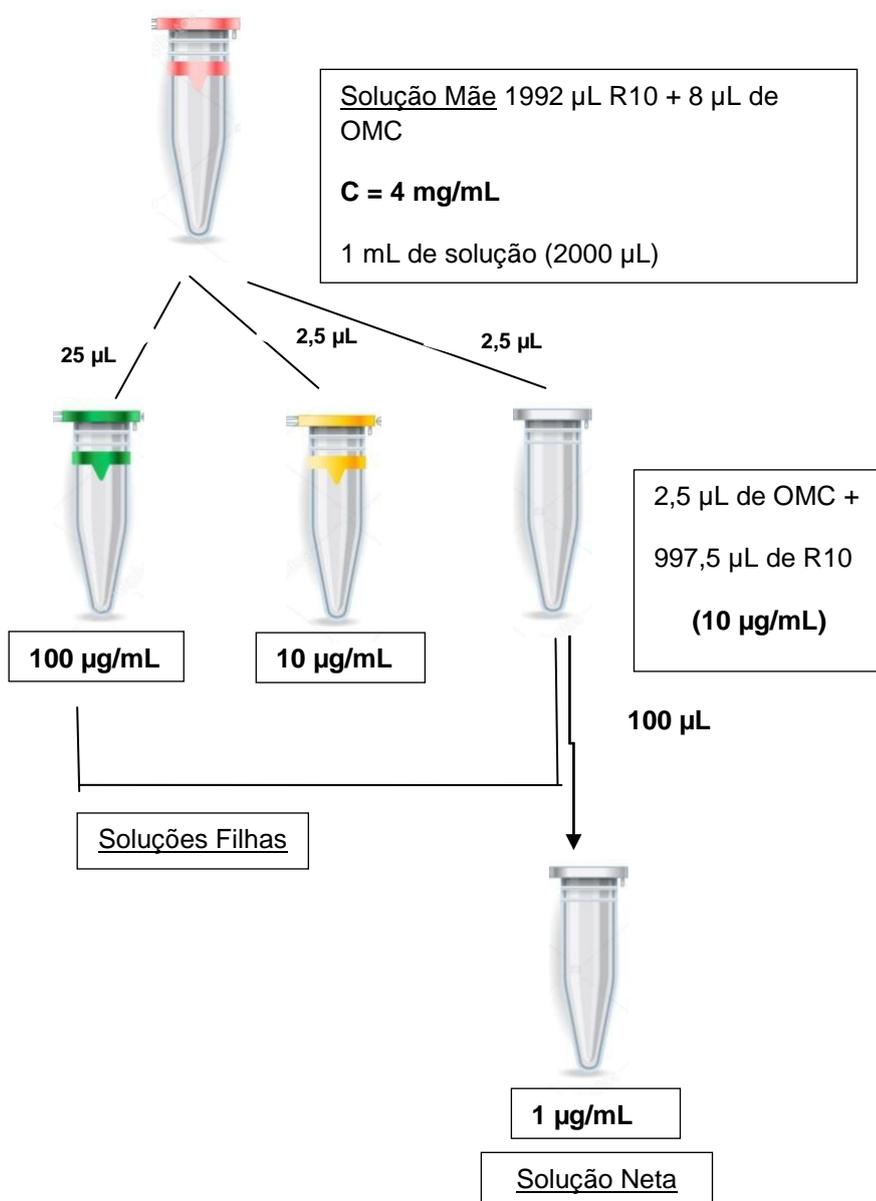


Figura 14. Esquema para obtenção das concentrações individualizadas do filtro solar OMC.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as distribuições de dados foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnof. Para essa avaliação, um valor de p maior que 0,1 indica que os dados se distribuem normalmente. Para dados com distribuição normal, foram calculados médias e erro padrão da média. Para a avaliação do ganho de peso, foi realizada ANOVA de medidas repetidas, com sexo e grupo como fatores de repetição entre os sujeitos. Para dados com distribuição livre, foram realizadas análises estatísticas apropriadas para cada tipo de dado. A variável abertura de olhos foi analisada por meio do teste do Qui-quadrado. Para todos os testes, valores de p menores que 0,05 foram considerados como tendo significância estatística. Para análise estatística dos dados de peso dos órgãos, celularidade, contagem total e diferencial de leucócitos, citometria de fluxo, foi utilizada a análise de variância ANOVA ONEWAY, seguida de pos-hoc Dunnett enquanto que para citotoxicidade, atividade mitocondrial e proliferação celular pos-hoc Tukey para avaliação da diferença entre os grupos. Foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos programas Graph Pad Prism 5 e SPSS versão 15.0 para Windows.

5 – RESULTADOS

5.1 PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA (RATOS)

Com o objetivo de se definir a dose do filtro solar OMC a ser administrado nos ratos a partir do dia pós-natal 5 (PN5), um estudo piloto foi realizado. Nele foram testadas as seguintes doses: 500, 1.000 e 1.500 mg/kg/dia. Neste ensaio foi observado que a dose de 1.500 mg/kg/dia resultou na mortalidade de 100% dos ratos a partir do segundo dia de exposição. Já a dose de 1.000 mg/kg/dia foi responsável pela morte da metade dos roedores deste grupo a partir do terceiro dia de exposição enquanto que a dose de 500 mg/kg/dia neste estudo não acarretou qualquer morte durante os 18 dias de exposição como mostra o gráfico 1. A partir desse estudo piloto, a dose de 500 mg/kg/dia foi adotada como única na execução do protocolo experimental propriamente dito.

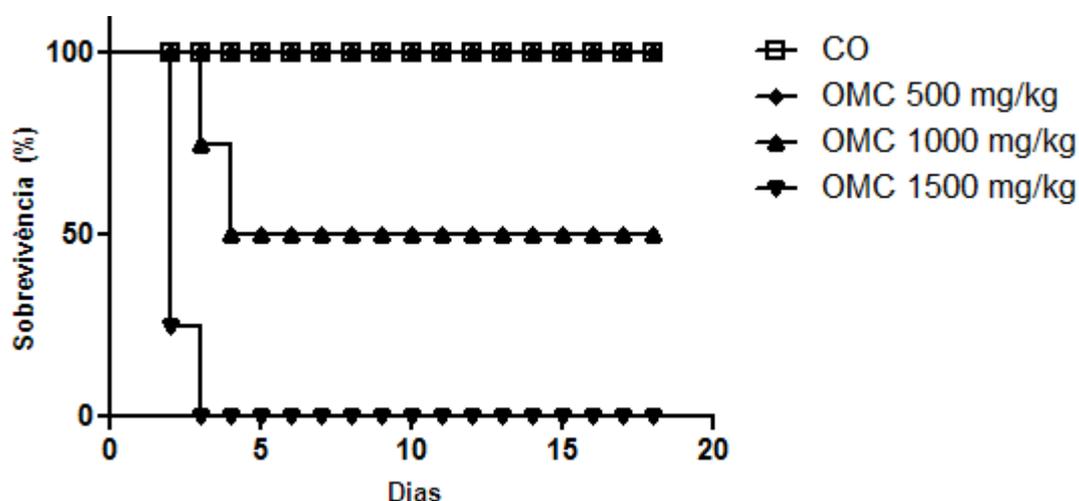


Gráfico 1. Porcentagem de sobrevivência de ratos a partir do PN5 de ambos os sexos expostos ao OMC em diferentes concentrações, 500, 1.000, ou 1.500 mg/kg/dia, administrado oralmente durante o período lactacional. N mínimo = 7.

5.2 PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO

Diariamente o desenvolvimento dos ratos filhotes de ambos os sexos foi acompanhado durante o período lactacional (PN5 ao PN23). Nesta etapa, foram registrados os seguintes parâmetros: dia do crescimento de pelos, erupção dos incisivos e abertura total de ambos os olhos. Não foram observadas alterações nos parâmetros crescimento de pelos e erupção dos incisivos para os grupos PTU e OMC com relação ao grupo controle (tabela 3). Contudo, com relação a abertura de olhos, tanto o grupo PTU quanto o OMC apresentaram atraso com relação ao grupo óleo de milho. Essa diferença foi estatisticamente significativa.

O atraso na abertura de olhos já foi correlacionado na literatura ao atraso no neurodesenvolvimento, sendo já demonstrado que roedores com desregulação tireoidiana apresentam atraso neste parâmetro.

A análise estatística através do teste do quiquadrado mostrou que 72,20% dos animais do grupo óleo de milho tendem a abrir os olhos depois do pós-natal 14, enquanto que 93,50% dos animais OMC abrem os olhos após esse período pós-natal (tabela 3), sugerindo atraso neste importante indicador do neurodesenvolvimento.

Tabela 3. Efeito da exposição ao OMC sobre a frequência do crescimento de pelos, erupção dos incisivos, abertura de olhos de ratos lactentes de ambos os sexos.

PARÂMETROS		CRESCIMENTO DE PELOS		ERUPÇÃO DOS INCISIVOS		ABERTURA DE OLHOS	
		Antes PN8	Depois PN8	Antes PN12	Depois PN12	Antes PN14	Depois PN14
GRUPO							
CONTROLE	Contagem	18	1	16	2	5	13
	% dentro GRUPO	94,74	5,26	88,90	11,10	27,80	72,20
PTU 4 mg	Contagem	17	0	11	7	0	18*
	% dentro GRUPO	100	0	61,10	38,90	0	100*
OMC 500 mg	Contagem	37	0	25	11	2	29*
	% dentro GRUPO	100	0	69,40	30,60	6,50	93,50*

Dados são mostrados como porcentagem do número de animais por grupo. N mínimo = 17 por grupo por sexo. (Pearson Quiquadrado 120,69; gl = 4; p < 0,001). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p < 0,05 (*).

5.3 GANHO DE PESO

Com o propósito de avaliar a toxicidade do OMC, os animais foram pesados diariamente para verificar os efeitos da exposição a este filtro UV sobre o ganho de peso no período lactacional. O registro de peso diário dos filhotes revelou que o ganho de peso dos animais do grupo OMC 500 mg/Kg de ambos os sexos foi significativamente menor quando comparado aos ratos do grupo óleo de milho como é evidenciado no gráfico 2 e 3 abaixo. O mesmo fenômeno foi observado para o grupo PTU 4 mg/Kg. Contudo, o efeito foi mais tardio no grupo PTU.

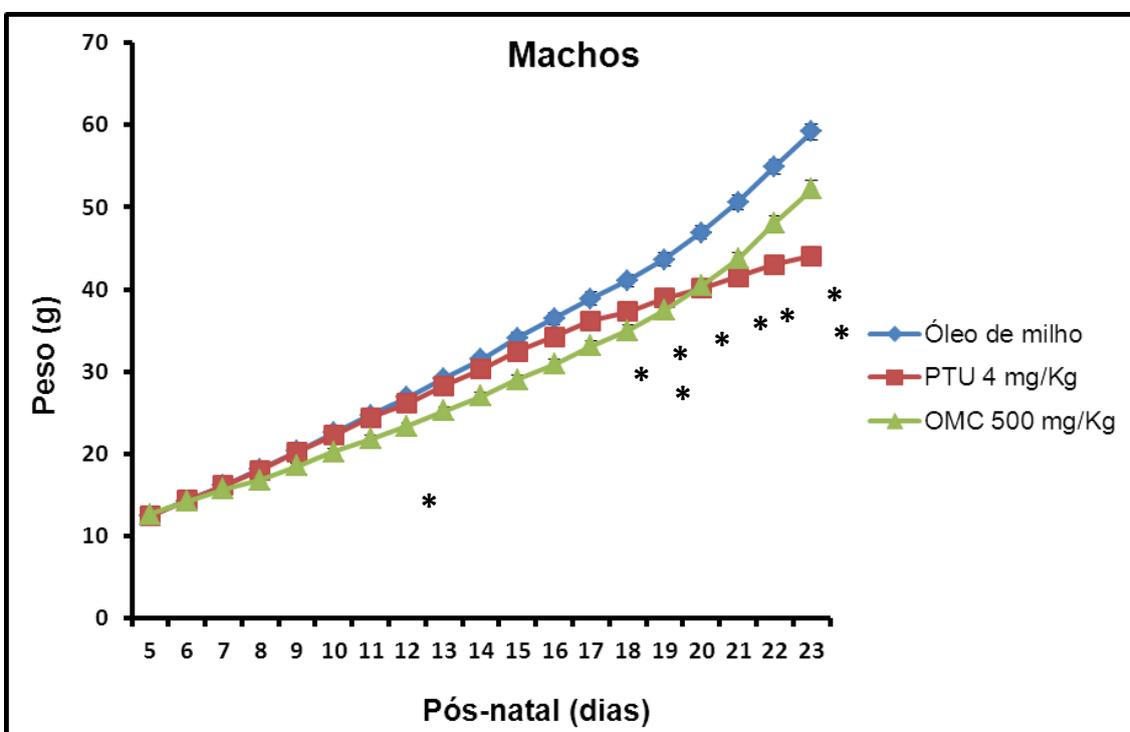


Gráfico 2 - Ganho de peso durante o período lactacional de ratos durante 18 dias de exposição ao OMC. Dados são mostrados como média \pm EPM do peso. Animais foram pesados diariamente. N mínimo = 31 por grupo por sexo. ANOVA mostrou que os animais do grupo OMC 500 mg/Kg de ambos os sexos apresentaram um ganho menor de peso com relação ao grupo óleo de milho durante os 18 dias de administração para ambos os sexos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

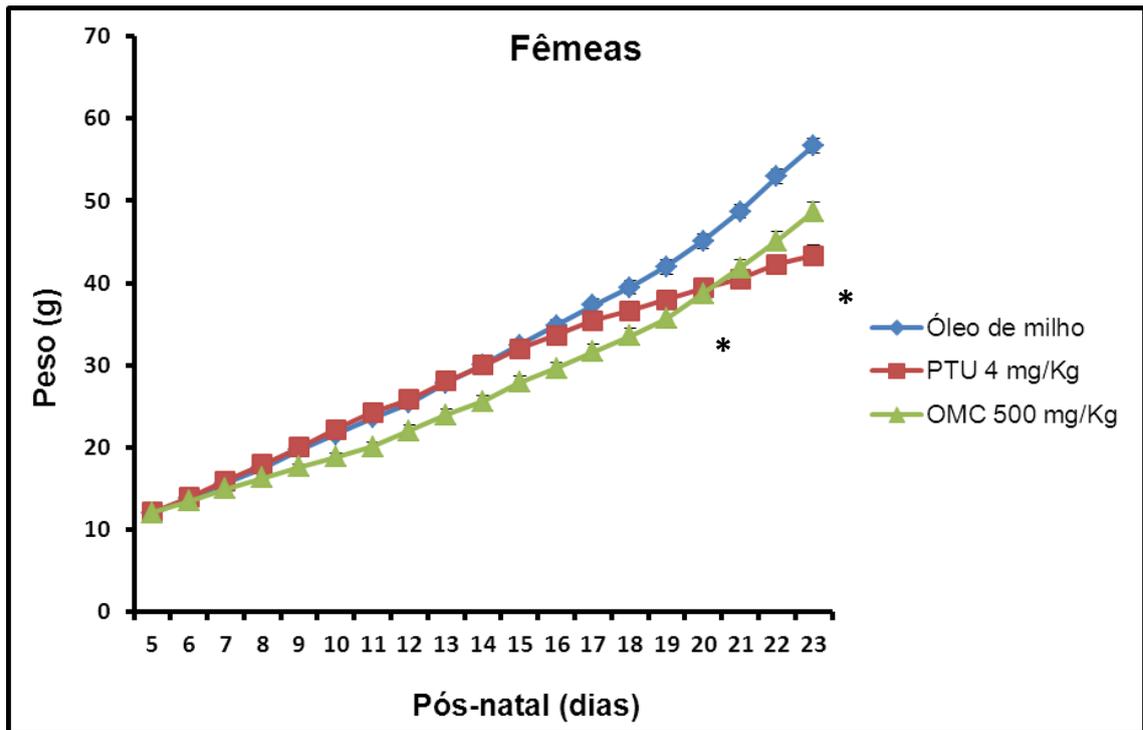


Gráfico 3 - Ganho de peso durante o período lactacional de ratas durante 18 dias de exposição ao OMC. Dados são mostrados como média \pm EPM do peso. Animais foram pesados diariamente. N mínimo = 31 por grupo por sexo. ANOVA mostrou que os animais do grupo OMC 500 mg/Kg de ambos os sexos apresentaram um ganho menor de peso com relação ao grupo óleo de milho durante os 18 dias de administração para ambos os sexos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.4 DOSAGEM HORMONAL

Com a finalidade de comprovar os dados da literatura que apontam o OMC como potencial desregulador tireoideano, a dosagem sérica de T4 total foi realizada no PN23. Nela foi observada que a exposição dos ratos no período lactacional ao OMC desencadeou uma redução nos níveis séricos de tiroxina total comparado aos animais do grupo controle, o que é indicativo que os animais expostos ao filtro solar exibem um perfil de hipotiroxinemia (Gráfico 4). Os níveis de T4 total dos roedores do grupo OMC foram de aproximadamente 5 $\mu\text{g/dL}$, enquanto que os animais do grupo controle apresentaram níveis em cerca de 6,25 $\mu\text{g/dL}$, havendo portanto redução de 20% nos níveis do hormônio tireoideano.

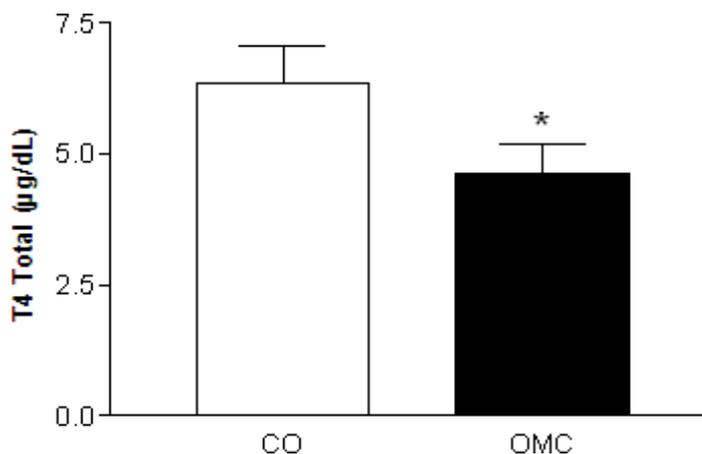


Gráfico 4. Níveis séricos de tiroxina (T4 total) de ratos de ambos os sexos através de Kit RIA. Dados são mostrados como média \pm EPM de T4 total ($\mu\text{g/dL}$). N mínimo = 7 por grupo por sexo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t student. p valor = 0,0135. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA

Com a finalidade de avaliar se as alterações séricas na tiroxina total impactariam em parâmetros bioquímicos e hematológicos, um painel completo foi obtido para análise dos ratos expostos ao OMC.

Essa análise integrativa envolveu parâmetros de funcionamento hepático, renal, bem como glicose, proteínas totais, colesterol e hemograma completo. Nossos resultados não revelaram nenhuma alteração significativa do grupo OMC com relação ao grupo controle negativo para ambos os sexos em nenhum dos parâmetros bioquímicos investigados como mostra a Tabela 4 abaixo.

		CO		PTU		OMC	
Glicose	M	145,7	± 39,60	154,9	± 18,6	146,2	± 24,54
	F	145,90	± 25,31	151,6	± 23,74	148,92	± 32,15
Uréia	M	37,50	± 16,70	47,4	± 13,8	29	± 11,22
	F	38,80	± 14,65	46,5	± 11,21	34,27	± 8,72
Creatina	M	921,10	± 1043,60	1583,8	± 1634,9	1132,2	± 1121,09
	F	1408,60	± 1155,12	1040,8	± 677,06	2269,25	± 2189,84
Creatinina	M	0,30	± 3,07	0,3	± 3,06	0,2	± 3,05
	F	0,20	± 3,04	0,2	± 2,88	0,36	± 4,1
Albumina	M	2,30	± 3,48	2,2	± 3,15	2,2	± 2,95
	F	2,20	± 3,07	2,2	± 3	2,08	± 4,18
Asp-AminT	M	102,80	± 50,95	127,7	± 89,3	113,7	± 64,92
	F	124,10	± 49,13	126,1	± 46,8	155,2	± 154,06
Alan-AminT	M	40,20	± 23,00	33,2	± 24,04	56,7	± 47,99
	F	46,60	± 18,04	38,6	± 15,18	59,88	± 33,65
Ptns Tot	M	4,20	± 4,23	4,3	± 3,99	4,2	± 4,29
	F	4,10	± 3,88	4,2	± 3,71	4,19	± 4,75
Ácido Úrico	M	1,50	± 4,74	2,1	± 3,79	1,3	± 5,19
	F	1,60	± 4,41	1,8	± 4,00	1,58	± 5,54
Colesterol	M	76,00	± 35,40	182,7	± 87	88,2	± 23,24
	F	79,90	± 18,95	168,3	± 67,34	88,28	± 21,89
Fosfat Alc	M	248,40	± 141,30	182,7	± 90,51	215,8	± 86,26
	F	270,40	± 41,72	171,4	± 29,19	207,93	± 73,77

Tabela 4. Análise bioquímica sérica de ratos de ambos os sexos no PN23 expostos ao Controle, PTU 4mg/Kg ou OMC 500 mg/Kg durante o período lactacional. Dados são mostrados como média ± EPM do parâmetro avaliado. N mínimo = 6 por grupo por sexo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do teste Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Com a finalidade de se obter um painel hematológico, realizamos um hemograma completo no PN23 nos ratos expostos ao filtro solar durante o período lactacional mostrado na Tabela 5. Em muitos dos experimentos realizados em nosso laboratório observamos uma alteração na viscosidade do sangue de roedores expostos ao PTU ou ao filtro solar OMC. Nossos resultados mostraram que o número de plaquetas das fêmeas expostas ao OMC com relação ao grupo controle negativo reduziram de forma significativa, mais especificamente uma redução de aproximadamente 27%. O mesmo efeito foi observado com relação ao parâmetro WBC, onde houve uma redução nas fêmeas expostas ao filtro solar frente ao grupo controle. O WBC refere-se a contagem de leucócitos envolvendo neutrófilos, basófilos, eosinófilos e linfócitos. A avaliação mostrou que a exposição ao filtro solar reduz significativamente os leucócitos apenas das fêmeas comparadas ao grupo controle, especificamente uma redução de aproximadamente 36%.

		CO	PTU	OMC
RBC	M	5,46 ± 0,08	5,47 ± 0,2	5,35 ± 0,22
	F	5,66 ± 0,08	5,41 ± 0,2	5,24 ± 0,22
HGB	M	10,22 ± 0,22	9,50 ± 0,15	9,95 ± 0,62
	F	10,20 ± 0,38	9,52 ± 0,3	10,27 ± 0,33
HCT	M	33,82 ± 0,47	31,38 ± 0,16	32,73 ± 2,27
	F	34,28 ± 1,26	30,97 ± 1,13	32,75 ± 1,19
MCV	M	61,96 ± 1,24	57,72 ± 2,09	61,30 ± 3,67
	F	61,97 ± 1,34	57,30 ± 1,53	62,88 ± 1,75
MCH	M	18,74 ± 0,58	17,50 ± 0,85	18,65 ± 0,72
	F	18,45 ± 0,40	17,67 ± 0,63	19,67 ± 0,19
MCHC	M	30,17 ± 0,47	30,26 ± 0,45	30,45 ± 0,88
	F	29,80 ± 0,06	30,82 ± 0,39	31,35 ± 0,77
WBC	M	3,47 ± 0,37	4,06 ± 0,64	4,33 ± 1,18
	F	4,70 ± 0,65	3,87 ± 0,49	3,00* ± 0,48
PLAQUETA	M	918,17 ± 62,86	1016,50 ± 82,58	839,00 ± 81,45
	F	991,86 ± 58,77	953,90 ± 71,89	723,71* ± 55,10

Tabela 5. Análise hematológica do sangue total de ratos de ambos os sexos no PN23 expostos ao Controle, PTU 4mg/Kg ou OMC 500 mg/Kg durante o período lactacional. Dados são mostrados como média ± EPM do parâmetro avaliado. N mínimo = 4 por grupo por sexo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida do pós-teste Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

5.6.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado foi selecionado para os ensaios comportamentais com a finalidade de investigar possíveis alterações de ansiedade desencadeadas pela exposição ao filtro solar OMC durante a lactação. Neste teste não foram observadas alterações significativas nos ratos de ambos os sexos expostos ao OMC quando comparados aos animais do grupo controle com base nos parâmetros investigados no teste. Contudo, foi observado um aumento significativo no número de entradas nos braços abertos dos ratos do grupo PTU comparados aos animais do grupo controle. A diferença foi de aproximadamente 100% e o resultado demonstra que o PTU reduziu a ansiedade dos machos (gráfico 5).

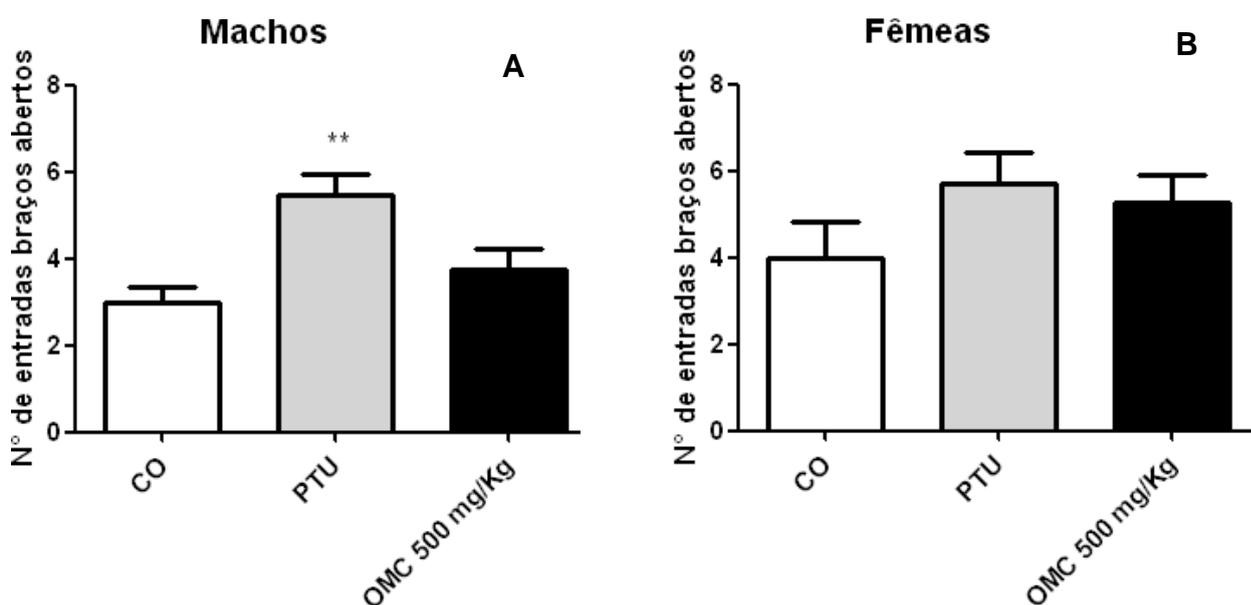


Gráfico 5 - Teste do labirinto em cruz elevado em ratos no dia PN25. O gráfico A representa os machos e o B as fêmeas. Dados são mostrados como média \pm EPM. N mínimo = 12 por grupo por sexo. Análise estatística utilizada foi o teste ANOVA com o pós-teste Dunnett. Machos ($F=5,207$; $gl=2$; $p<0,0604$) e Fêmeas ($F=1,318$; $gl=2$; $p<0,9142$). Diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$ (*).

5.6.2 CAMPO VAZADO (CV)

O teste do campo vazado foi selecionado para os ensaios comportamentais com o objetivo de investigar possíveis alterações na atividade locomotora desencadeadas pela exposição ao filtro solar OMC durante a lactação. Neste teste observamos que apenas os machos do grupo OMC apresentaram maior número de quadrantes percorridos que os ratos do grupo controle. Esses quadrantes foram registrados como uma medida de deambulação realizada por esses roedores. Essa diferença foi estatisticamente significativa. O gráfico 6A mostra que os ratos do grupo OMC deslocaram-se aproximadamente 33% mais que os roedores do grupo controle. O fato dos animais do grupo OMC terem se deslocado mais que os do grupo controle sugere que o filtro solar em questão induziu um perfil de hiperatividade nesses roedores.

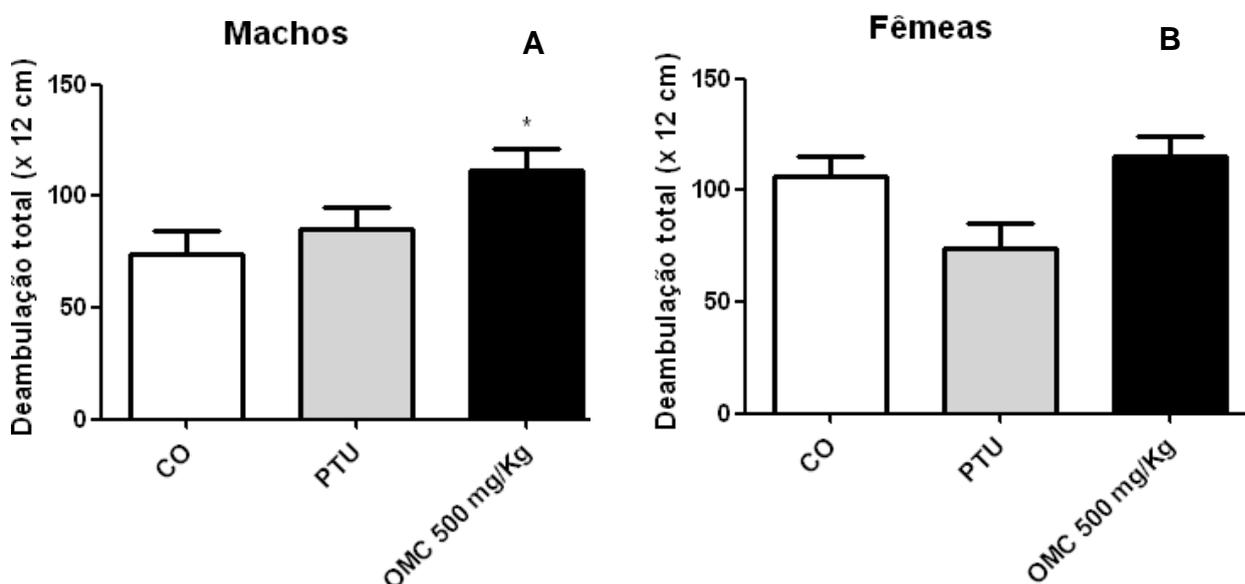


Gráfico 6 - Teste do campo vazado em ratos no dia PN26. O gráfico A representa a deambulação dos machos e B a deambulação das fêmeas. Dados são mostrados como média \pm EPM. N mínimo = 12 por grupo por sexo. Análise estatística utilizada foi o teste ANOVA com o pós-teste Dunnett. Machos ($F=4,342$; $gl=2$; $p<0,0198$) e Fêmeas ($F=4,569$; $gl=2$; $p<0,4232$). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Além da atividade locomotora, o teste do campo vazado foi selecionado para investigar a neofilia, que é a busca por novidade do roedor. A finalidade foi avaliar se a exposição ao filtro solar OMC durante a lactação modula de alguma forma este comportamento. A análise deste parâmetro demonstrado no gráfico 7 não revelou nenhuma alteração estatisticamente significativa dos animais expostos ao OMC quando comparado ao controle para ambos os sexos no *head dipping* (o ato de olhar no interior dos orifícios do artefato). O resultado sugere que a exposição ao OMC não interferiu com a curiosidade dos roedores de ambos os sexos.

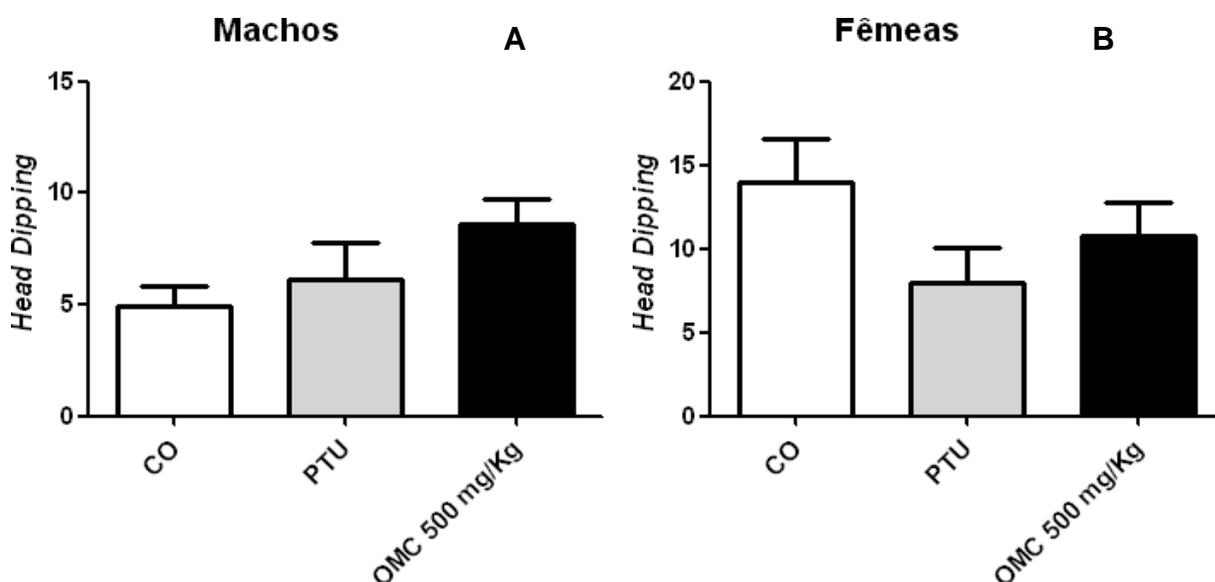


Gráfico 7 - Teste do campo vazado em ratos no dia PN26. O gráfico A representa o *head dipping* dos machos e B o *head dipping* das fêmeas. Dados são mostrados como média \pm EPM. N mínimo = 12 por grupo por sexo. Análise estatística utilizada foi o teste ANOVA com o pós-teste Dunnett. Machos ($F=2,455$; $gl=2$; $p<0,1262$) e Fêmeas ($F=1,316$; $gl=2$; $p<0,5627$). Diferenças foram consideradas significativas quando $p< 0,05$ (*).

5.6.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (LAM)

Este teste comportamental foi realizado com o objetivo de avaliar alterações cognitivas que envolvem essencialmente memória e aprendizagem que podem ter sido moduladas em função da desregulação tireoideana. Este teste é dividido em duas etapas que visam checar esses parâmetros.

5.6.3.1 Etapa de aquisição de memória (aprendizagem)

A etapa de aquisição de memória evidenciou que todos os grupos de exposição adquiriram memória ao longo dos dias, uma vez que o tempo para encontrar a plataforma foi reduzindo gradativamente ao longo dos 4 dias desta etapa. Exceto os ratos machos do primeiro ao segundo dia do grupo PTU que parecem não ter adquirido memória neste dia. Houve diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos expostos no 4 dia de teste. Tal fenômeno foi observado em ambos os sexos (Gráfico 8 e 9).

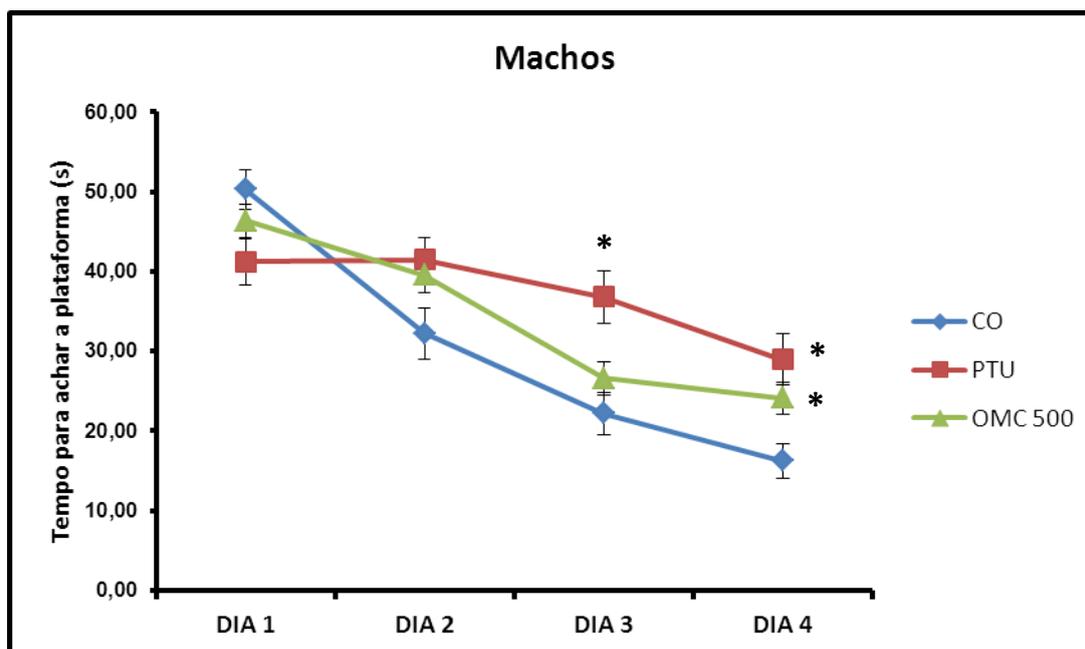


Gráfico 8 – Teste do labirinto aquático de Morris em ratos no PN27, 28, 29 e 30 que receberam óleo de milho (CO), PTU 4 mg/Kg/dia ou OMC 500 mg/Kg/dia durante a amamentação. Machos durante a etapa de aquisição de memória. Dados são mostrados como média \pm EPM do tempo para encontrar a plataforma. N mínimo = 12 por grupo por sexo. Análise estatística foi realizada através de ANOVA para os 4 primeiros dias de teste. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

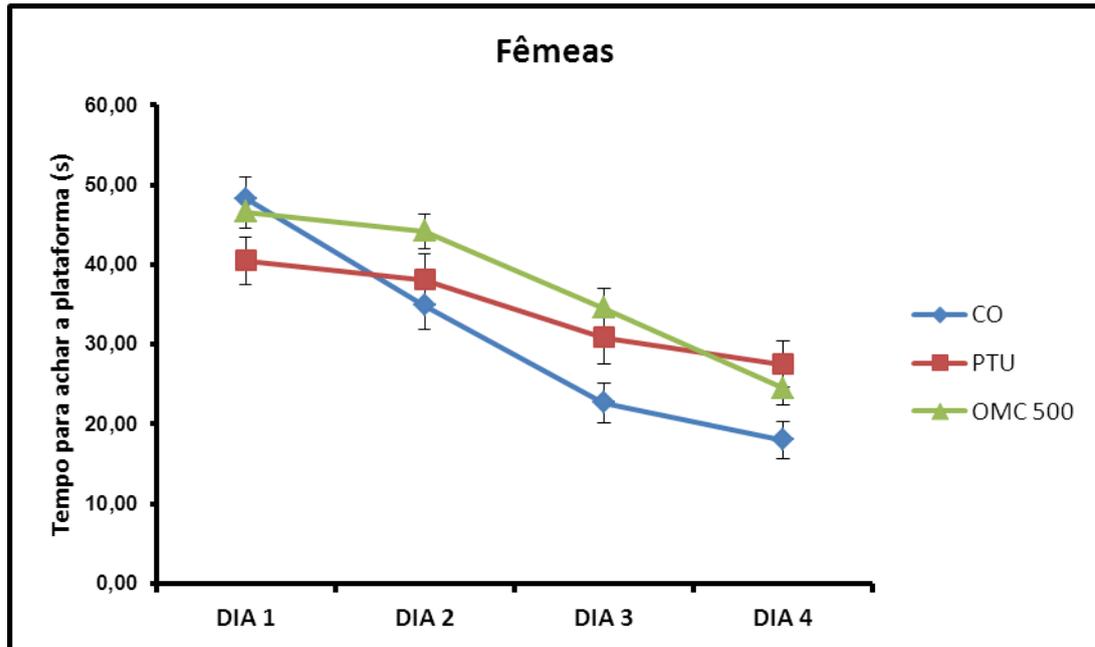


Gráfico 9 – Teste do labirinto aquático de Morris em ratos no PN27, 28, 29 e 30 que receberam óleo de milho (CO), PTU 4 mg/Kg/dia ou OMC 500 mg/Kg/dia durante a amamentação. Fêmeas durante a etapa de aquisição de memória. Dados são mostrados como média \pm EPM do tempo para encontrar a plataforma. N mínimo = 12 por grupo por sexo. Análise estatística foi realizada através de ANOVA para os 4 primeiros dias de teste. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.6.3.2 Teste de memória no LAM (5º dia)

No quinto dia foi realizado o teste propriamente dito e foi observado que não houve diferenças significativas entre o grupo OMC versus o grupo controle para ambos os sexos. Evidenciando assim, que a exposição ao filtro solar durante o período lactacional não interferiu na memória dos ratos. Contudo, o controle positivo PTU para ambos os sexos mostrou-se sensível para avaliação de memória no teste do Labirinto Aquático de Morris, uma vez que foi observado um tempo de permanência significativamente reduzido no quadrante onde se encontrava a plataforma comparado ao grupo controle (Gráfico 10).

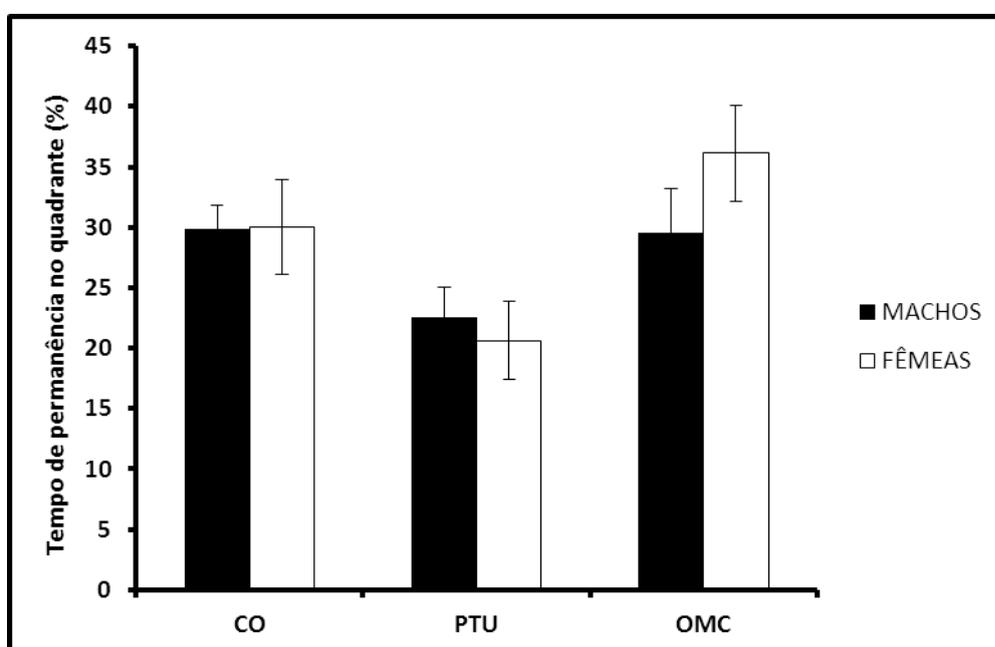


Gráfico 10 - Dia do teste propriamente dito no labirinto aquático de Morris em ratos de ambos os sexos no PN31 que receberam óleo de milho (CO), PTU 4 mg/Kg/dia ou OMC 500 mg/Kg/dia durante a amamentação. Dados são mostrados como média \pm EPM do tempo em que o animal ficou no quadrante onde a plataforma se encontrava na etapa de aquisição de memória. N mínimo = 12 por grupo por sexo. Análise estatística foi realizada através de ANOVA para o quinto dia de teste. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.7 PARÂMETROS DO DESENVOLVIMENTO (CAMUNDONGOS)

Esta análise foi realizada para avaliar se a exposição indireta através do leite materno geraria efeitos semelhantes aos observados pela exposição direta. Diariamente o desenvolvimento dos filhotes de ambos os sexos foi acompanhado durante o período lactacional. Nesta etapa foram registrados os seguintes parâmetros: dia do descolamento das orelhas, crescimento de pelos, erupção dos incisivos e abertura total de ambos os olhos. Não foi observada nenhuma alteração nos parâmetros descolamento de orelhas, crescimento de pelos e erupção dos incisivos para os grupos PTU e OMC com relação ao grupo controle. Contudo, com relação à abertura de olhos, os animais do grupo OMC 1.000 mg/Kg atrasaram o dia da abertura de ambos os olhos com relação ao grupo óleo de milho (controle). Essa diferença foi estatisticamente significativa (tabela 6).

A análise estatística através do teste do quiquadrado mostrou que 58,80% dos animais do grupo óleo de milho abrem os olhos depois do pós-natal 14, enquanto que 75,00% dos animais OMC 1.000 mg/Kg abrem os olhos após esse período pós-natal (tabela 6), sugerindo atraso neste importante indicador do neurodesenvolvimento.

Tabela 6. Efeito da exposição ao OMC sobre a frequência da abertura de olhos de camundongos de ambos os sexos.

PARÂMETROS		DESCOLAMENTO DE ORELHAS		CRESCIMENTO DE PELOS		ERUPÇÃO DOS INCISIVOS		ABERTURA DE OLHOS	
		Antes PN4	Depois PN4	Antes PN5	Depois PN5	Antes PN10	Depois PN10	Antes PN14	Depois PN14
GRUPO									
CONTROLE	Contagem	2	30	0	31	6	22	7	10
	% dentro GRUPO	6,2	93,8	0	100	21,4	78,6	41,2	58,8
PTU 4 mg	Contagem	0	24	0	24	8	12	5	6
	% dentro GRUPO	0	100	0	100	40	60	45,5	54,5
OMC 250 mg	Contagem	0	21	0	21	9	10	7	8
	% dentro GRUPO	0	100	0	100	47,4	52,6	46,7	53,3
OMC 500 mg	Contagem	6	16	0	22	1	21	10	8
	% dentro GRUPO	27,3	72,7	0	100	4,5	95,5	55,6	44,4
OMC 1000 mg	Contagem	8	21	7	22	6	23	7	21*
	% dentro GRUPO	27,6	72,4	24,1	75,9	20,7	79,3	25	75*

Dados são mostrados como porcentagem do número de animais por grupo. N mínimo = 17 por grupo por sexo. (Pearson Quiquadrado mostrou que os animais do grupo OMC 1.000 mg/Kg de apresentaram atraso na abertura de olhos com relação ao grupo óleo de milho. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.8 GANHO DE PESO

Com o propósito de avaliar a toxicidade do OMC, os animais foram pesados diariamente para verificar os efeitos da exposição a este filtro UV sobre o ganho de peso no período lactacional. Esta análise também foi realizada para certificar que a exposição indireta através do leite materno geraria efeitos semelhantes aos observados pela exposição direta.

O registro de peso diário dos filhotes revelou que o ganho de peso dos animais do grupo OMC 1.000 mg/Kg de ambos os sexos foi significativamente menor que dos camundongos do grupo óleo de milho como é evidenciado no gráfico 11 e 12 abaixo.

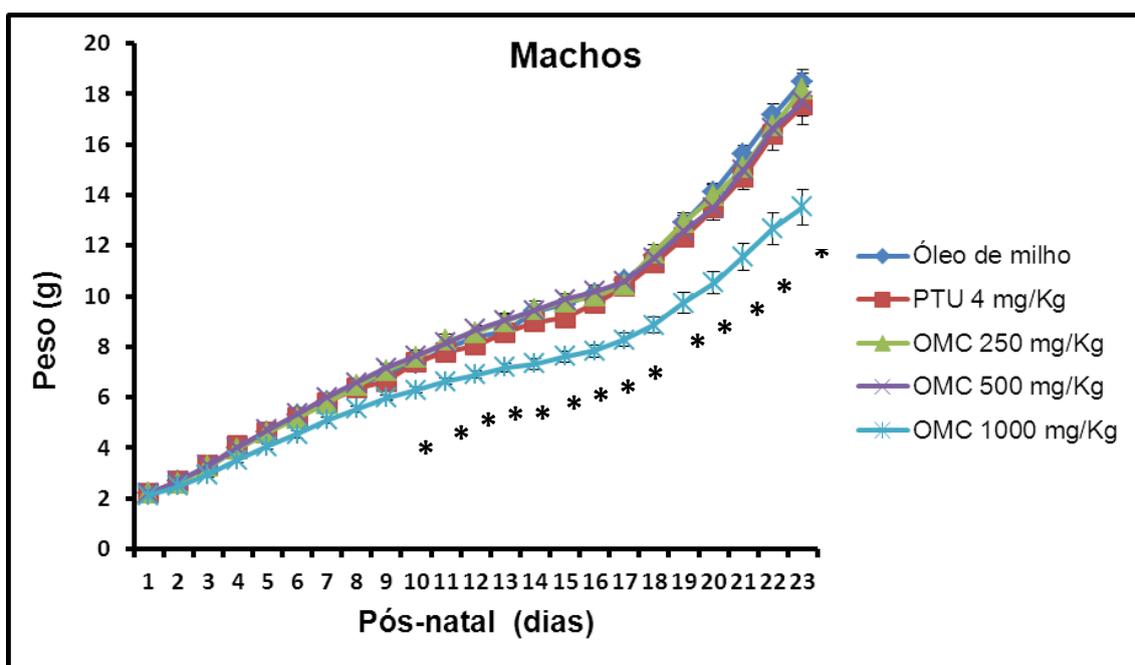


Gráfico 11- Ganho de peso durante o período lactacional de camundongos de ambos os sexos durante 18 dias de exposição ao OMC. Dados são mostrados como média \pm EPM do peso. Animais foram pesados diariamente. N mínimo = 17 por grupo por sexo. ANOVA mostrou que os animais do grupo OMC 1.000 mg/Kg de ambos os sexos apresentaram ganho de peso menor com relação ao grupo óleo de milho durante os 22 dias de administração para ambos os sexos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

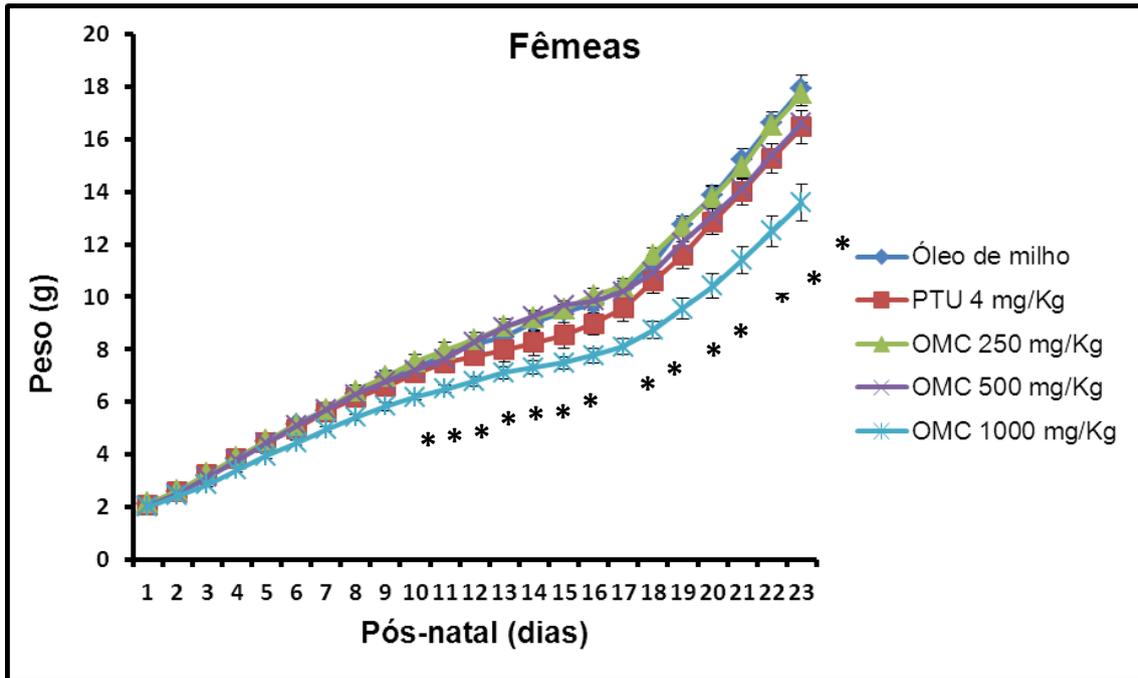


Gráfico 12 - Ganho de peso durante o período lactacional de camundongos de ambos os sexos durante 18 dias de exposição ao OMC. Dados são mostrados como média \pm EPM do peso. Animais foram pesados diariamente. N mínimo = 17 por grupo por sexo. ANOVA mostrou que os animais do grupo OMC 1.000 mg/Kg de ambos os sexos apresentaram ganho de peso menor com relação ao grupo óleo de milho durante os 22 dias de administração para ambos os sexos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.9 DOSAGEM HORMONAL

Este experimento foi realizado para confirmar se os achados anteriores de ganho de peso e abertura de olhos estavam correlacionados com a redução nos níveis séricos de T4 total nos animais expostos a 1.000 mg/Kg/dia de OMC. Como a maior dose de OMC foi capaz de induzir menor ganho de peso corporal dos camundongos de ambos os sexos bem como atraso na abertura de olhos, a dose de 1.000 mg/Kg/dia foi definida como dose padrão do filtro solar neste estudo.

Foi observada que a exposição indireta dos roedores via leite materno no período lactacional ao OMC desencadeou redução nos níveis séricos de tiroxina total comparado aos animais do grupo óleo de milho, o que é indicativo que os animais expostos ao filtro solar exibem um perfil de hipotiroxinemia (Gráfico 13). Os níveis de T4 total dos roedores do grupo OMC 1.000 mg/Kg/dia foram de aproximadamente 9 µg/dL, enquanto que os animais do grupo óleo de milho apresentaram níveis em cerca de 11 µg/dL. Uma redução de 19% nos níveis do hormônio tireoideano. Como já esperado, uma redução significativa também foi observada nos níveis séricos de tiroxina total do grupo PTU. O valor de T4 total foi de aproximadamente 8 µg/dL do grupo PTU comparado aos 11 µg/dL do grupo óleo de milho. Houve redução de cerca de 25 %.

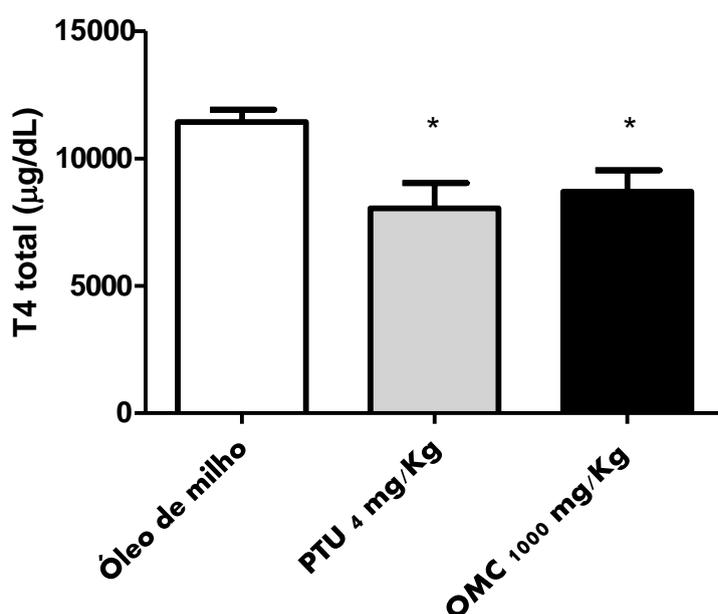


Gráfico 13. Dosagem hormonal de tiroxina (T4 total) de camundongos de ambos os sexos através de Kit EIA. Dados são mostrados como média \pm EPM de T4 total ($\mu\text{g/dL}$). N mínimo = 13 por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós teste Dunnett. p valor = 0,0133. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO OMC SOBRE ÓRGÃOS LINFÓIDES

Estas análises foram realizadas com a finalidade de investigar se a exposição indireta ao OMC por meio do leite materno, era capaz de gerar toxicidade sobre órgãos linfóides.

O peso relativo do baço do grupo OMC 1.000 mg/kg evidenciou um aumento significativo de cerca de 12,50% como mostra o gráfico 14A. Não foram observadas alterações significativas com relação ao grupo PTU. O registro de peso relativo do timo não evidenciou alterações significativas com relação a este parâmetro para nenhum dos grupos expostos como mostra o gráfico 14C. O registro de peso relativo dos linfonodos dos animais de ambos os sexos de todos os grupos não apresentou nenhuma alteração significativa com relação ao grupo óleo de milho como mostra o gráfico 14E.

O registro de celularidade relativa do baço não evidenciou nenhuma alteração em nenhum dos grupos expostos, de ambos os sexos, com relação ao óleo de milho como mostra o gráfico 14B. O registro de celularidade relativa do timo não evidenciou nenhuma alteração em nenhum dos grupos expostos de ambos os sexos com relação ao óleo de milho como mostra o gráfico 14D. O registro de celularidade relativa dos linfonodos não evidenciou nenhuma alteração em nenhum dos grupos expostos, de ambos os sexos, com relação ao óleo de milho como mostra o gráfico 14F.

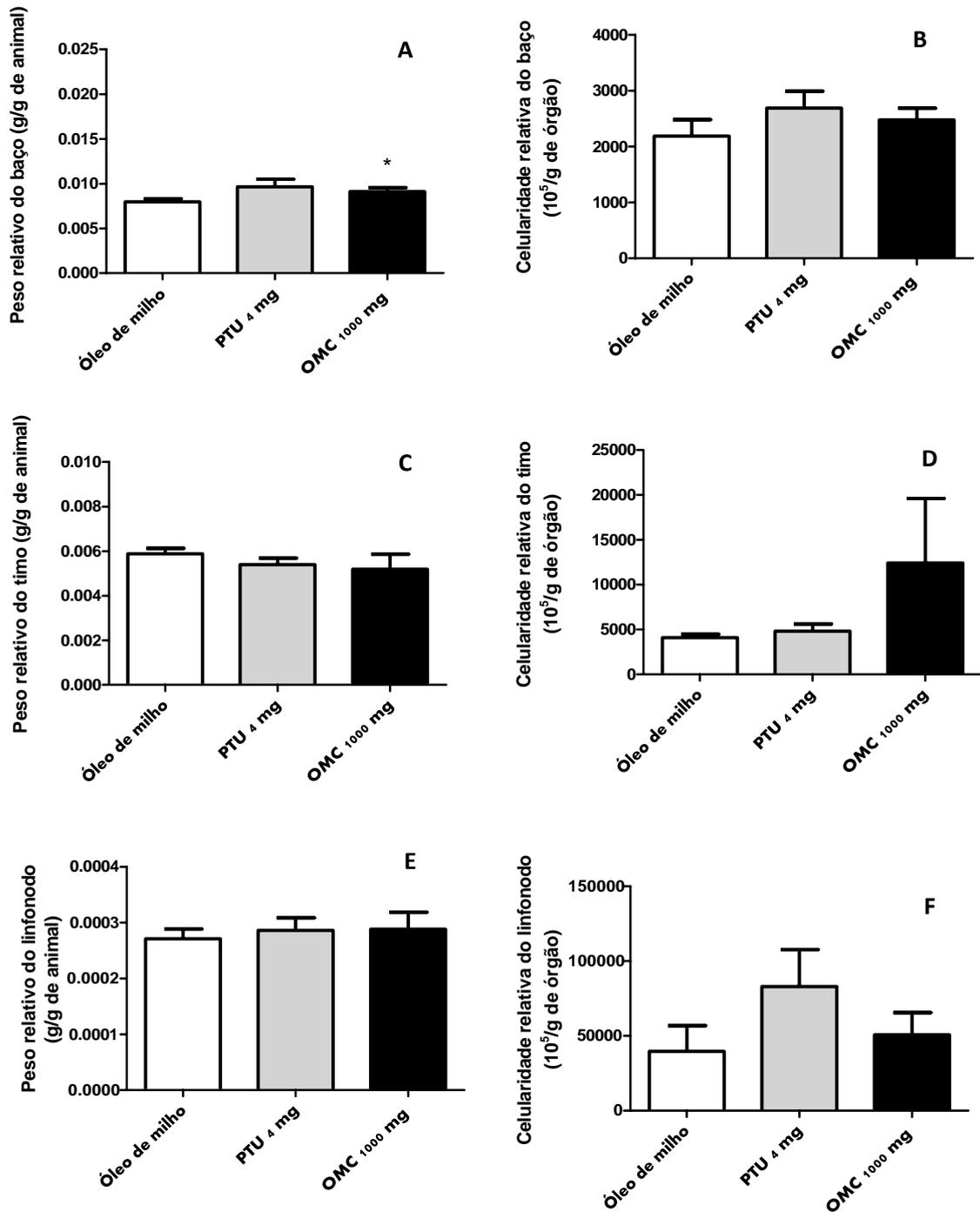


Gráfico 14 – Peso e celularidade relativas do baço, timo e linfonodos de camundongos no PN23 de ambos os sexos expostos às substâncias no período lactacional via leite materno. Dados são mostrados como média \pm EPM do peso do órgão. N mínimo = 26 por grupo para peso e celularidade relativas do baço e timo; N mínimo = 25 para peso relativo dos linfonodos e N mínimo = 9 para celularidade relativa dos linfonodos; A análise estatística empregada foi ANOVA seguido do pós-teste Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.11 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO OMC SOBRE SANGUE PERIFÉRICO

Este experimento foi realizado com o propósito de se avaliar a toxicidade do OMC via exposição indireta através do leite materno sobre o número de leucócitos totais bem como as subpopulações de células mononucleares e polimorfonucleares.

A contagem de leucócitos totais provenientes de sangue periférico aumentou significativamente no grupo PTU com relação ao grupo óleo de milho, cerca de 40%. Contudo, nenhuma alteração foi observada na contagem de leucócitos totais dos roedores expostos ao filtro solar OMC como mostra o gráfico 15A.

A contagem de células mononucleares totais não apresentou alterações estatisticamente significativas dos grupos expostos com relação ao grupo óleo de milho como mostra o gráfico 15B. Em correspondência ao resultado da contagem total de células mononucleares, a contagem de células polimorfonucleares totais também não apresentou alterações estatisticamente significativas dos grupos expostos com relação ao grupo óleo de milho como mostra o gráfico 15C.

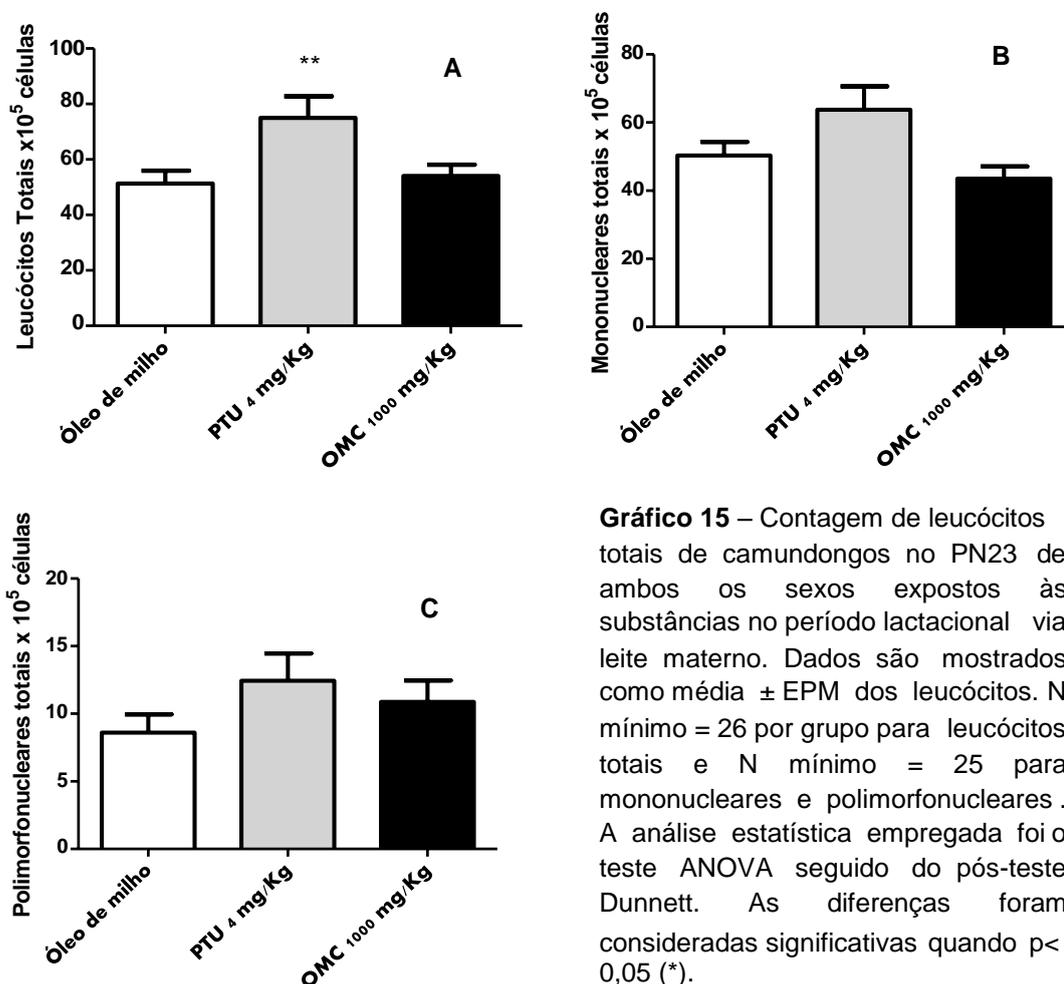


Gráfico 15 – Contagem de leucócitos totais de camundongos no PN23 de ambos os sexos expostos às substâncias no período lactacional via leite materno. Dados são mostrados como média \pm EPM dos leucócitos. N mínimo = 26 por grupo para leucócitos totais e N mínimo = 25 para mononucleares e polimorfonucleares. A análise estatística empregada foi o teste ANOVA seguido do pós-teste Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.12 EFEITOS DO OMC SOBRE OS LINFÓCITOS B E T

Este ensaio foi realizado com a finalidade de se investigar se a desregulação tireoideana induzida pela exposição indireta via leite materno ao OMC desencadeava alterações nos linfócitos B e T do baço dos camundongos.

Na citometria de fluxo do baço, a análise do número total de linfócitos B e T por grama de tecido não revelou alterações estatisticamente significativas dos grupos expostos com relação o grupo óleo de milho como mostra o gráfico 16.

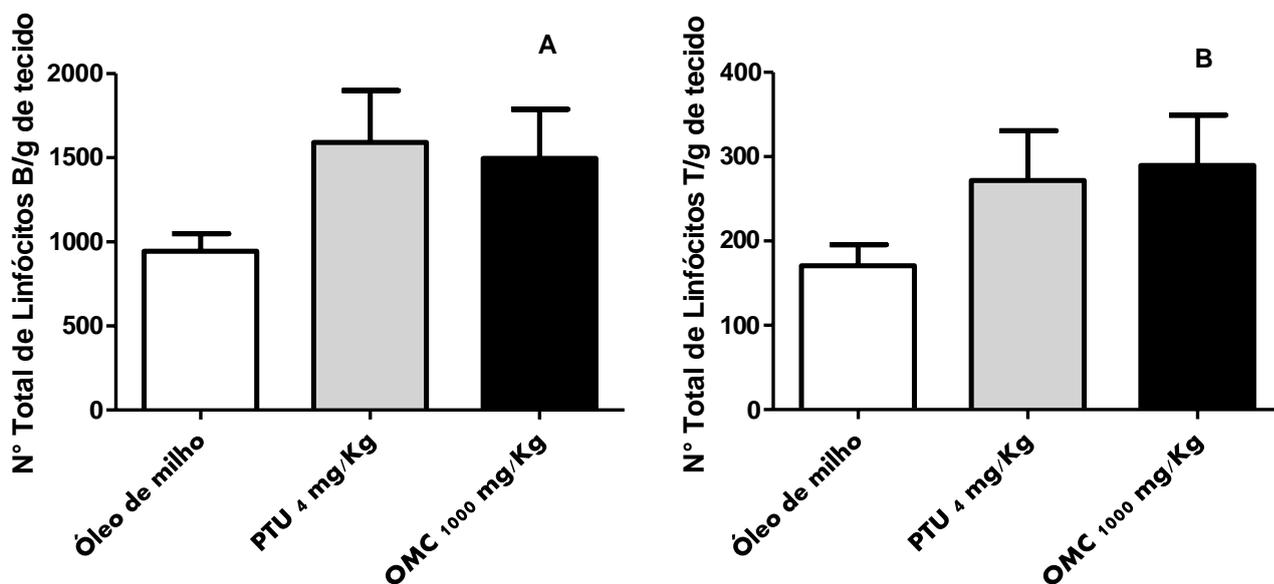


Gráfico 16 – A representa o Nº Total de Linfócitos B/g de tecido enquanto que B representa o Nº Total de Linfócitos T/g de tecido no baço de camundongos de ambos os sexos no PN23 expostos às substâncias no período lactacional via leite materno. Dados são mostrados como média \pm EPM dos linfócitos B ou T. N mínimo = 7 por grupo. A análise estatística empregada foi o teste ANOVA seguido do pós-teste Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.13 EFEITOS DO OMC SOBRE OS TIMÓCITOS

Este ensaio foi realizado com a finalidade de se investigar se a desregulação tireoideana induzida pela exposição indireta via leite materno ao OMC desencadeava alterações nos timócitos dos camundongos.

Na citometria de fluxo do timo, a análise do número total de timócitos estratificadas nas subpopulações duplo negativas ($CD4^-/CD8^-$) e duplo positivas ($CD4^+/CD8^+$), CD4 e CD8 não revelou alterações estatisticamente significativas dos grupos expostos com relação o grupo óleo de milho como mostra o gráfico 17.

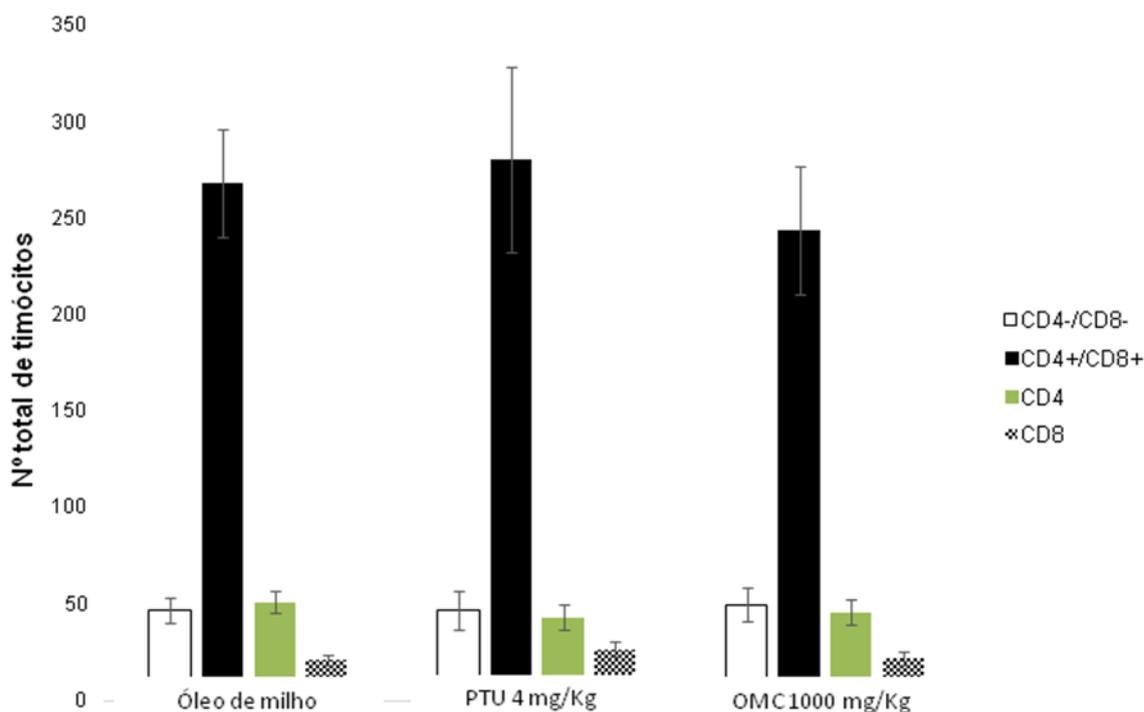


Gráfico 17 – N° total de timócitos no timo de camundongos de ambos os sexos no PN23 expostos às substâncias no período lactacional via leite materno. Dados são mostrados como média \pm EPM dos timócitos. N mínimo = 25 por grupo. A análise estatística empregada foi o teste ANOVA seguido do pós-teste Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

5.14 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Este experimento foi realizado com a finalidade de se investigar se a desregulação tireoideana induzida pela exposição indireta, via leite materno, ao OMC desencadeava citotoxicidade no baço dos camundongos.

A análise de viabilidade dos esplenócitos dos camundongos mostrou que o filtro solar OMC em nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de interferir significativamente com a viabilidade das células mononucleares das roedoras. As concentrações de 1, 10, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OMC apresentaram 100% de viabilidade celular como mostra o gráfico 18.

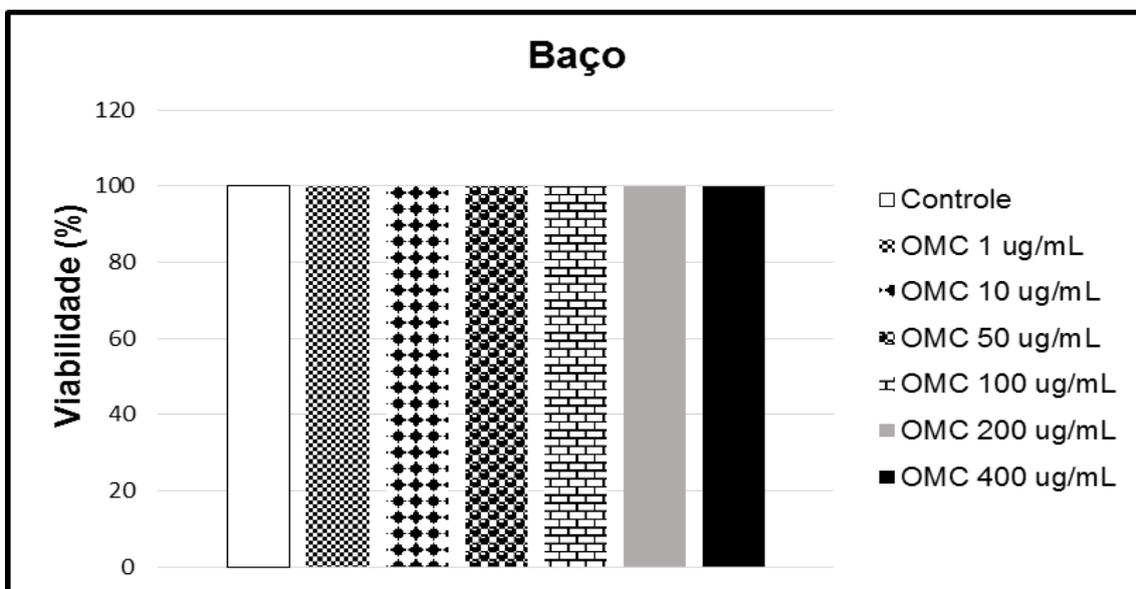


Gráfico 18 – Porcentagem de viabilidade de células mononucleares no baço de camundongos. O gráfico mostra o efeito das diversas concentrações do filtro solar OMC sobre a viabilidade celular em 48 horas de incubação. As barras foram representadas por média. O ensaio foi realizado uma única vez com um N = 4 por grupo.

5.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Uma vez que não observamos evidências de citotoxicidade no ensaio anterior, realizamos este experimento com a finalidade de investigar se a exposição indireta, via leite materno ao OMC, desencadeava alterações na atividade mitocondrial de linfócitos T.

O ensaio de atividade mitocondrial nos esplenócitos de camundongos evidenciou que o filtro solar OMC a partir da concentração de 10 µg/mL interfere substancialmente na atividade dos linfócitos T. A concentração de 10 µg/mL apresentou 76 Abs., a concentração de 100 µg/mL 6 Abs., e a de 200 µg/mL 4 Abs., mostrando assim uma relação dose-dependente da concentração de OMC para a atividade mitocondrial nos camundongos. O gráfico 19 ilustra de forma mais clara esses efeitos. Além disso, confirmamos esses resultados através de fotografias obtidas das células. As imagens da figura 15 ilustram o efeito das diversas concentrações do filtro solar OMC sobre a atividade mitocondrial de linfócitos T em 96 horas de incubação. As setas indicam maior quantidade de células formando “cachos” (região mais acastanhada). As imagens sem as setas (sem “cachos”) evidenciam uma quantidade menor de células em função da menor proliferação. As imagens foram realizadas com uma câmera com lente de 0,5x apropriada para microscópio biológico invertido com objetiva de 10x.

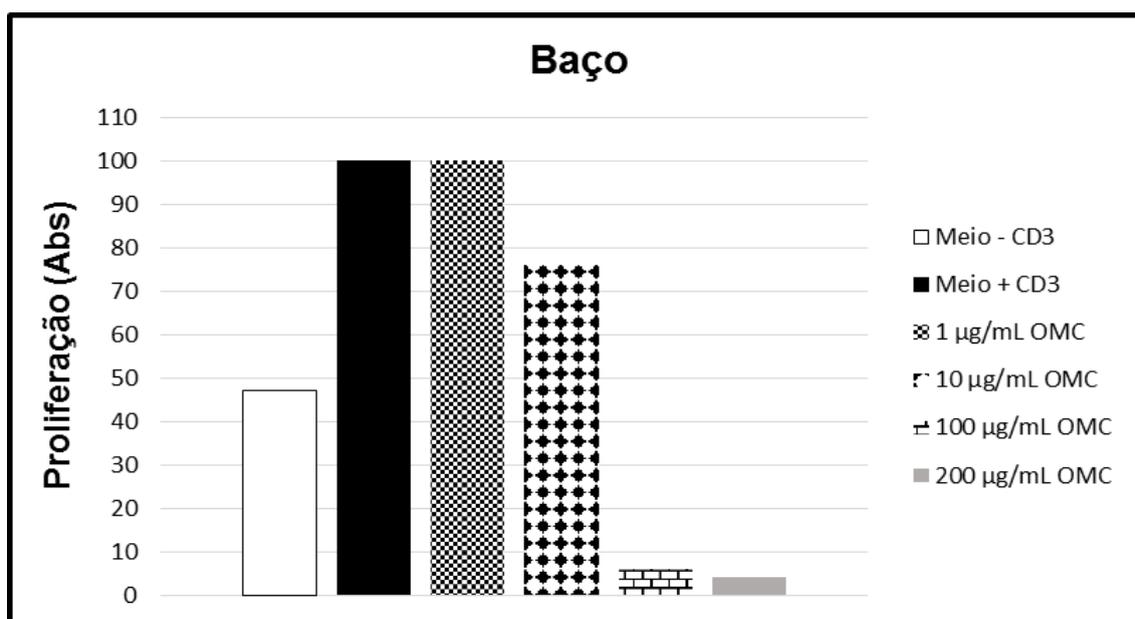
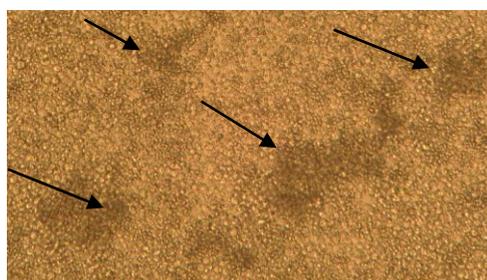


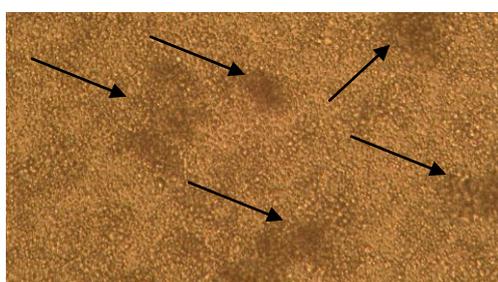
Gráfico 19 – Atividade mitocondrial de linfócitos T no baço de camundongos. O gráfico ⁹⁰ mostra o efeito das diversas concentrações do filtro solar OMC sobre a atividade mitocondrial de linfócitos T em 96 horas de incubação. As barras foram representadas por média. O ensaio foi realizado uma única vez com um N = 4 por grupo.



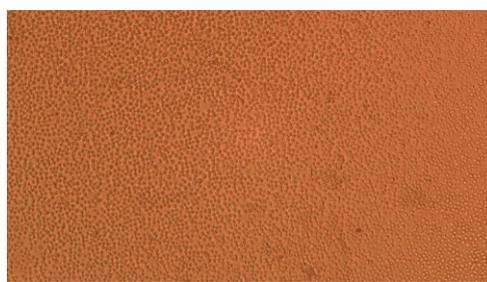
A: - ANTI CD3



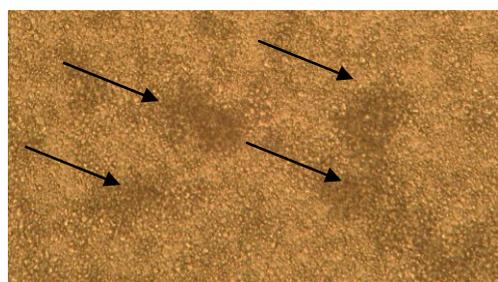
D: + ANTI CD3 com OMC 10 µg/mL



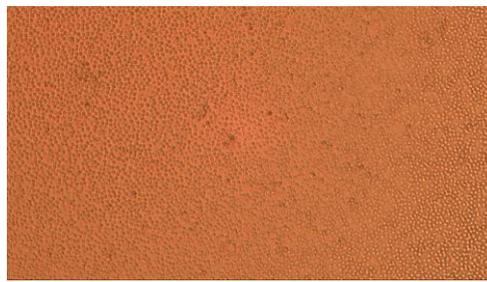
B: + ANTI CD3



E: + ANTI CD3 com OMC 100 µg/mL



C: + ANTI CD3 com OMC 1 µg/mL



F: + ANTI CD3 com OMC 200 µg/mL

Figura 15 – Ensaio de Atividade mitocondrial com células mononucleares do baço de camundongos fêmeas. A, representa células sem o anticorpo anti CD3; B, células com o anticorpo anti CD3; C, células com o anticorpo anti CD3 e OMC 1 µg/mL; D, células com o anticorpo anti CD3 e OMC 10 µg/mL; E, células com o anticorpo anti CD3 e OMC 100 µg/mL e F, células com o anticorpo anti CD3 e OMC 200 µg/mL. A imagem mostra o efeito das diversas concentrações do filtro solar OMC sobre a atividade mitocondrial de linfócitos T em 96 horas de incubação. O ensaio foi realizado uma única vez com um N = 4 por grupo.

5.16 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com base nas sugestivas evidências fornecidas pelo ensaio de atividade mitocondrial e visando compreender melhor o papel do hormônio tireoideano sobre a proliferação celular usando o T4 total como suplementação, realizamos este último experimento.

O ensaio de proliferação celular nos esplenócitos de camundongos machos evidenciou que o filtro solar OMC nas concentrações de 10 e 100 µg/mL diminuiu significativamente a proliferação dos linfócitos T. Quanto maior a concentração do filtro solar OMC, menor a proliferação, mostrando assim uma relação dose dependente da concentração de OMC para a proliferação celular. Contudo, a proliferação celular foi restabelecida de maneira significativa com suplementação de tiroxina total na concentração de 10⁻⁵ molar. Essa concentração foi usada para todas as células expostas às diversas concentrações de OMC. O gráfico 20 ilustra de forma mais clara tais efeitos.

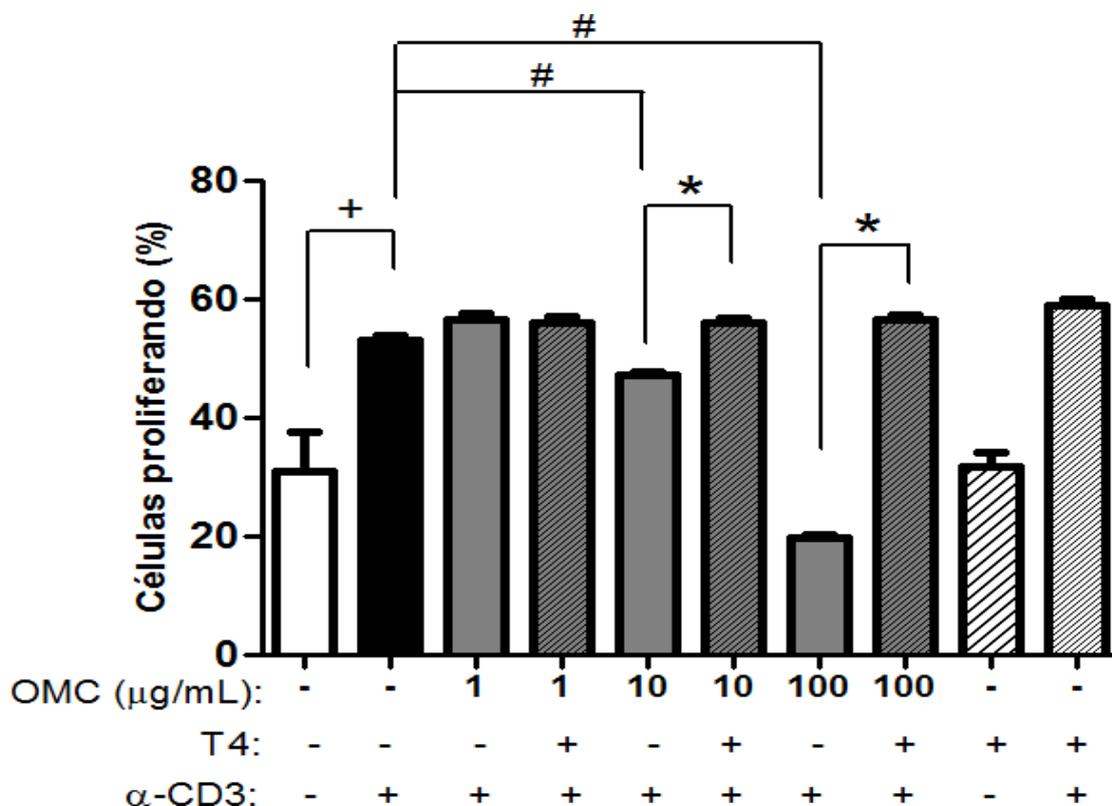


Gráfico 20 – Proliferação celular de linfócitos T *in vitro* no baço de camundongos com CFSE. O gráfico mostra o efeito das diversas concentrações do filtro solar OMC sobre a proliferação celular de linfócitos T em 72 horas de incubação. O ensaio foi realizado uma única vez. Dados são mostrados como média ± EPM das células proliferando. N mínimo = 3 por grupo. A análise estatística empregada foi o teste ANOVA seguido do pós-teste Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Como controle do ensaio foi realizada uma marcação do CFSE no dia zero do experimento. O histograma mostrado no gráfico 21 foi realizado na citometria de fluxo e evidenciou que a perda de CFSE foi proporcional à proliferação celular. Com o aumento da proliferação celular, ocorreu um deslocamento da curva para a esquerda. Fica evidente que com o aumento das concentrações de OMC deslocam essa curva para a direita. Contudo, a proliferação celular foi restabelecida de maneira significativa com suplementação de tiroxina total na concentração de 10^{-5} molar deslocando novamente a curva para a esquerda.

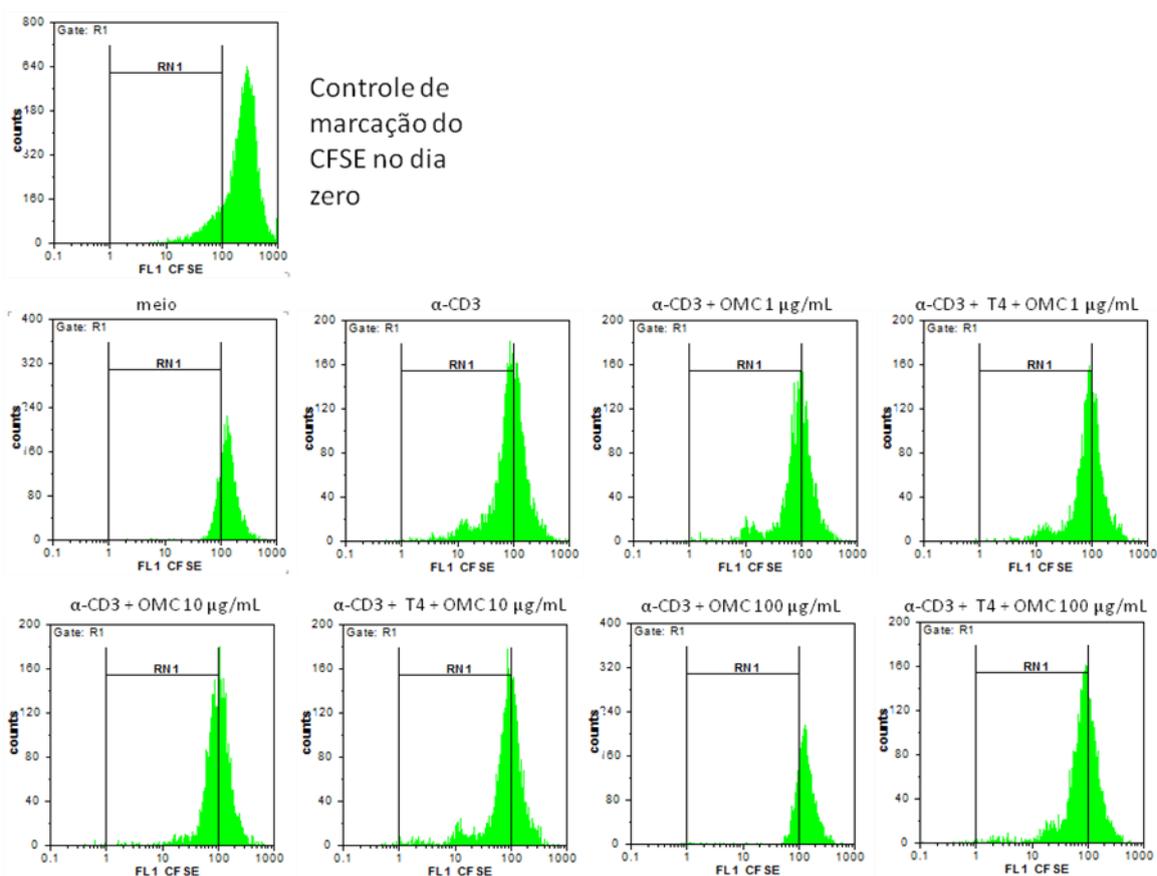


Gráfico 21 – Proliferação de linfócitos T *in vitro* baço de camundongos com CFSE. Os gráficos na forma de histograma realizados pelo citômetro mostram o efeito das diversas concentrações do filtro solar OMC sobre a proliferação celular de linfócitos T em 72 horas de incubação.

6 – DISCUSSÃO

Nossos experimentos com os roedores administrando o filtro UV OMC no período lactacional, tanto por via direta ou indiretamente através do leite materno, desencadearam atraso na abertura de olhos, menor ganho de peso e redução significativa nos níveis séricos de T4 total para ambas as espécies roedoras, evidenciando assim a desregulação tireoideana.

A administração direta do OMC gerou alguns efeitos hematológicos apenas nas fêmeas, uma vez que observamos menor número de leucócitos e plaquetas nas ratas. Os testes comportamentais evidenciaram algumas alterações importantes, tais como maior locomoção dos machos no teste do campo vazado. Além disso, o teste do labirinto aquático de Morris resultou em menor capacidade de aprendizagem durante a etapa de aquisição de memória para ambos os sexos, contudo não houve alterações significativas na etapa de avaliação de memória propriamente dita.

A administração indireta do OMC através do leite materno acarretou efeitos sobre o baço, aumentando significativamente seu peso relativo, evidenciando assim a toxicidade do filtro UV sobre órgãos linfoides.

Por fim, nossos ensaios *in vitro* revelaram que o OMC reduz atividade mitocondrial e proliferação celular. Além disso, evidenciamos que esta alteração na proliferação celular tem participação da tiroxina, hormônio chave nesse processo.

Em um primeiro momento, observamos que a literatura diverge muito em relação às doses mínimas necessárias para início de algum fenômeno tóxico por parte do OMC (SCHMUTZLER et al., 2004; SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2006; KLAMMER et al., 2007; AXELSTAD et al., 2011). Com o objetivo de se definir a dose a ser adotada em nosso estudo, bem como determinar os desfechos específicos de cada dose, avaliamos o percentual de sobrevivência dos animais que receberam o filtro solar em diferentes doses. Nossos resultados mostraram que apenas os animais da dose de 500 mg/kg/dia não foram a óbito.

Nossos dados demonstram que doses superiores a 500 mg/kg/dia são letais para os roedores, mas tal fato é evidente apenas para animais recém-nascidos, pois alguns trabalhos usando tais doses em ratos adultos, não apresentaram a letalidade

como desfecho. SCHNEIDER e colaboradores (2005) não observaram morte dos roedores com a administração de 1.000 mg/kg/dia de OMC, assim como KLAMMER e colaboradores (2007) usando a mesma dose e AXELSTAD e colaboradores (2011) com as doses de 750 e 1.000 mg/kg/dia. Isto sugere que os lactentes são mais vulneráveis ao OMC em doses superiores a 500 mg/kg/dia, uma vez que a letalidade é um indicativo de maior toxicidade para os roedores nesta idade. No entanto, não se sabe ao certo as causas para o efeito letal do OMC. Distúrbios na tireóide no período pós-natal poderiam explicar o percentual de sobrevivência, pois se a mortalidade estiver correlacionada com a carência dos hormônios tireoideanos, a suplementação dos mesmos evitaria a morte da prole, ou seja, T4 exerceria um efeito protetor. No entanto para confirmar tal hipótese é preciso realizar um estudo complementar suplementando com T4 total roedores expostos ao OMC para verificar se o mesmo é capaz de impedir a morte da prole.

Uma vez estabelecida a dose, e com o intuito de avaliar se a exposição ao OMC, administrado durante a lactação, causaria danos no desenvolvimento, observamos que o filtro solar foi capaz de atrasar significativamente o dia em que a maioria dos animais que compõem esse grupo abrem totalmente os dois olhos. Esse parâmetro é um marcador do neurodesenvolvimento muito empregado na literatura (GOTTESFELD e SILVERMAN, 1990). E, portanto ele é um indicativo de que alterações cerebrais podem ter ocorrido nestes roedores. O atraso no dia da abertura dos olhos provavelmente se deu em função do quadro de hipotiroxinemia induzido pela administração oral de OMC durante o período lactacional. EAYRS e colaboradores (1963) observaram que ao induzir um quadro de hipertiroxinemia em ratos com injeções de T3, era capaz de antecipar o dia em que esses roedores abriam os olhos, uma vez que os animais expostos ao hormônio tireoideano abriam os olhos precocemente quando comparados aos animais do grupo controle. Em contrapartida é esperado que animais com hipotiroxinemia abram os olhos mais tardiamente. Nossos dados estão de acordo com o que foi observado por (GOTTESFELD e SILVERMAN, 1990). Este grupo de pesquisa induziu o hipotireoidismo perinatal em filhotes através da administração de álcool etílico em ratas grávidas e puderam observar que a prole apresentou atraso na abertura de olhos. Para confirmar esta hipótese os filhotes receberam precocemente

suplementação com triiodotironina que reverteu o atraso na abertura de olhos induzido pelo quadro de hipotireoidismo.

Foi observado em nossos experimentos que a exposição da prole no período lactacional ao filtro solar OMC na dose escolhida, foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso com relação aos animais do grupo controle negativo. Este efeito provavelmente ocorreu em função da redução do T4 total, já que os hormônios tireoideanos têm papel chave para o crescimento e desenvolvimento ósseo. A redução do crescimento é uma consequência da hipotiroxinemia desenvolvimental já demonstrada na literatura (AKAIKE et al., 1991; KOBAYASHI et al., 2005; GILBERT & SUI., 2006 e NODA et al., 2005). Nossos dados estão de acordo com AXELSTAD e colaboradores (2011) que observaram que a administração de 500 mg/kg/dia de OMC por via oral em ratas Wistar do dia gestacional 6 ao pós-natal 17 gerou uma diminuição estatisticamente significativa no ganho de peso da prole em períodos específicos como no PN7 e no PN14. Embora a administração do OMC não tenha sido realizada diretamente na prole, e sim indiretamente através do leite materno, a interferência materna na transferência da substância para os filhotes pode ter sido um atenuante, uma vez que parte do filtro solar provavelmente foi metabolizada e/ou distribuída para outros tecidos da mãe segundo AXELSTAD e colaboradores (2011) e conseqüentemente minimizou os efeitos no ganho de peso dos filhotes o que torna os efeitos do nosso ensaio sobre a prole, mais severos, já que os mesmos receberam a substância diretamente sem a interferência materna no processo. Por outro lado, a exposição fetal pode também ter ocorrido, uma vez que a mãe começou a ser exposta a partir do GD7, levando a uma exposição mais prolongada da prole. Mas isso foi observado para os ratos. No nosso modelo com camundongos, observamos que o grupo OMC 1.000 mg/Kg/dia de ambos os sexos apresentou significativamente um menor ganho de peso com relação aos animais do grupo óleo de milho. E este resultado é convergente aos encontrados por AXELSTAD e colaboradores (2011), que indiretamente via leite materno observaram uma redução significativa no ganho de peso de filhotes amamentados por ratas Wistar que receberam OMC 500 mg/kg/dia por via oral durante 33 dias de exposição.

Nossos resultados demonstraram que a administração de OMC no período lactacional foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de T4 total, demonstrando assim que nossos dados estão de acordo com a literatura que tem apontado o OMC como um desregulador tireoideano. Foi o que observaram KLAMMER e colaboradores (2007) ao administrar 333 ou 1.000 mg/kg/dia de OMC durante 5 dias em ratas adultas ovariectomizadas bilateralmente. SEIDLOVÁ-WUTTKE e colaboradores (2006) observaram também redução de T4 total no mesmo modelo animal, porém administrando 50 mg a cada 20 g de ração ingerida pelas ratas durante 14 dias de exposição. SCHMUTZLER e colaboradores (2004) administrando a mesma dose de OMC só que por um período mais longo, 12 semanas, observaram o mesmo desfecho, pois os índices de T4 total foram significativamente menores frente aos animais do grupo controle negativo. Além desses, AXELSTAD e colaboradores (2011), usando um modelo mais semelhante com o que usamos em nosso experimento, ou seja, roedores que não sofreram intervenção cirúrgica (ovariectomização), no qual as mães receberam por via oral do GD7 ao PN17 o OMC nas doses de 500, 750 e 1.000 mg/kg/dia. Todas as doses foram capazes de diminuir significativamente os níveis séricos de T4 total tanto nas mães quanto na prole. Nossos dados em concordância com a literatura revelam o OMC como potencial desregulador endócrino, e usando a quantificação de T4 total como desfecho, um potencial desregulador do eixo tireoideano e que tanto a exposição direta quanto a indireta pode desencadear efeitos sobre a tireoide, especialmente para a prole.

A análise bioquímica no PN23 de ratos de ambos os sexos expostos ao filtro solar OMC não evidenciou alterações nos parâmetros investigados, sejam eles hepáticos, renais ou outros. Nossos resultados estão divergentes aos da literatura, uma vez que KLAMMER e colaboradores (2005) demonstraram uma redução significativa na dosagem sérica de glicose e colesterol de ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas bilateralmente com 3 meses de vida e expostas por cinco dias por via oral ao filtro solar OMC 1.000 mg/Kg/dia 74 dias após a intervenção cirúrgica. Muito provavelmente essa divergência se deve ao fato de usarmos um modelo de investigação mais próximo do subcrônico enquanto que o outro trabalho aqui citado realizou uma exposição aguda, fora o fato de nosso modelo não ter sofrido

intervenção cirúrgica, uma vez que a ovariectomia bilateral aumenta a susceptibilidade a alterações sistêmicas.

A análise hematológica no PN23 de ratos expostos ao filtro solar OMC evidenciou redução significativa no número de plaquetas apenas das fêmeas com relação aos animais do grupo óleo de milho. Nosso resultado corrobora o de Neto & Vaisman (2016) que mostraram que humanos com hipotireoidismo apresentam uma tendência a redução no número de plaquetas e redução na sua adesividade. Esta alteração provavelmente está envolvida com uma eritropoiese ineficiente ou reduzida. Nossos resultados sugerem uma possível alteração da funcionalidade da medula e desequilíbrio homeostático na hematopoiese induzida pela desregulação tireoidiana após a administração do filtro solar OMC.

Por fim os animais foram acompanhados no pós-desmame, mais especificamente na pré-puberdade para serem submetidos a testes comportamentais. Dentre eles, os roedores foram avaliados em testes de ansiedade. Estudos correlacionam distúrbios na glândula tireóide com estado comportamental de ansiedade e depressão (DEMET et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2009). Na tentativa de investigar alterações nesse processo, realizamos o teste comportamental do labirinto em cruz elevado em ratos na pré-puberdade (PN25) para verificar se os possíveis danos gerados na amamentação se refletiam nesta fase do desenvolvimento dos roedores expostos ao filtro solar OMC.

Nossos resultados demonstraram que a exposição dos ratos de ambos os sexos no período lactacional ao OMC não desencadeou efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos na pré-puberdade no teste comportamental do labirinto em cruz elevado. Contudo, foi observado que apenas os machos expostos ao PTU visitaram significativamente mais vezes os braços abertos evidenciando assim que o fármaco antitireoidiano em questão foi capaz de exercer um efeito ansiolítico sobre os ratos desse grupo.

Os animais naturalmente preferem ficar mais tempo nos braços fechados, local onde estão menos vulneráveis e se sentem mais seguros (PELLOW, et al., 1985). O teste em si revela um paradigma de esquiva e aproximação aos braços

abertos potencialmente vistos como perigosos, no entanto os machos que receberam o PTU entraram mais vezes nesses braços o que sugere que o PTU diminuiu a ansiedade dos ratos deste grupo. Tal comportamento observado do grupo PTU no teste de ansiedade possivelmente ocorreu em função da alteração na tireóide induzida durante amamentação ou por outro mecanismo.

Esses dados são conflitantes aos de DIAS e colaboradores (2012) que observaram que a exposição oral por 3 meses de ratas adultas ao metimazol, uma droga que assim como o PTU também é capaz de induzir o hipotireoidismo, reduziu significativamente o número de entradas nos braços fechados já no primeiro mês de administração das substâncias. Ou seja, o metimazol ao desencadear um quadro de hipotiroxinemia, se mostrou ansiolítico. É importante salientar que o efeito do hipotireoidismo induzido nos roedores submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado pode ser diferente dependendo da substância usada bem como a idade em que o teste foi executado (SALA-ROCA et al., 2002; REIS-LUNARDELLI et al., 2007). Contudo, a participação dos hormônios tireoideanos nesse processo tem caráter meramente especulativo, uma vez que não se realizou a reposição hormonal neste estudo a fim de verificar se a mesma reverteria tais alterações comportamentais.

Alguns trabalhos associam comprometimentos na glândula tireóide com hiperatividade (AXELSTAD et al., 2008). Com o intuito de checar alterações nesse processo, realizamos o teste comportamental do campo vazado em ratos no pós-desmame, mais especificamente na pré-puberdade para verificar se os possíveis danos gerados na amamentação se refletiam nesta fase do desenvolvimento dos roedores expostos ao filtro solar OMC.

Observamos em nossos experimentos que os animais expostos ao OMC no período lactacional, locomoviam-se mais do que os animais do grupo óleo de milho no teste do campo vazado. Isso ocorreu apenas nos machos. As fêmeas naturalmente são mais ativas que os machos, locomovendo-se mais no ambiente disponível. O maior deslocamento apenas dos machos do grupo OMC sugere então um perfil de hiperatividade que pode ter sido condicionado pela carência dos hormônios tireoideanos desencadeada durante a amamentação. No entanto, para

confirmar tal hipótese será preciso verificar através de um estudo complementar se a reposição com T4 total é capaz de reverter ou atenuar a hiperatividade dos roedores supostamente desencadeada pelo quadro de hipotiroxinemia induzido no período lactacional. Nossos resultados são conflitantes aos de AXELSTAD e colaboradores (2011) que observaram que ratos expostos ao OMC do dia GD7 ao PN17 nas doses de 500, 750 e 1.000 mg/kg/dia não exibiram um perfil de hiperatividade ao realizarem um teste de atividade locomotora em caixas com fotocélulas que registravam o deslocamento. O teste foi realizado em duas idades diferentes, PN63 e PN119. No pós-natal mais recente foi observado que os machos do grupo OMC não apresentavam diferenças significativas com relação aos controles enquanto que as fêmeas da dose de 750 e 1.000 mg/kg/dia eram mais hipoativas que as fêmeas do grupo controle. Já no PN119 foi observado que os machos OMC da dose de 750 mg/kg/dia locomoviam-se significativamente mais que os controles enquanto que as fêmeas apenas da dose de 1.000 mg/kg/dia eram mais hipoativas que as do grupo controle. Então nossos resultados estiveram de acordo apenas no PN119 na dose de 750 mg/kg/dia nos machos que apresentaram hiperatividade. No entanto é preciso levar em consideração que a dose administrada é maior que a que foi usada em nossos experimentos. A divergência entre nossos resultados pode ser explicada por outras variáveis como o tempo de execução do teste já que nossos ensaios foram realizados em 5 minutos por animal enquanto de AXELSTAD foi de 30 minutos. Além disso, o tempo de exposição e a forma de exposição, podem ter influenciado nos resultados, já que em nossos estudos a prole foi exposta diretamente ao OMC enquanto que no outro trabalho os filhotes foram expostos via materna. Outra variável importante a ser considerada é a idade dos animais ao serem submetidos ao teste. Em nossos ensaios os roedores foram submetidos ao teste do campo vazado no PN26 e nos de AXELSTAD e colaboradores (2011) no PN63 e PN119. Talvez tenhamos observado a hiperatividade por ter testado os animais em um período pós-natal que representa a pré-puberdade (PN26) enquanto o outro grupo de pesquisa realizou seus testes na puberdade (PN63) e na pós-puberdade (PN119). Talvez nessa fase do desenvolvimento (puberdade e pós-puberdade), os animais de alguma forma conseguiram se reestabelecer mascarando assim possíveis alterações neurocomportamentais que viessem a surgir evidenciadas por maior atividade

locomotora. Outro dado que é importante de se destacar é que os machos do grupo controle óleo de milho deslocam-se menos que as fêmeas do grupo controle óleo de milho exibindo um perfil comportamental comum já demonstrado na literatura (AXELSTAD et al., 2011).

Vários estudos têm direcionado o papel das desordens tireoidianas sobre aspectos cognitivos indicando principalmente que o hipotireoidismo desencadeia comprometimentos neurocomportamentais (ZOELLER & CROFTON, 2005). A fim de estudar esse processo, submetemos nossos ratos ao teste comportamental do labirinto aquático de Morris, usado para avaliar memória e aprendizagem. Neste modelo, observamos que durante a etapa de aquisição de memória, ou seja, nos quatro primeiros dias de teste, existiram diferenças significativas entre os machos do grupo controle e OMC no 4º dia de teste e nas fêmeas no 2º e 3º dia de teste. É importante salientar que ambos os grupos de exposição vieram diminuindo o tempo para encontrar a plataforma de escape ao longo dos dias de teste o que reforça ainda mais que o filtro solar em questão não inviabilizou a aquisição de memória espacial.

No 5º e último dia de teste não foram observadas diferenças significativas entre os animais do grupo OMC versus óleo de milho de ambos os sexos. Nesta etapa mesmo sem a plataforma foi possível observar que os roedores tanto do grupo OMC quanto do grupo óleo de milho nadavam no quadrante onde a plataforma de escape se situava nos quatro primeiros dias de teste. Entretanto, no 5º dia os animais do grupo PTU de ambos os sexos nadaram significativamente menos com relação ao óleo de milho no quadrante onde a plataforma de escape se situava. Isso evidenciou ainda mais que o PTU interfere com processos cognitivos e portanto é um controle positivo sensível e ideal para tal teste. A etapa de aquisição de memória se mostrou eficaz uma vez que no dia do teste propriamente dito (5º dia), os roedores tendiam a nadar em círculos no quadrante onde a plataforma se encontrava, buscando insistentemente a mesma. Ao que tudo indica o quadro de hipotiroxinemia induzido pelo OMC no período lactacional não foi severo o bastante para desencadear alterações cognitivas na pré-puberdade no grupo OMC diferente do grupo PTU. O que não quer dizer que essas alterações não existiram. Uma

hipótese é que os 5 dias de teste não foram suficientes para captar alterações neurocomportamentais. Portanto, a hipotiroxinemia induzida pelo OMC, bem como o tempo de avaliação estreito podem justificar o porquê de não termos observado alterações cognitivas no teste do labirinto aquático de Morris.

Uma análise importante a se fazer é a dosagem dos níveis séricos de T4 total dos roedores no dia em que eles são submetidos aos testes de memória propriamente dito (PN31). Essa avaliação revelará se a redução de T4 total observada no desmame (PN23) foi revertida ou permaneceu no momento em que os animais realizaram o teste do labirinto aquático de Morris. E através dessa análise, verificar se essa possível normalização dos níveis de T4 poderiam estar correlacionados com os resultados nos testes comportamentais. Essa informação é relevante, pois o resultado observado no teste do labirinto aquático de Morris pode ter ocorrido pelo fato de os animais terem se recuperado e conseqüentemente restabelecido a glândula tireóide. Se não, se a redução for persistente é possível sugerir que a hipotiroxinemia induzida pelo filtro solar não foi severa o suficiente para gerar alterações cognitivas no 5º dia de teste.

Esses achados divergem dos de AXELSTAD e colaboradores (2011) que observaram que a administração de OMC do GD7 ao PN17 foi capaz de melhorar a memória apenas dos machos das doses de 500 e 1.000 mg/kg/dia. O teste usado foi o labirinto radial por 21 dias, porém na vida adulta e nele foi observado que os machos do grupo OMC nas doses informadas realizavam menos erros que os animais do grupo controle negativo para cumprir a tarefa de encontrar e ingerir os reforços positivos espalhados no artefato. Talvez a sensibilidade e o tempo de avaliação dos animais foram determinantes para observar o favorecimento dos animais do grupo OMC no teste comportamental em questão. Contudo, outros trabalhos como os de AKAIKE e colaboradores (1991), AXELSTAD e colaboradores (2008) e NODA e colaboradores (2005) observaram que o hipotireoidismo induzido por uma droga antitireoidiana, propiltiouracil (PTU) era capaz de comprometer significativamente esses roedores em testes de memória e aprendizagem.

Nossos resultados também foram conflitantes aos de DIAZ e colaboradores (2012) que submeteram ratas fêmeas adultas por via oral ao metimazol por três

meses. O metimazol assim como o propiltiouracil é uma droga antitireoidiana e como tal é um controle positivo para o hipotireoidismo. Foi observado que no 3º mês de realização do teste do labirinto aquático de Morris, as ratas com hipotireoidismo ficavam menos tempo no quadrante onde a plataforma de escape se encontrava durante a etapa de aquisição. Já na etapa de aquisição de memória não houve diferenças significativas entre os grupos de exposição. Esses resultados são concordantes com diferentes modelos animais que correlacionam o hipotireoidismo com disfunções cognitivas (TONG et al., 2007; WILCOXON et al., 2007; REIS-LUNARDELLI et al., 2007).

Após checarmos os diversos desfechos específicos desencadeados pela administração direta do OMC em ratos filhotes no período lactacional, surgiu o questionamento de que o filtro solar em questão também poderia promover alterações na prole indiretamente através do leite materno, uma vez que dados na literatura já evidenciaram a presença do OMC em amostras de leite materno humano. Para checar essas alterações, camundongos foram usados como modelo, pois é logisticamente mais simples o isolamento de seus órgãos para estudos do sistema imunológico bem como a presença de anticorpos disponíveis no mercado para essa espécie.

Com o intuito de avaliar se a exposição ao OMC, administrado durante a lactação, causaria danos no desenvolvimento, observamos que o filtro solar OMC na maior dose em nosso estudo, 1.000 mg/Kg/dia, foi capaz de atrasar significativamente o dia em que a maioria dos animais que compõem esse grupo abriam totalmente os dois olhos. Além disso, esse parâmetro do desenvolvimento teve papel chave na escolha da dose de OMC a ser usada em experimentos futuros. Esse parâmetro é um marcador do neurodesenvolvimento muito empregado na literatura (GOTTESFELD & SILVERMAN., 1990). E, portanto ele é um indicativo de que alterações cerebrais podem ter ocorrido nestes camundongos. O atraso no dia da abertura dos olhos provavelmente se deu em função do quadro de hipotiroxinemia induzido pela administração oral de OMC durante o período lactacional. Nossos resultados corroboram os dados de GOLDEY e colaboradores (1995) que ao administrarem 1, 5 ou 25 ppm de PTU na água de beber em ratas

grávidas do dia gestacional 18 ao 21, observaram atraso na abertura de olhos da prole que foi correlacionado a redução sérica nos níveis de T3 e T4 evidenciados nos dias pós-natal 1, 7, 14 e 21 neste estudo.

Além disso, também foi observado em nossos experimentos que a exposição da prole no período lactacional ao filtro solar OMC na dose de 1.000 mg/Kg/dia, foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso com relação aos animais do grupo óleo de milho. Resultado consistente ao do atraso na abertura de olhos só observado na maior dose do estudo. O menor ganho de peso provavelmente ocorreu em função da redução do T4 total, já que os hormônios tireoideanos têm papel chave para o crescimento e desenvolvimento ósseo. A redução do crescimento é uma consequência da hipotiroxinemia desenvolvimental já demonstrada na literatura (AKAIKE et al., 1991; KOBAYASHI et al., 2005; GILBERT & SUI., 2006 e NODA et al., 2005). Nossos achados foram convergentes aos de GOLDEY e colaboradores (1995) que administraram 1, 4 ou 8 mg/Kg/dia de Bifenilas Policloradas por via oral em ratas Long Evans grávidas do dia gestacional 6 ao dia pós natal 21. As bifenilas são poluentes orgânicos persistentes de característica oleosa usadas como isolantes elétricos em transformadores de energia. Embora não sejam filtros UV, estas substâncias já foram demonstradas como desreguladores tireoideanos e estas alterações já foram correlacionadas a déficits no desenvolvimento de roedores. Estes autores reportaram um ganho de peso significativamente menor dos filhotes expostos às bifenilas com relação aos ratos do grupo controle. Tal efeito foi observado para os filhotes de ambos os sexos durante o período lactacional (GOLDEY et al., 1995).

Em função de termos encontrado resultados estatisticamente significativos apenas na dose de 1.000 mg/kg/dia nos parâmetros desenvolvimentais de abertura de olhos e ganho de peso, a maior dose de OMC foi adotada para investigação de outros parâmetros em nossos ensaios. É importante ressaltar que estes resultados mimetizaram os mesmos achados encontrados com os ensaios envolvendo ratos, porém através de uma exposição indireta por meio do leite materno. Essa informação é fundamental, pois filtros UV já foram reportados no leite materno humano o que favorece ainda mais a extrapolação desse modelo. Esses resultados

revelam o ineditismo do nosso trabalho uma vez que os estudos até então publicados não abordam duas espécies roedoras, com vias de exposição direta e indireta por um mesmo grupo de pesquisa, envolvendo uma mesma janela do desenvolvimento, com animais de ambos os sexos e que não sofreram intervenção cirúrgica tal como a ovariectomia.

Nossos resultados demonstraram que a administração de 1.000 mg/kg/dia de OMC bem como o PTU no período lactacional foram capazes de reduzir significativamente os níveis séricos de T4 total da prole indiretamente exposta, demonstrando assim que nossos dados estão de acordo com a literatura que tem apontado o OMC como um desregulador tireoideano. Nossos resultados corroboram os dados de KLAMMER e colaboradores (2007) que administraram OMC nas doses de 333 ou 1.000 mg/Kg/dia por via oral durante 5 dias em ratas adultas ovariectomizadas bilateralmente. Esse grupo de pesquisa realizou um trabalho mecanístico vasto envolvendo múltiplas vias. Neste estudo foram observadas reduções significativas nos níveis séricos de T3 e T4 total e aumento no hormônio tireoestimulante (TSH) na pituitária caracterizando assim um quadro de hipotireoidismo. As alterações hormonais foram encontradas tanto nas mães quanto na prole e se manifestaram de maneira dose dependente. Não houve alterações no hormônio de liberação da tireotrofina (TRH) no hipotálamo. Níveis normais foram encontrados também ao checarem na tireóide a tireoperoxidase (TPO), enzima chave para conversão do íon iodeto em iodo, matéria-prima indispensável para síntese do hormônio tireoideano. Realizaram também uma avaliação da bomba de cotransporte dos íons sódio e iodeto, essencial para o funcionamento adequado da glândula tireoide, contudo nenhuma alteração foi encontrada. Por fim, investigaram no fígado dos roedores a atividade da enzima deiodase do tipo I, responsável por converter tiroxina (T4) em triiodotironina (T3) que é o hormônio ativo propriamente dito. Nesta avaliação foi reportado uma redução na deiodase hepática do tipo I que pode impactar nos HT e conseqüentemente no funcionamento adequado do eixo tireoideano como um todo. Portanto, nossos dados corroboram os resultados reportados em outros trabalhos evidenciando assim a desregulação tireoideana induzida também pela administração indireta do OMC no período lactacional.

Com relação à resposta imunológica, os hormônios e neurotransmissores exercem papel chave na regulação homeostática da imunidade. Contudo, a correlação entre o sistema imune e a glândula tireóide não é muito explorada na literatura em indivíduos saudáveis. Os achados focam-se essencialmente no estudo de populações clinicamente afetadas por distúrbios na glândula tireóide (PALMBLAD et al., 1981; NAKANISHI et al., 1991; COVAS et al., 1992; MARIOTTI et al., 1992; KRETOWSKI et al., 1999; BOSSOWSKI et al., 2003). No entanto FABRIS e colaboradores (1995) já observaram que os HT participam na linfopoiese primária e secundária. Portanto observamos os efeitos desencadeados pela desregulação tireoidiana induzida pelo OMC sobre o sistema imune, visando confrontar nossos resultados com estudos que demonstram essa relação dos HT's sobre os órgãos linfoides. Para isso após o fim da exposição dos animais ao OMC no PN23, os mesmos foram eutanasiados e procedemos com a avaliação do peso relativo do baço desses camundongos, obtendo com isso a informação de que a exposição ao OMC 1.000 mg/kg/dia aumentou significativamente o peso relativo do baço com relação aos roedores do grupo óleo de milho. É importante salientar que o baço é um órgão com papel chave tanto imunológico quanto hematológico. Constituído por duas polpas, uma branca, formada por tecido linfoide responsável pela síntese e o armazenamento dos linfócitos e uma polpa vermelha, local onde os eritrócitos defeituosos e mais maduros são lisados além de liberar na circulação sanguínea células de defesa quando necessário. Em função disso, toxicidade induzida pelo OMC sobre esse órgão linfoide potencialmente pode acarretar deficiências no controle tanto do equilíbrio imunológico quanto hematológico afetando diretamente a homeostase corpórea dos expostos ao filtro UV em questão. Nossos resultados estão em desacordo com CANO-EUROPA e colaboradores (2011) que observaram que ratos com hipotireoidismo induzido por metimazol apresentaram uma redução significativa no peso relativo do baço. Uma possível explicação para tal fato é que foi observado que os animais com hipotireoidismo apresentaram aumento no índice apoptótico e na expressão da caspase 3, enzima também envolvida no processo de apoptose. Portanto o aumento do processo de morte celular por apoptose poderia justificar a diminuição do peso relativo do baço.

Uma questão importante a ser ressaltada é que as caspases são ativadas por vários mediadores químicos, inclusive os hormônios tireoideanos (HERMESH et al., 2000). Logo a indução da hipotiroxinemia pela exposição ao OMC supostamente poderia a vir interferir na expressão dessa enzima e conseqüentemente na morte celular por apoptose que explicaria a redução do peso do baço encontrada por este grupo de pesquisa.

Diferente do observado com o timo, não encontramos alteração significativa no peso relativo do timo do grupo quando comparado aos animais do grupo óleo de milho. O timo é uma glândula endócrina principalmente envolvido com a síntese de linfócitos T que atuam contra agentes infecciosos. Os linfócitos após serem produzidos no timo e maturarem, migram para o baço. Outro papel importante do timo é evitar o crescimento anormal das células regulando-as. Esse crescimento anormal pode acarretar câncer. Portanto, a exposição ao OMC se desencadeasse alguma alteração nesse órgão linfoide, potencialmente tornaria os expostos susceptíveis a patógenos e a problemas de maior gravidade como o câncer (DACIE et AL., 1995). Nossos resultados divergiram aos de JOHNSON e colaboradores (2012) que observaram que ratos adultos tireoidectomizados apresentavam redução significativa do peso relativo do timo 60 dias após o procedimento. A hipótese para tal alteração, é que a redução dos HT interfere com os níveis dos corticoides, que são capazes de promover ações no timo, através dos receptores de glicocorticoides, que estão expressos neste órgão. Estudos mostram que o tratamento de roedores com corticosterona ou elevados níveis de glicocorticoides resultam na atrofia do timo por estimularem a apoptose (KARATSOREOS et al., 2010).

Além da avaliação do peso dos órgãos, realizamos a contagem total de células para verificar se o OMC interfere na quantidade de células presentes no órgão. Não observamos alterações significativas no número de células do baço dos animais do grupo OMC quando comparados aos do grupo óleo de milho. Esses dados são conflitantes aos de WINDNILL e colaboradores (1998) que observaram que roedores castrados e conseqüentemente mais susceptíveis a danos na tireóide apresentaram um aumento no número de linfócitos B justificado por um provável aumento na linfopoese B na medula óssea. A estratificação na contagem das células

do órgão linfóide secundário ofereceria um panorama mais confiável sobre alterações em populações celulares específicas.

Assim como foi observado em relação ao baço, nossos resultados não apresentaram alterações significativas no número de células do timo dos animais do grupo OMC quando comparados aos do grupo óleo de milho. Estudos demonstram que o aumento nas concentrações dos hormônios sexuais acarreta alterações na celularidade do timo justamente por indução da morte celular por apoptose dos timócitos (MCMURRAY et al., 2000). É sabido que o filtro solar OMC apresenta atividade estrogênica demonstrada por SCHLUMPF e colaboradores (2004), que embora não tenha sido o foco do nosso trabalho, explicaria alterações na contagem de células do timo que não encontramos no nosso estudo.

Além disso, a administração indireta de OMC na dose de 1.000 mg/Kg/dia no período lactacional não alterou a contagem de leucócitos totais com relação aos camundongos do grupo óleo de milho, contudo PTU aumentou significativamente o número de leucócitos totais. Esse efeito do PTU pode ser justificado provavelmente por conta de sua ação sobre a medula óssea dos filhotes por interferência com a homeostase da granulopoiese. Também não foram observadas alterações estatisticamente significativas com relação a contagem de células mononucleares e polimorfonucleares.

Uma outra avaliação preditiva de grande importância que realizamos em nossos estudos foi a análise de células do baço e do timo utilizando a Citometria de Fluxo (CF) e adotando os camundongos como modelo em nossa pesquisa.

A CF é uma técnica que através de um laser emite um feixe de luz sobre células conseguindo por meio de detectores informações sobre as características dessas células, tais como tamanho, granulosidade e fluorescência. A CF vem sendo utilizada como uma ferramenta confiável para diagnóstico precoce de doenças, tais como as autoimunes, verificar a rejeição de órgãos em indivíduos transplantados, bem como para o prognóstico de pacientes acometidos por algumas desordens imunológicas. Por conta disso a análise da proporção dos subtipos de linfócitos tem

sido muito utilizada uma vez que ela revela o status imunológico de indivíduos e roedores expostos a agentes potencialmente tóxicos (CARVALHO, 2012).

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas com relação a contagem de linfócitos B e T no baço nem tampouco com relação ao número de timócitos no timo dos camundongos expostos ao OMC. Contudo essa avaliação foi de suma importância, uma vez que flutuações nessas populações nos forneceria informações sobre o estado imunológico destes animais, essencialmente a redução dessas células indicaria falta de imunocompetência frente a agentes infecciosos enquanto a elevação sinaliza para maior propensão à doenças autoimunes.

Além da análise da citometria de fluxo, outro ensaio realizado foi o de citotoxicidade. O ensaio de citotoxicidade é de suma importância, pois ele avalia a capacidade intrínseca de um material em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular. Com o estabelecimento de uma gama de linhagens animais e humanas, pôde-se testar uma série de produtos, desde drogas e material plástico, com intuito de avaliar o potencial de citotoxicidade. A utilização de culturas de células *in vitro* torna-se cada vez mais uma prática comum nos laboratórios de controle de qualidade. Testes *in vitro* vêm substituindo os ensaios *in vivo*, principalmente pelo seu custo reduzido, alta reprodutibilidade, facilidade de realização e demanda sustentável do mercado consumidor (BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO).

No ensaio de citotoxicidade, a análise de viabilidade dos esplenócitos dos camundongos mostrou que o filtro solar OMC em nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de interferir significativamente com a viabilidade das células mononucleares dos roedores. As concentrações de 1, 10, 50, 100, 200 e 400 µg/mL de OMC apresentaram 100% de viabilidade celular evidenciando assim que a princípio o OMC não apresenta toxicidade para as células mononucleares.

Em seguida, complementar ao ensaio de citotoxicidade, realizamos o ensaio de atividade mitocondrial com células do baço de camundongos suíços. Esse experimento foi realizado para confirmar os resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade, porém com uma população mais específica, ou seja, linfócitos T, já que no ensaio de citotoxicidade usamos células mononucleares (linfócitos e monócitos).

O ensaio de atividade mitocondrial com MTT nos esplenócitos de camundongos evidenciou que o filtro solar OMC a partir da concentração de 10 µg/mL interfere substancialmente na atividade dos linfócitos T estimulados através do anticorpo anti CD3. A concentração de 10 µg/mL apresentou 76 Abs de atividade, a concentração de 100 µg/mL 6 Abs., e a de 200 µg/mL 4 Abs., mostrando assim uma relação dose dependente da concentração de OMC para atividade dos roedores. Nossos resultados corroboram os dados de (BRONIOWSKA et al., 2016) que incubaram células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) por 72 horas com benzofenona 3, metilbenzilideno cânfora ou OMC nas concentrações de 10^{-5} ou 10^{-4} molar. O ensaio foi revelado com MTT e foi observado que a concentração de 10^{-4} molar foi citotóxica para as células nervosas em todos os filtros testados. Embora o tipo celular e a espécie tenham sido diferentes dos nossos ensaios, o resultado revela a toxicidade do OMC também para células humanas que é importante de ser salientado.

É preciso destacar que o ensaio de atividade mitocondrial fornece um dado indicativo de proliferação celular, contudo precisa ser verificado pois pode se tratar de um falso positivo, uma vez que a célula pode estar com elevada atividade mitocondrial o que não condiz efetivamente com um estado de proliferação celular, assim como a contrapartida também é verdadeira, pois a célula pode estar em baixa atividade mitocondrial, no entanto proliferando-se eficientemente.

Em função das evidências sugestivas no ensaio de atividade mitocondrial, realizamos o ensaio de proliferação celular com o CFSE. Como esse marcador cora todos os linfócitos, os resultados são mais confiáveis que os ensaios de atividade mitocondrial com MTT. O CFSE é um reagente que prontamente se difunde dentro das células ligando-se covalentemente às aminas intracelulares e emitindo uma fluorescência. A medida em que ocorre a proliferação celular, essa fluorescência vai diminuindo, uma vez que o reagente CFSE começa a ser dividido também com as novas células geradas.

O CFSE marca todos os linfócitos independentemente de sua cinética de divisão evitando uma das principais desvantagens dos marcadores de DNA e marcadores de atividade mitocondrial (ASQUITH et AL., 2006). Com isso, utilizando-se do CFSE, a probabilidade dos resultados não estarem refletindo a realidade em casos de falso positivo e falso negativos é minimizada.

O ensaio de proliferação celular visa testar a atividade biológica de um determinado composto, seja ele orgânico ou inorgânico, avaliando a sua capacidade de inibir o crescimento de células. Este ensaio geralmente é uma das primeiras etapas para avaliar a ação dos diversos produtos naturais, candidatos a novas drogas antitumorais, dentre outros (ALBERT et al., 2004).

No ensaio com o CFSE, nossos resultados demonstraram que o OMC reduziu a proliferação celular nas concentrações de 10 e 100 µg/mL. Tal efeito parece ter sido mediado pela participação de hormônio tireoideano, uma vez que a suplementação com tiroxina 10^{-5} molar às células expostas ao OMC foi capaz de restabelecer significativamente a proliferação celular. A função dos hormônios tireoideanos e dos receptores dos hormônios tireoideanos na proliferação celular ou diferenciação não é homogênea. A resposta das células aos hormônios tireoideanos depende fortemente do tipo celular, do estado desenvolvimental, ou seja, trata-se de uma célula progenitora ou diferenciada, do estado patofisiológico, isto é, célula tumoral ou sadia e por fim, ao contexto celular. O balanço entre a proliferação celular e a diferenciação celular é de suma importância para o controle da homeostase tecidual (KRESS et al., 2009).

Nossos resultados corroboram os dados de RACHÓN e colaboradores (2006), que observaram uma redução na proliferação de esplenócitos de camundongos machos da linhagem C57BL6 tratados com diversas concentrações de OMC (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} molar) comparados aos esplenócitos que receberam apenas o controle negativo dimetilsulfóxido. Neste estudo foi observado que o OMC na concentração de 10^{-5} , a maior utilizada, foi capaz de reduzir significativamente a proliferação celular dos esplenócitos.

Algumas hipóteses podem justificar nossos achados. Dentre elas, o antagonismo competitivo ocasionado pela similaridade estrutural existente entre o OMC com os hormônios tireoideanos. Como as moléculas são semelhantes, o OMC liga-se no sítio de ligação dos HT impedindo que esses exerçam seus efeitos gerando como consequência redução da proliferação celular. Uma vez que o hormônio é ofertado, outros sítios podem ser acessados por este restabelecendo assim a proliferação celular observada em nossos resultados. A outra hipótese diz respeito ao antagonismo fisiológico ou funcional, que na verdade seria explicado pelo fato do OMC agir nos receptores dos hormônios tireoideanos como agonista, contudo exercendo efeitos fisiológicos totalmente opostos que a tiroxina, por exemplo, exerceria (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Portanto, diante da escassez de dados a cerca do OMC na literatura e em função de seu uso abundante, é necessário fomentar mais estudos para compreender melhor a complexidade dos fenômenos engatilhados pela exposição ao filtro solar em questão, sejam eles de forma direta ou indiretamente via leite materno durante uma importante janela do neurodesenvolvimento que é o período lactacional, mas que ainda é pouco estudada.

7 – CONCLUSÃO

Nosso trabalho evidenciou o potencial tóxico do OMC para neonatos expostos direta e indiretamente por via oral, que podem sofrer alterações de desenvolvimento e de comportamento, distúrbios hematopoiéticos e da resposta imunológica potencialmente correlacionados a desregulação tireoideana.

Alguns prejuízos ocasionados em função da exposição ao OMC podem ser atraso no desenvolvimento, déficits cognitivos, hiperatividade e susceptibilidade a infecções, tais como vírus, bactérias, fungos e helmintos

O OMC é um dos 27 filtros UV listados e aprovados para uso em formulações cosméticas nos E.U.A e na Europa. Contudo, diante das diversas evidências demonstradas em nossos estudos e reportados por outros grupos de pesquisa, surge o questionamento sobre a necessidade de restrições com relação ao seu uso para alguns indivíduos, em especial lactantes e infantes devido a sua maior vulnerabilidade.

Ainda não está claro e completamente elucidado o mecanismo de ação do OMC. Portanto, mais estudos são necessários para esclarecer os fenômenos e desfechos desencadeados pela exposição a este filtro solar ao qual estamos amplamente expostos.

REFERÊNCIAS

ABEDIN, S.; MICHEL, J.; LEMSTER, B.; VALLEJO, A. Diversity of the NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. **Experimental Gerontology**. 40 537–548, 2005.

AKAIKE, M., KATO, N., OHNO, H. and KOBAYASHI, T. Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. **Neurotoxicology and Teratology**, v.13, p. 317-322, 1991.

ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula. **Artmed**. v.4, p. 235-331, 2004.

ANDERSON, GW.; SCHOONOVER, CM.; JONES, SA. Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. **Thyroid**. 13(11):1039-56, 2003.

ARLT, W.; HEWISON, M. Hormones and immune function: implications of aging. **Aging Cell**. 3: 209-216, 2004.

ASQUIT, B.; DEBACQ, C.; FLORINS, A.; GILLET, N.; ALCARAZ-SANCHEZ, T.; MOSLEY, A.; WILLEMS, L. Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE). **Proceedings of the Royal society B**. v. 273 p. 1165-1171, 2006.

AXELSTAD, M., HANSEN, P. R., BOBERG, J., BONNICHSEN, M., NELLEMAN, C., LUND, S. P., HOUGAARD, K. S. and HASS, U. Developmental neurotoxicity of propylthiouracil (PTU) in rats: relationship between transient hypothyroxinemia during development and long-lasting behavioral and functional changes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 232, p.1-13, 2008.

AXELSTAD, M., BOBERG, J., HOUGAARD, K. S., CHRISTIANSEN, S., JACOBSEN, P. R., MANDRUP, K. R., NELLEMAN, C., LUND, S. P. and HASS, U. Effects of pre and postnatal exposure to the uv-filter octyl metoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, p. 278-290, 2011.

BALOGH, TS.; VELASCO, MVR.; PEDRIALI, CA.; KANEKO, TM.; BABY, AR. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An Bras Dermatol**. 86 (4):732 – 742, 2011.

BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO. **Ensaio de Potencial de Citotoxicidade in vitro**. Disponível em: <<http://bcrj.org.br/servico/testes-de-citotoxicidade>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

BARCA, MF; KNOBEL, M.; TOMIMORI, E.; CARDIA, MS.; MEDEIROS-NETO, G. Prevalence and characteristics of postpartum thyroid dysfunction in São Paulo, Brazil. **Clinical Endocrinology**. v. 53, p. 21-31, 2000.

BELLINGER, D.; THYAGARAJAN, S.; LORTON, D.; MADDAN, K.; TRAN, L.; FELTEN D. Psychoneuroimmunology today: mechanisms mediating the effects of psychological status on the immune system. **In The Psychoimmunology of Cancer**, 2 edn, pp 4–62. Eds C Lewis, RO'Brien & J Barraclough. Oxford: Oxford University Press. 2002.

BONGERS-SCHOKKING, JJ. Pre- and postnatal brain development in neonates with congenital hypothyroidism. **J Pediatr Endocrinol Metab**. 14:1463–1468, 2001.

BOYAGES, SC. The neuromuscular system and brain in thyrotoxicosis. In: Braverman LE, Utiger RD (eds) Werner and Ingbar's **The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text**, 8th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 631–633, 2000.

BOSSOWSKI, A.; URBAN, M.; STASIAK-BARMUTA, A. Analysis of changes in the percentage of B (CD19) and T (CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory (CD45RO), and naive (CD45RA) T cells in children with immune and non-immune thyroid diseases. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**. 16: 63–70, 2003.

BRONIOWSKA, Z.; POMIERNY, B.; SMAGA, I.; FILIP, M.; BUDZISZEWSKA, B.; T. The effect of UV-filters on the viability of neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. **Neurotoxicology**. V. 54, p. 44-52, 2016.

BUYUKGEBIZ, A. Congenital hypothyroidism clinical aspects and late consequences. **Pediatr Endocrinol Rev**. Suppl 2: 185-90, 2003.

BUSER, HR.; BALMER, ME.; SCHMID, P.; KOHLER, M. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. **Environ. Sci. Technol**. 40:1427 – 1431, 2006.

CABRAL, LDS.; PEREIRA, SO.; PARTATA, AK. Filtros solares e Fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Revista Científica do ITPAC**. 3 (4):1-10, 2011.

CALAFAT, AM.; WONG, LY.; YE, X.; REIDY, JA.; NEEDHAM, LL. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. **Environ Health Perspect**. 116:893 – 897, 2008.

CANO-EUROPA, E., BLAS-VALDIVIA, V., FRANCO-COLIN, M. and GALLARDO-CASAS, C. A. Methimazole-induced hypothyroidism causes cellular damage in the spleen, heart, liver, lung and kidney. **Acta histochemical**, v. 113, p.1-5, 2011.

CARVALHO, JBJ. Citometria de fluxo: aplicabilidade em Ginecologia e Obstetrícia. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 69, p. 10, 2012.

CHROUSOS, G. The stress response and immune function: clinical implications. In Neuroimmunomodulation – perspectives at the new millennium. **Ann N Y Acad Sci.** 917: 38- 67, 2000.

CLINICAL TEXT, 8th ed. Lippincott Williams and Wilkins, **Philadelphia**, pp. 673–678. 2000.

COVAS, MI.; ESQUERDA, A.; GARCIA-RICO, A.; MAHY, N. Peripheral blood T-lymphocyte subsets in autoimmune thyroid disease. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology.** 2 :131–135, 1992.

DACIE, JV.; LEWIS SM. Pratical Haematology 8° Edition. **Churchill Livingstone**, 1995.

DARNERUD, PO. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. **Environ Int.** 29:841-53, 2003.

DEMET, MM.; OZMEN, B.; DEVECI, A.; BOYVADA, S.; ADIGÜZEL, H.; AYDEMIR O. Depression and anxiety in hyperthyroidism. **Arch. Med. Res.** 33:552-556, 2002.

DIAS, GR.; VIEIRA, FA.; DOBRACHINSKI, F.; BRIDI JC.; BALK Rde S.; SOARES, FA.; NOGUEIRA CW.; BARBOSA NB. Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. **Int. Journal Dev. Neurosci.** 30(2): 83-89, 2012.

DIVI, RL.; CHANG, HC.; DOERGE, DR. Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. **Biochem Pharmacol.** 54:1087-1096, 1997.

EAYRS, J. T. Effect of neonatal hyperthyroidism on maturation and learning in the rat. **Animal behavior**, v. 1, p. 195-199, 1963.

FABRIS, N.; MOCCHEGIANI, E.; PROVINCIALI, M. Pituitary–thyroid axis and immune system: a reciprocal neuroendocrine–immune interaction. **Hormone Research** 43 29–38, 1995.

FELIX, T.; HALL, B.J.; BRODBELT, J.S. Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC–MS. **Anal. Chim. Acta.** 371: 195-203, 1998.

FELTEN, DL. & FELTEN, SY. The innervation of lymphoid tissue. In *Psychoneuroimmunology*, 2 edn, pp 27–69. Eds, R.; Ader, DL.; Felten & N Cohen. New York: **Academic press**. 1991.

FENT, K.; ZENKER, A.; Rapp, M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. **Environ Pollut.** 158:1817 – 1824, 2010.

FERRARIS, F.K., et al. Gedunin, a natural tetranortriterpenoid, modulates T lymphocyte responses and ameliorates established allergic airway inflammation. **International Immunopharmacology.** 14(1): 82-93, 2012.

GAGO-FERRERO, P.; DIAZ-CRUZ, MS.; BARCELÓ D. Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants. **Chemosphere** 84:1158 – 1165, 2011.

GELBKE, HP.; KAYSER, M.; POOLE, A. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. **Toxicology.** 205:17 – 25, 2004.

GILBERT, M.E. and SUI, L. Dose-dependent reductions in spatial learning and synaptic function in the dentate gyrus of adult rats following developmental thyroid hormone insufficiency. **Brain Research**, v. 1069, p. 10-22, 2006.

GOLDEY, ES.; KEHN, LS; LAU, C.; REHNBERG, GL.; CROFTON, KM. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 135, p. 77-88, 1995.

GOLDEY, ES.; KEHN, LS; LAU, C.; REHNBERG, GL.; CROFTON, KM. Effects of developmental hypothyroidism on auditory and motor function in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 135(1), p. 67-76, 1995.

GOLDMAN, JM. Postpartum thyroid dysfunction. **Archives of internal medicine**. V. 146, p. 1296-1299, 1986.

GOODMAN, SL.; GILMAN, GA.; As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12. ed. Porto Alegre – RS: **AMGH**; 2012.

GOTTESFELD, Z. and SILVERMAN, P. B. Developmental delays associated with prenatal alcohol exposure are reversed by thyroid hormone treatment. **Neurosci. Lett.**, v. 109, p. 42-47, 1990.

GUIMARÃES, JM.; DE SOUZA LOPES, C.; BAIMA, J.; SICHIERI, R. Depression symptoms and hypothyroidism in a population-based study of middle-aged Brazilian women. **J. Affect. Disord.** 117:120-3, 2009.

HAYDEN, CG.; ROBERTS, MS.; BENSON, HA. Systemic absorption of sunscreen after topical application. **Lancet**. 20;350(9081):863-4, 1997.

HERMESH, O., KALDERN, B., BERMAN, B. and BAR-TANAJ Mitochondrial protonophoric activity induced by a thyromimetic fatty acid analogue. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1457, p. 166-174, 2000.

HEYERDAHL, S.; KASE, BF.; LIE, SO. Intellectual development in children with congenital hypothyroidism in relation to recommended thyroxine treatment. **J Pediatr.** 118:850–857, 1991.

HODKINSON, CF.; SIMPSON, EE.; BEATTIE, JH.; O'CONNOR, JM.; CAMPBELL, DJ.; STRAIN, JJ.; WALLACE, JM. Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55-70 years. **J Endocrinol.** 202(1):55-63, 2009.

JANJUA, NR.; MOGENSEN, B.; ANDERSSON, AM.; PETERSEN, JH.; HENRIKSEN, M.; SKAKKEBAEK, NE.; WULF, HC. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methylbenzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **The Journal of Investigative Dermatology.** 123:57-61, 2004.

JARA, LJ.; NAVARRO C.; MEDINA G.; VERA-LASTRA, O.; BLANCO, F.; Immune-neuroendocrine interactions and autoimmune diseases. **Clin. Dev. Immunol.** 13 (2-4): 109-123, 2006.

JOHNSON, E. O., CALOGERO, A. E., KONSTANDI, M., KAMILARIS, T. M., VIGNERA, S. L. and CHROUSOS, G. P. Effects of short- and long-duration hypothyroidism on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in rats: In vitro and in situ studies. **Endocrine**, v. 42, p. 684-693, 2012.

KARATSOREOS, I. N., BHAGAT, S. M., BOWLES, N. P., WEIL, A. M., PFAFF, D. W. and MCEWEN, B. S. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterona: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. **Endocrinology**, v. 151, p. 2117-2127, 2010.

KLAMMER, H.; SCHLECHT, C.; WUTTKE, W.; SCHMUTZLER, C.; GOTTHARDT, I.; KOHRLE, J.; JARRY, H. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-

methoxycinnamate (OMC) on the function of hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. **Toxicology**. 238:192 – 199, 2007.

KLECHA, AJ.; GENARO, AM.; GORELIK, G.; BARREIRO ARCOS, ML.; SILBERMAN, DM.; SCHUMAN, M.; GARCIA, SI.; PIROLA, C.; CREMASCHI, GA. Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. **J Endocrinol**. 189(1):45-55, 2006.

KLECHA, AJ.; GENARO, AM.; LYSIONEK, AE.; CARO, RA.; COLUCCIA, AG.; CREMASCHI, GA. Experimental evidence pointing to the bidirectional interaction between the immune system and the thyroid axis. **International Journal of Immunopharmacology**. 22 491–500, 2000.

KLEIN, JR. The immune system as a regulator of thyroid hormone activity. **Experimental Biology and Medicine**. 231 229–236, 2006.

KLEIN, RZ.; MITCHELL, ML. Maternal hypothyroidism and child development. **A review. Horm Res**. 52:55–59, 1999.

KOBAYASHI, K., TSUJI, R., YOSHIOKA, T., KUSHIDA, M., YABUSHITA, S., SASAKI, M., MINO, T. and SEKI, T. Effects of hypothyroidism induced by perinatal exposure to PTU on rat behavior and synaptic gene expression. **Toxicology**, v. 212, p. 135-147, 2005.

KOPELMAN, AE. Delayed cerebral development in twins with congenital hyperthyroidism. **Am J Dis Child** 137:842–845, 1983.

KRAUSE, M.; KLIT, A.; BLOMBERG JENSEN, M.; SOEBORG, T.; FREDERIKSEN, H.; SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; SKAKKEBAEK, NE.; DRZEWIECKI, KT. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **International Journal of Andrology**. 35:424 – 436, 2012.

KRESS, E.; SAMARUT, J.; PLATEROTI, M. Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: Paradox or duality? **Molecular and Cellular Endocrinology**. 313:36-49, 2009.

KRETOWSKI, A.; MYSLIWIEC, J.; TUROSWKI, D.; WYSOCKA, J.; KINALSKA, I. Analysis of recently activated, memory and naive lymphocyte T subsets in the peripheral blood of patients with Graves' disease and insulin-dependent diabetes mellitus. **Roczniki Akademii Medycznej Białymstoku**. 44: 226–234, 1999.

LADICS GS. Use of SRBC antibody responses for immunotoxicity testing. **Methods**. 41(1):9-19, 2007.

LEON, Z.; CHISVERT, A.; TARAZONA, I.; SALVADOR, A. Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. **Anal Bional Chem**. 398:831 – 843, 2010.

MADEIRA, MD. & PAULA-BARBOSA, MM. Reorganization of Mossy Fiber Synapses in Male and Female Hypothyroid Rats: A Stereological Study. **The Journal of Comparative Neurology** 337:334 – 352, 1993.

MARIOTTI, S.; CATUREGLI, P.; BARBESINO, G.; MARINO, M.; DEL PRETE, GF.; CHIOVATO, L.; TONACCHERA, M.; DECARLI, M.; PINCHERA, A. Thyroid function and thyroid autoimmunity independently modulate serum concentration of soluble interleukin 2 (IL-2) receptor (sIL-2R) in thyroid diseases. **Clinical Endocrinology**. 37: 415–422, 1992.

MCMURRAY, R. W., WILSON, J. G., BIGLER, L., XIANG, L. and LAGOO, A. Progesterone inhibits glucocorticoid-induced murine thymocyte apoptosis. **Int. Immunophar.**, v. 22, p. 955-965, 2000.

MILLER, RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. **Progress in Neurobiology**. 67(6):451-67, 2002.

MOCCHEGIANI, E. & MALAVOLTA, M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. **Aging Cell**. 3: 117–184, 2004.

MONHAPHOL, T.; YIBCHOK-ANUN, S.; BANLUNARA, W.; WITTAYASUPORN, M.; PALAGA, T.; ASAWANONDA, P.; WANICHWEACHARUNGRUANG, S. Cytotoxicity, Acute Oral Toxicity, and Skin Irritation of 2-ethylhexyl-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 31, p. 289-301, 2008.

MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGON MJ.; ESCOBAR DEL REY, F. Fetal and maternal thyroid hormones. **Horm Res** 26(1-4): 12-27, 1987.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1984.

MIYAKE, S. & YAMAMURA, T. NKTcells and autoimmune diseases: unraveling the complexity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 314: 251–267, 2007.

NAGTEGAAL, T A.; TERNES, W.; BAUMANN, R.; NAGEL. UWSF-Z. UV filtersubstanzen in wasser und fischen. UWSF-Z. **Umweltchem ökotox** 9, 79–86. *Umweltchem. Ökotox.* 9, 79, 1997.

NAKANISHI, K.; TANIGUCHI, Y.; OHTA, Y. Increased soluble interleukin 2 receptor levels in autoimmune thyroid disease. **Acta Endocrinologica**. 125: 253–258, 1991.

NETO, L.V. & VAISMAN, M. Como diagnosticar e tratar o hipotireoidismo. **Revista Brasileira de Medicina**. 117-125, 2017.

NOLAN, NA. & PARKES, MW. The effects of benzodiazepines on the behavior of mice on a hole-board. **Psychopharmacology** 29:277 – 286, 1973.

NODA, S., MUROI, T., TAKAKURA, S., SAKAMOTO, S., TAKATSUKI, M., YAMASAKI, K., TATEYAMA, S. and YAMAGUCHI, R. Preliminary evaluation of an in utero-lactation assay using 6-n-propyl-2-thiouracil. **Archives of Toxicology**, v. 79, p. 414-421, 2005.

OWENS, W.; ZEIGER, E.; WALKER, M.; ASHBY, J.; ONYON, L.; GRAY, LE JR. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. **Environ Health Perspect.** 114(8):1259-65, 2006.

PALMBLAD, J.; ADAMSON, U.; ROSEENQVIST, U.; UDEN, AM.; VENIZELOS, N. Neutrophil function in hypothyroid patients. **Acta Medica Scandinavica.** 210 287–291, 1981.

PAOLISSO, G.; BARBIERI, M.; BONAFE, M.; FRANCESCHI, C. Metabolic age modelling: the lesson from centenarians. **European Journal of Clinical Investigation.** 30: 888–894, 2000.

PASSOS, MCF.; RAMOS, CF.; DUTRA, SCP.; MOURA, EG. Transfer of iodine through the milk in protein-restricted lactating rats. **J Nutr Bioch.** 5:300 – 303, 2001.

PINTO, WBVR.; GUI MIKO.; VALERO-LAPCHIK, VB.; ARIZA, CB.; PORCIONATTO, M. Test Elevated Plus Maze: applications and contributions to the study of animal disease models in neurology and psychiatry disorders. **Resbcial** 1:102 – 120, 2012.

RACHON, D.; RIMOLDI, G.; WUTTKE, W. In vitro effects of benzophenone-2 and Octyl-Methoxycinnamate on the Production of Interferon- γ and Interleukin-10 by

Murine Splenocytes. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 28, p. 501-510, 2006.

REIS-LUNARDELLI, E. A., CASTRO, C. C. and BAVARESCO, C. Effects of thyroid hormones on memory and on Na⁺, K⁺ -ATPase activity in rat brain. **Curr. Neurovasc. Res.**, v. 4, p. 184-193, 2007.

RIVAS, M. & NARANJO JR. Thyroid hormones, learning and memory. **Genes Brain Behav** 6 Suppl 1: 40-4, 2007.

ROVET, J.; DANEMAN, D. Congenital hypothyroidism: A review of current diagnostic and treatment practices in relation to neuropsychologic outcome. **Paediatr Drugs**. 5:141–149, 2003.

SAFE, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**. 1;205(1-2):3-10, 2004.

SCHLUMPF, M.; COTTON, B; CONSCIENCE, M.; HALLER, V.; STEINMANN, B.; LICHTENSTEIGER, W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. **Environ Health Perspectives** v. 109, p. 239-244, 2001.

SCHLUMPF, M., SCHMID, P., DURRER, S., CONSCIENCE, M., MAERKEL, K., HENSELER, M., GRUETTER, M. HERZOG, I., REOLON, S., CECCATELLI, R., FAASS, O., STUTZ, E., JARRY, H., WUTTKE, W. and LICHTENSTEIGER, W. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update. **Toxicology** v. 205, p. 113-122, 2004.

SCHLUMPF, M.; BERGER, B.; COTTON, B.; CONSCIENCE-EGLI, S.; DURRER I.; FLEISCHMANN, V.; HALLER, K.; MAERKEL, W.; LICHTENSTEIGER, W. Endocrine active UV-filters: Developmental toxicity and exposure through breast milk. **Chimia**. 62:345 – 351, 2008.

SCHMUTZLER, C., HAMANN, I., HOFMANN, P. J., KOVACS, G., STEMMLER, L., MENTRUP, B., SCHOMBURG, L., AMBRUGGER, P., GRÜTERS, A., SEIDLOVA-WUTTKE, D., JARRY, H., WUTTKE, W. and KÖHRLE, J. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. **Toxicology**, v. 205, p. 95-102, 2004.

SCHNEIDER, S.; DECKARDT, K.; HELLWIG, J.; KUTTLER, K.; MELLERT, W.; SCHULTE, S.; VAN RAVENZWAAY, B. Octyl methoxycinnamate: Two generation reproduction toxicity in wistar rats by dietary administration. **Food and Chemical Toxicology**. 43:1083–1092, 2005.

SCHREURS, R.; LANSER, P.; SEINEN, W.; VAN DER BURG, B. Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. **Archives of Toxicology**. v.76, p. 257-261, 2002.

SCHUUR, AG.; BROUWER, A.; BERGMAN, A.; COUGHTRIE, MW.; VISSER, TJ. Inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. **Chem-Biol Interact**. 109:293-297, 1998.

SEIDLOVÁ-WUTTKE, D.; CHRISTOFFEL, J.; RIMOLDI, G.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1;214(1):1-7, 2006.

STRAUB, RH.; BESEDOVSKY, HO. Integrated evolutionary, immunological, and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. **FASEB J**. 17: 2176-2183, 2003.

TONG, H., CHEN, G. H. and LIU, R. Y. Age-related learning and memory impairments in adult-onset hypothyroidism in kunming mice. **Physiol. Behav.**, v. 91, p. 290-298, 2007.

WHYBROW, PC.; BAUER, M. Behavioral and psychiatric aspects of thyrotoxicosis. In: Braverman LE, Utiger RD (eds) Werner and Ingbal's **The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text**, Edição 9. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, p. 857-863, 2005.

WILCOXON, J. S., NADOLSKI, G. J. and SAMARUT, J. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor α . **Behav. Brain Res.**, v. 177, p. 109-116, 2007.

WILSON, AG.; THAKE, DC.; HEYDENS, WE.; BREWSTER, DW.; HOTZ, KJ. Mode of action of thyroid tumor formation in the male Long-Evans rat administered high doses of alachlor. **Fundam Appl Toxicol.** 33:16-23, 1996.

WINDINILL, K. F. and LEE, V. W. K. Effects of castration on lymphocytes of thymus, spleen and lymph nodes. **Tissue Cell.**, v. 30, p. 104-111, 1998.

YE, X.; KUKLENYIK, Z.; NEEDHAM, LL.; CALAFAT, AM. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hidroxy-4-methoxybenzofenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** 383:638 – 644, 2005.

YIN, Y.; QIN, J.; DAI, Y.; ZENG, F.; PEI, H.; WANG, J. The CD4+/CD8+ Ratio in Pulmonary Tuberculosis: Systematic and Meta-Analysis Article. **Iranian Journal of Public Health.** V. 44, p. 185-193, 2015.

ZOELLER, T. R. and CROFTON, K. M. Mode of action: developmental thyroid hormone insufficiency-neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, p. 771-781, 2005.