

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE DIETRICH MOURA COSTA



AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO SOBRE O SISTEMA ENDÓCRINO E REPRODUTIVO E SOBRE AS CONDIÇÕES OXI-REDUTORAS EM RATOS WISTAR.

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE DIETRICH MOURA COSTA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO SOBRE O SISTEMA ENDÓCRINO E REPRODUTIVO E SOBRE AS CONDIÇÕES OXI-REDUTORAS EM RATOS WISTAR.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino de Andrade.

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Costa, Daniele Dietrich Moura

Avaliação dos efeitos do trióxido de antimônio sobre o sistema endócrino e reprodutivo e sobre as condições oxi-redutoras em ratos Wistar. / Daniele Dietrich Moura Costa. – Curitiba, 2016.
95 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Co-orientador: Anderson Joel Martino de Andrade

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Estresse oxidativo. 2. Antimonio. 3. Ratos Wistar. I. Título II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira. III. Andrade, Anderson Joel Martino de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



ATA DA 397ª SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos cinco dias do mês de Julho de dois mil e dezesseis, às 14h00min nas dependências do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs. Drs. Juliane Muller (Faculdade Pequeno Príncipe - FPP), Ana Cláudia Boareto da Costa Cesar (Universidade Federal do Paraná - UFPR), Katya Naliwaiko (Universidade Federal do Paraná - UFPR), Rodrigo de Cássio da Silva (Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG) e Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (Orientador e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), com a finalidade de julgar a Tese da candidata **Daniele Dietrich Moura Costa**, intitulada: "Avaliação dos efeitos do trióxido de antimônio sobre o sistema endócrino e reprodutivo e sobre as condições oxidoreductoras em ratos Wistar", para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta da candidata ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro da sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo orientador, Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. Após analisar a tese e arguida a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela "Aprovada", habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

<u>Examinador/Afiliação</u>	<u>Parecer</u>	<u>Assinatura</u>
Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro Orientador e presidente da banca Universidade Federal do Paraná - UFPR	<u>Aprovada</u>	
Profa. Dra. Juliane Muller Faculdade Pequeno Príncipe - FPP	<u>APROVADA</u>	
Profa. Dra. Ana Cláudia Boareto da Costa Cesar Universidade Federal do Paraná - UFPR	<u>Aprovada</u>	
Profa. Dra. Katya Naliwaiko Universidade Federal do Paraná - UFPR	<u>Aprovada</u>	
Prof. Dr. Rodrigo de Cássio da Silva Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG	<u>Aprovada</u>	



Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

(Simone de Beauvoir).

Esta vitória é dedicada aos meus pais, João e Sueli, que muitas vezes
abdicaram de seus sonhos para que eu realizasse os meus.

AGRADECIMENTOS

Mais de 10 anos de vida acadêmica. Não se resume a apenas os quatro anos que esta tese levou para ser construída, mas sim a todos os anos que precederam a construção desta e que foram essenciais ao meu amadurecimento enquanto pessoa e enquanto cientista.

Tantas pessoas se fizeram presentes, tantas ajudaram, tantas me guiaram, tantas outras me estenderam a mão ou me abriram os olhos ante aquilo que parecia óbvio. São tantos a quem agradecer, que a lista vai ficar longa!

Deus, presença constante ao longo desta jornada, que nunca deixou nada me faltar e enviou sabedoria, serenidade e discernimento sempre que houve necessidade. Que enviou coragem e persistência sempre que pensei em desistir. E que enviou força para me levantar sempre depois de cada queda.

Agradeço ao meu orientador, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por todos esses anos de acolhida em seu laboratório, sempre me dando autonomia para pensar e agir, permitindo o meu amadurecimento e a minha formação intelectual.

Ao meu co-orientador, Anderson Joel Martino de Andrade, sem o qual este trabalho não teria sido possível. Obrigado por tudo que me ensinou, por toda a paciência e por todas as discussões!

Aos professores do laboratório de Toxicologia Celular, sempre dispostos a auxiliar no que fosse preciso, nos experimentos e na vida. Ao Francisco Filipak, por todas as discussões científicas e por todos o auxílio nas análises bioquímicas. Ao Marco, por toda a ajuda estatística, além da companhia sempre bem humorada. A professora Cláudia Ortolani, pelo empréstimo de todos os livros de histologia. A professora Sônia Regina Grotzner, pelos livros, pelo espaço, pelo carinho, pela paciência, pelas longas conversas e desabafos. Soninha querida, esta jornada teria sido muito mais difícil sem você. A Maritana Mella pela amizade incondicional, pelo apoio e por sempre me ouvir quando os problemas pareciam não ter fim.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Toxicologia Celular e Histofisiologia da Retina, que durante estes longos anos compartilharam reagentes, espaços, alegrias, tristezas e ideais.

A minha (ex) IC, Aline, por toda a ajuda com o processamento histológico e também com a análise dos materiais. Aprendi muito com você!!

Ao Dandie Bozza, amigo e parceiro de experimentos e (porque não) psicólogo.

Ao Samuel Liebel, sempre presente, ajudando com a PCO (carbolication!).

A Andressa, amiga de todas as horas e pra todas as situações. Obrigada por estar sempre presente para dividir o fardo dos experimentos e das experiências (de vida).

A Inês da Silva Rabitto, exemplo de mulher e cientista. Muitas vezes, quando pensei em desistir, lembrei dessa mulher, fonte de inspiração.

As amigas e amigos do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva e do Laboratório de Toxicologia Reprodutiva. Um agradecimento especial a Samanta Araújo que auxiliou no experimento uterótrofico com sua imensa precisão cirúrgica. A Ana Lourenço pela participação nas castrações, nas coletas e na manutenção dos experimentos. A Caroline Gomes, sempre presente, em todas as coletas, nas castrações, nos feriados, fins de ano, discussões de dados! Amiga, obrigada por todo carinho e apoio nessa jornada.

Ao meu companheiro de jornada, todos os dias, domingos, feriados! Dog, amigão, sinto sua falta!

A minha família sempre presente, apoiando da maneira como fosse possível e estivesse ao seu alcance. A minha mãe, Sueli Dietrich Moura Costa, pelo dom da vida e por existir, tornando assim a minha existência mais fácil. Ao meu pai, João Moura Costa, por sempre acreditar e me incentivar a prosseguir. A minha irmã, Michele Dietrich Moura Costa, parceira, amiga!!! Sem você, sem seu apoio e seu ombro para dividir o peso do fardo chamado vida eu não teria conseguido. Ao meu irmão, Rafael Dietrich Moura Costa, pelo bom humor sempre!! Aos meus sobrinhos, alegria da minha vida: Kauã, meu primogênito. Leonardo, meu japinha sorridente. Sofia, princesinha da dinda. Isabella, minha

top model! Alice, minha birrenta, que também é a princesa da dinha!! Amo todos, infinito e sem limites.

A Ana Cristina Dietrich, que além de tia, foi minha segunda mãe, sempre presente, sempre partilhando das alegrias e tristezas.

A meus avós, Lídia Chuves Martins (*in memorian*) e Antônio Martins (*in memorian*).

A família que Deus me permitiu escolher. Geison Corrêa, meu noivo, parceiro, amigo e porto seguro nestes mais de 12 anos de convivência. Por sempre me incentivar a prosseguir, por me apoiar qual fosse o caminho escolhido. Obrigada por partilhar dos meus ideais e compreender pacientemente minhas ausências. A Vera Lúcia Corrêa, por sempre me acolher nos dias de sol e em meio as tempestades e ter sempre uma palavra de conforto a oferecer. A José Benvindo Corrêa (*in memorian*), por me ensinar a nunca ter medo e a nunca deixar de sonhar!

Aos amigos de longa data: Simone Ducci, Gabriel Cippola, Renata Ferreira e Bruno Dalla Vechia!!

A Marlene, secretária da Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, por tornar toda a burocracia mais fácil!

Ao professores Drs. Rodrigo de Cássio da Silva, Kátya Naliwayko, Ana Cláudia Boareto e Juliane Muller por aceitarem compor a banca e avaliar meu trabalho.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa.

A Universidade Federal do Paraná, pelo ensino de qualidade

*“Não me deem fórmulas certas, porque eu não espero acertar sempre.
Renda-se, como eu me rendi.
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender,
viver ultrapassa qualquer entendimento.”*

Clarice Lispector.

RESUMO

O uso de antimônio (Sb) pelas diversas sociedades vem de tempos remotos. Seu mais antigo e mais comum uso é no tratamento da leishmaniose, no entanto seu uso como sinergista em retardantes de chamas e na catálise de polímeros plásticos vem crescendo enormemente nas últimas décadas. O potencial tóxico das formas pentavalentes, utilizadas no tratamento de doenças já foi extensivamente estudando, no entanto esta não é a forma biologicamente ativa, sendo convertida na forma trivalente pelos sistemas biológicos. Frente a isto torna-se essencial estudar os efeitos das formas trivalentes, considerando doses relevantes para a exposição humana. Desta forma, diversas doses de antimônio no seu estado de oxidação +3 (trióxido de antimônio – Sb_2O_3) foram testadas seguindo diversos protocolos. No capítulo 1, são relatados os efeitos do Sb_2O_3 sobre o sistema endócrino e reprodutivo de ratos Wistar, seguindo protocolos experimentais específicos para avaliar disfunção endócrinas propostos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-US). Neste caso nenhum efeito de disfunção endócrina (anti) estrogênica ou (anti) androgênica foram observados, no entanto danos histológicos em tireóide e testículos foram comuns frente a exposição ao Sb_2O_3 . No capítulo 2 são relatados os efeitos desta substância sobre as condições oxido redutoras e danos em macromoléculas de fígado, rim, pulmão e coração. Também foram analisados danos histológicos em órgãos de biotransformação e excreção e possíveis danos neurológicos. Os resultados deste capítulo levam a conclusão de que o Sb_2O_3 , mesmo em baixas doses pode alterar a homeostase especialmente hepática e renal, alterando enzimas e moléculas relacionadas ao balanço oxi-redutor bem como danificar macromoléculas essenciais à integridade celular. Desta forma conclui-se que, embora o Sb_2O_3 não tenha propriedades desreguladoras endócrinas, ele possui efeitos tóxicos sobre o organismo como um todo.

Palavras chave: Desregulação endócrina, Estresse oxidativo, Antimônio, ratos Wistar.

ABSTRACT

Antimony is a world widespread substance used a long time ago in human history. Its most common use is in leishmaniasis treatment, but its use as a flame retardant and in plastic catalysis are increasing in last decades. Antimony exists as pentavalent and trivalent forms. The toxicology of pentavalent Sb, commonly used in disease treatment, are well studied. However, the pentavalent form is converted in the trivalent form by biological systems, and Sb^{+3} is more toxic than the Sb^{+5} oxidation state, turning necessary study the most toxic form in a dose relevant for human exposure. In the present thesis, Sb_2O_3 was used as a Sb^{+3} contaminant, considering diverse exposure protocols. In the first chapter, the effects of Sb_2O_3 under endocrine and reproductive systems were evaluated following EPA protocols proposed for endocrine disrupting contaminants. No (anti) estrogenic or (anti) androgenic effects of Sb were observed in all tested doses and protocols, but damages in thyroid and testis were common after Sb_2O_3 exposure. In the second chapter of this thesis, the effects of Sb under oxidative stress, as well histologic alterations and neurologic effects were considered. The present results show that antimony can alter the body homeostasis, especially renal and hepatic enzymes related to oxidative balance and cause damages to macromolecules. Considering all presented results, we conclude that Sb do not exert endocrine disrupting effects, but exert toxic effects, especially for liver and kidneys.

Key – words: Endocrine dysfunction, oxidative stress, antimony, Wistar rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 ANTIMÔNIO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS	2
2.2 HISTÓRICO E USOS	2
2.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	4
2.4 ABSORÇÃO, METABOLISMO E DISTRIBUIÇÃO.....	5
2.5 TOXICOLOGIA	8
CAPÍTULO I:	12
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO SOBRE O SISTEMA ENDÓCRINO E REPRODUTIVO DE RATOS WISTAR.	12
RESUMO	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	21
3.2 MANUTENÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ASSEPSIA EXPERIMENTAL	21
3.3 DETERMINAÇÃO DAS DOSES DE Sb ₂ O ₃	22
3.4 INVESTIGAÇÃO DE DISFUNÇÃO ENDÓCRINA E/OU REPRODUTIVA	23
3.4.1 Ensaio uterotrófico.....	23
3.4.2 Ensaio de Hershberger	24
3.4.3 Ensaio com machos adultos por 15 dias	27
3.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	28
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS TESTICULARES	29
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.	29
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	31
4.1 EXPERIMENTO UTEROTRÓFICO.....	31

4.2 EXPERIMENTO DE HERSHBERGER	39
4.3 EXPERIMENTO COM MACHOS ADULTOS	47
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6 REFERÊNCIAS	56
CAPÍTULO II:	59
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO SOBRE AS CONDIÇÕES ÓXIDO- REDUTORAS EM RATOS WISTAR.	59
1 INTRODUCTION	64
2 MATERIALS AND METHODS	66
2.1 ANIMAL HOUSING	66
2.2 EXPERIMENTAL DESIGN	66
2.3 SAMPLING	68
2.4 HISTOPATHOLOGICAL PROCEDURES	68
2.5 BIOCHEMICAL ASSAYS	68
2.6 STATISTICAL PROCEDURES	70
3 RESULTS	71
3.1 CLINICAL TOXICOLOGICAL SIGNS AND SOMATIC INDEXES	71
3.2 LIVER	73
3.3 Kidney	77
3.4 HEART	83
3.5 LUNG	84
3.6 BRAIN	85
4 DISCUSSION	85
5 REFERENCES	90
APÊNDICE: METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS DETALHADOS	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	98

1 INTRODUÇÃO

O antimônio (Sb) é um metal, naturalmente presente na crosta terrestre que possui diversas finalidades industriais e farmacêuticas. Dentre as propriedades farmacológicas, está seu uso no tratamento de doenças parasitárias como a leishmaniose. Os usos industriais são mais amplos, estando entre eles o uso na fabricação de retardantes de chamas e resinas plásticas.

O consumo e a consequente produção mundial de Sb, vem aumentando de forma considerável nas últimas duas décadas e seu uso em resinas plásticas utilizadas no empacotamento de alimentos torna a exposição humana um risco a ser considerado.

O Sb é utilizado na catálise da resina plástica conhecida como PET e sabe-se que dependendo da temperatura, tempo de armazenamento e pH da substância armazenada, o Sb pode migrar da resina para o líquido adjacente, tornando a exposição humana inevitável.

Diversos estudos já relataram a toxicidade do Sb, no entanto são estudos antigos e que trabalham com doses elevadas deste metal, visto que este tipo dose está correlacionado a exposição intencional, quando faz-se o tratamento com medicamentos antimoniais. O que precisa ser considerado a partir de agora são doses baixas, semelhantes àquelas que a população está sujeita diariamente, através do consumo de produtos contaminados de forma não intencional com este metal.

Perante esta situação o presente trabalho objetivou avaliar os possíveis efeitos do Sb, sobre diversos tecidos e sistemas de mamíferos em doses relevantes para a exposição humana não intencional.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANTIMÔNIO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

O antimônio (símbolo químico Sb) é um metal que possui um peso molecular de 162 u.m.a (o que corresponde a um peso molecular de 122g/mol), número atômico 51, densidade de 6,7g/l, e elevados pontos de fusão e ebulição, característicos dos compostos metálicos. Seu retículo cristalino é do tipo cúbico de face centrada, caracterizado pela coloração que varia entre esbranquiçado ao prateado. O Sb pertence à família 15 da tabela periódica (antiga família 5A), apresentando 5 elétrons na sua camada de valência e podendo existir em quatro estado de oxidação: -3, 0, +3 e +5. A configuração eletrônica do antimônio, $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2 5p^3$, permite a utilização dos orbitais $5s^2 5p^3$ de forma que o antimônio possa apresentar vários estados de oxidação. Este elemento pertence à mesma família do arsênio (As), e devido a este fato possui características químicas e físicas semelhantes, mas seus efeitos em sistemas biológicos parecem ser distintos, uma vez que o As é um dos metais de maior toxicidade já estudado. O Sb existe sob a forma de compostos inorgânicos (Sb metálico, estado de oxidação 0) e orgânicos, sob a forma de Sb_2O_3 , megaluminato de antimônio, potássio de tártaro e antimônio e etc (TYLENDÁ, 2007).

O antimônio (Sb) está presente naturalmente na crosta terrestre, principalmente no solo, em rios e lagos, em níveis traço de concentração. Embora seja possível encontrá-lo na forma livre, normalmente ele se apresenta na forma de sulfetos ou óxidos, sendo a maior fonte deste elemento a antimonita (Sb_2S_3) e a valentinita (Sb_2O_3) (FILELLA, 2002).

2.2 HISTÓRICO E USOS

O uso de compostos de antimônio já era conhecido séculos antes da era cristã para diversos fins terapêuticos e cosméticos, como no caso das tintas usadas por egípcios e romanos, e também devido às suas propriedades

eméticas por caldeus. Mas somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Alguns anos mais tarde, na Itália, foi comprovada a eficácia dessa droga no tratamento de Calazar. O tartarato de antimônio também chamado de tartarato emético (Sb^{+3}), foi amplamente utilizado até o início dos anos 1900, apesar da natureza tóxica do elemento. Apesar de ser o primeiro medicamento empregado com sucesso no tratamento de leishmanioses, o uso do tartarato emético tinha várias limitações terapêuticas. Esse medicamento era administrado por via endovenosa em doses múltiplas por um período de aproximadamente um mês. Vários efeitos colaterais, como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotoxicos, eram observados durante o tratamento e em muitos casos o tratamento era abandonado pelos pacientes. Em razão desses efeitos indesejáveis os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por complexos de antimônio pentavalentes (Sb^{+5}). Foi proposto que o Sb^{+5} agiria como um pró-fármaco, sendo reduzido por tióis celulares no organismo do hospedeiro a Sb^{+3} , sua forma ativa e tóxica (dados revisados por CARLIN, 2000).

Geralmente, o antimônio é utilizado na composição de ligas metálicas, no revestimento de baterias, tubos e moldes metálicos, sendo um elemento de alta pureza muito utilizado na indústria de semicondutores de eletricidade. O trióxido de antimônio (Sb_2O_3) é a forma antimonial mais importante, possuindo um papel fundamental como retardante de chama, principalmente nas indústrias têxteis e de plásticos e como catalizador na produção de resinas plásticas (FILELLA, 2002).

Até a década de 1950, a produção de ligas consistia na principal atividade industrial deste metal, porém nos dias de hoje, a maior parte da produção total deste elemento destina-se à produção de Sb_2O_3 , empregado largamente na fabricação de materiais retardantes de chama e resinas plásticas (KRACHLER et al., 2005). A produção anual de Sb aumentou de cerca de 70 mil toneladas no final da década de 60 para aproximadamente 120 mil toneladas no ano 2000 (NRIAGU, 2000, *apud*, KRACHLER et al., 2005). Também se utiliza este óxido na fabricação de plásticos, tal como o PVC (cloreto polivinílico), assim como, em catalisadores para produção de PET

(tereftalato de polietileno), usado especialmente em garrafas de refrigerantes, sucos e água mineral (DAINTITH, 2000).

2.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

O antimônio está presente em ambientes aquáticos como resultado do intemperismo de rochas, da lixiviação de solos e de atividades antrópicas. Concentrações típicas para antimônio dissolvido em águas não poluídas são inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, nas proximidades de fontes antropogênicas, as concentrações podem atingir até 100 vezes os níveis naturais (FILELLA, 2002). Trata-se ainda de um elemento não essencial e sua toxicidade depende do estado de oxidação em que se encontra. Geralmente, a toxicidade para espécies trivalentes é cerca de dez vezes maior quando comparada à forma pentavalente. Embora existam mais de 3.000 compostos deste elemento descritos na literatura, apenas as formas inorgânicas, e as formas orgânicas contendo Sb^{+3} e Sb^{+5} , têm sido observadas em águas naturais (SMICHOWSKI, 1998).

O antimônio é considerado um contaminante da água potável devido aos seus efeitos sobre a saúde humana; estes efeitos incluem náuseas, vômitos e diarreias em uma exposição que excede a contaminação máxima por períodos relativamente curtos. Já a exposição em longo prazo pode aumentar os níveis de colesterol e diminuir níveis de glicose no sangue. O antimônio é considerado um agente clastogênico (causa danos cromossômicos nas células), podendo assim estar relacionado ao surgimento de neoplasias (TRIVELIN, 2003). Embora não existam estudos comprovando a carcinogenicidade em humanos, pesquisas mostram similaridade entre a toxicidade do arsênio, que é um carcinogênico comprovado, e do antimônio. Assim, devido aos efeitos danosos possivelmente causados à saúde pela exposição ao antimônio, seus compostos são considerados poluentes de interesse prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S EPA) e pela União Europeia (ERDEM E EROGLU, 2005).

2.4 ABSORÇÃO, METABOLIZAÇÃO E EXCREÇÃO

O Sb é encontrado em baixas concentrações no ambiente e a exposição de seres vivos pode ocorrer via inação de ar contaminado, ou através da ingestão de alimentos e água contaminados (neste caso retirados de fontes e solos contaminados com Sb). Há uma via de exposição, que é também a mais preocupante, que é a ingestão indireta, através do consumo de produtos industrializados, cujas embalagens contém Sb que potencialmente migra para o produto adjacente. Embora de menor relevância, ocorre ainda a exposição ocupacional, em trabalhadores que trabalham na mineração ou no processamento deste metal (ATSDR, 1992).

As principais vias de absorção são dérmica, inalatória e gastrointestinal, embora a absorção pelo trato digestório, corresponda a apenas cerca de 30% do que é ingerido (ATSDR, 1992).

A distribuição das formas trivalentes de Sb é dada devido às suas características lipofílicas que permitem sua penetração nas células. Após a administração oral, o Sb é absorvido principalmente pelo fígado, rim, baço, tireoide, adrenais e ossos, pelo fato destes órgãos serem altamente vascularizados. Devidos as suas características, o Sb pode biocumular-se sendo os principais órgãos o fígado, tireoide e demais tecidos ricos em células epiteliais. A maior parte do Sb circulante liga-se aos eritrócitos, penetrando em seu interior, reagindo com a hemoglobina e conseqüentemente interferindo com as funções da mesma. Este composto é excretado predominantemente via urina, no entanto devido ao potencial de bioacumulação e de interação do Sb com as células, sua taxa de eliminação é baixa. Estudos com humanos demonstram que mesmo após cessados o tratamento com Sb, a excreção deste composto permanece por períodos que podem durar meses (STEMER 1976).

O metabolismo do antimônio está relacionado com a mudança de valência que ocorre no organismo, após a incorporação do elemento. Aproximadamente, 5-10% do Sb⁺⁵ ingerido é reduzido para a forma trivalente. A evidência da metilação, responsável parcialmente pela metabolização e

excreção do antimônio em mamíferos é baixa, e assim sendo, parece que o organismo não possui mecanismos eficientes de detoxificação do Sb^{+3} .

Relatos de experimentos *in vivo* encontrados na literatura podem ajudar a esclarecer a cinética de distribuição deste elemento. Como existe um paralelo do comportamento biológico do antimônio entre humanos e animais, é mais comum, a realização de ensaios *in vivo* em animais do que em humanos. Com o intuito de identificar em quais tecidos ocorre acumulação de Sb, Añez e colaboradores (1994) realizaram um ensaio com ratos que após inoculação com *L. garnhami*, agente causador de leishmaniose, foram tratados com antimoniato de meglumina (60 mg kg^{-1} diariamente). As maiores concentrações de antimônio total foram encontradas no baço ($3,1- 8,9 \text{ mg kg}^{-1}$) e na pele biopsiada ($2,6 - 14,8 \text{ mg kg}^{-1}$), entre todos os outros tecidos investigados (rins, coração, cérebro, nódulo linfático, e bexiga). O acúmulo de Sb em lesões de leishmaniose durante e/ou após o tratamento com antimoniais pentavalentes já tinha sido constatado anteriormente (BERMAN *et al*, 1988), e também foi confirmada pelos pesquisadores da FIOCRUZ (SCHUBACH *et al.*, 2002).

A distribuição de antimônio entre os tecidos também foi investigada através de um experimento *in vivo* em ratos por Poon e colaboradores (1998). Os animais foram separados em grupos, sendo que cada um foi submetido ao consumo de água com concentrações distintas de antimônio ($0,5; 5; 50$ e 500 mg L^{-1}) durante 13 semanas. Observou-se uma correlação entre a dose de Sb ingerida e a respectiva concentração nos tecidos dos animais. O fígado e o baço apresentaram os mais altos níveis de Sb entre todos os tecidos investigados. Porém, a concentração em células vermelhas sanguíneas foi ainda maior. A ordem decrescente da concentração de Sb nas amostras obtidas foi: hemácias>baço/ fígado>rins>cérebro/gordura>plasma sanguíneo. Também foram registradas alterações histológicas em glândulas, como a tireoide, e em órgãos, como o baço e fígado. Estas observações foram concordantes com outras pesquisas (BRUZUAL E PERAZA, 1979, AÑEZ *et al.*, 1994), nas quais também se verificaram alterações histopatológicas em fígados, baços e rins de hamsters, causadas pelas espécies trivalentes e pentavalentes. Outros compostos orgânicos de antimônio, constituídos por espécies com menor toxicidade e/ou solubilidade, podem apresentar

comportamento biológico diferente. Aliás, Ferroni e colaboradores (1987) verificaram que o antimoniato de meglumina, concentra-se principalmente em fígado de ratos, quando se faz a administração de forma intravenosa ou intramuscular. Estes resultados indicam que o antimônio apresenta uma grande afinidade pelo sangue e baço, assim como, uma tendência de acumulação em órgãos vascularizados, especialmente o fígado.

No ensaio de Poon e colaboradores (1998), mencionado anteriormente, a maioria das alterações bioquímicas e histológicas regrediu com o encerramento do fornecimento de água contaminada, com exceção das observadas em tireoide e baço, indicando que os efeitos do Sb não são sempre reversíveis. A manutenção da alta concentração no baço decorre do seu papel preponderante na destruição de células vermelhas do sangue. A notável concentração de Sb em células vermelhas sanguíneas e a persistência do antimônio no baço sugerem que o elemento pode acumular, potencialmente, em organismos vivos.

Um dos modos de ação propostos para o Sb é a inibição do metabolismo energético e da biossíntese de macromoléculas, através da inibição da glicólise e da oxidação de ácidos graxos. Wyllie et al., (2004) demonstraram que o Sb afeta a capacidade tamponante dos grupamentos tíois intracelulares e o potencial redox de células. Este autor ainda demonstrou a conversão biológica do Sb^{+5} a Sb^{+3} , sendo que a toxicidade dos compostos antimoniais usados no tratamento da leishmaniose está relacionada a resíduos de Sb^{+3} .

Acredita-se que o metabolismo do antimônio no corpo humano esteja relacionado provavelmente com a ocorrência de reações de redução. A origem da hipótese da bio-redução de antimônio no organismo humano deve-se a comparações com o metabolismo do arsênio, análogo químico do antimônio. Como os dois elementos apresentam características químicas e toxicológicas semelhantes, é possível que as rotas metabólicas também sejam análogas. Em seres humanos, como também em muitas espécies de mamíferos, ocorre uma redução do arsênio pentavalente, As^{+5} , para o trivalente, As^{+3} , com uma subsequente metilação. Considera-se a metilação como a principal via de

desintoxicação do arsênio pois os metabólitos metilados pentavalentes são menos tóxicos que as espécies inorgânicas.

Mortari (2001), em trabalho sobre especiação de antimônio em pacientes com leishmaniose tratados com antimoniato de meglumina, relata indícios de que ocorre a bioedução do Sb^{+5} a Sb^{+3} . No entanto, ainda não se tem informações sobre o mecanismo de desintoxicação em seres humanos, contudo a biometilação é uma das hipóteses a ser considerada. Ainda no trabalho de Mortaria (2001), observou-se o aumento das razões Sb^{+5} /megalumina e Sb^{+3} /megalumina, em amostras de urina coletadas durante e após o tratamento de pacientes por via intramuscular. Considerou-se esta observação como evidência experimental da conversão *in vivo* da droga nas espécies iônicas penta e trivalentes, e levantou-se a hipótese, de que a produção metabólica da espécie Sb^{+3} seja responsável pela atividade terapêutica dos antimoniais pentavalentes e, eventualmente, pelos efeitos colaterais observados em alguns casos.

Outro indício de bioedução foi obtido por Peña e colaboradores (1990). Os pesquisadores determinaram a concentração de antimônio e de suas espécies químicas no soro sanguíneo e urina de pacientes com leishmaniose tratados com Sb. Amostras de urina e soro coletadas cinco dias após o início do tratamento apresentaram um aumento de concentração de Sb^{+3} e Sb^{+5} em relação a amostras anteriores ao início do tratamento. A concentração na urina foi muito maior que a respectiva concentração no soro, indicando o papel renal na excreção das espécies de antimônio. Amostras coletadas após 30 dias do final do tratamento ainda apresentavam uma pequena concentração de Sb^{+3} e Sb^{+5} porém desta vez a concentração da forma com maior estado de oxidação foi menor em comparação com a forma de maior estado de oxidação.

2.5 TOXICOLOGIA

As informações sobre a toxicidade do antimônio são limitadas. O seu comportamento toxicológico e fisiológico depende do seu estado de oxidação, presença de ligantes e solubilidade dos seus compostos. As espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas, devido a forte ligação de Sb^{+3} e

Sb^{+5} com grupos $-SH$ presentes em muitas proteínas, resultando, possivelmente, na desativação de sítios funcionais biologicamente relevantes. A espécie trivalente é estável em solução aquosa, porém o mesmo não ocorre com a espécie pentavalente. O Sb^{+3} , sob a forma de $[Sb(OH)_3]$, não apresenta carga elétrica, o que permite facilmente a sua passagem através de membranas celulares. Esta característica provavelmente explica a razão pela qual o antimônio trivalente tem um efeito tóxico mais acentuado que o pentavalente, sendo a toxicidade da forma trivalente cerca de dez vezes maior que a da forma pentavalente. Também ocorrem diferenças entre as espécies de antimônio em relação à afinidade por células e grupos químicos. Pode-se citar como exemplo, a maior afinidade que o Sb^{+3} apresenta pelas células vermelhas (hemácias) e pelos grupos sulfidrilas de constituintes celulares, enquanto que os eritrócitos são praticamente impermeáveis ao Sb^{+5} (EMONS E KRACHLER, 2001).

De uma forma geral, o antimônio tem efeitos irritantes sobre a mucosa digestiva, ocasionando vômitos profundos, salivação, desidratação, hipotermia, hipotensão, etc. Descrevem-se, ocasionalmente lesões sistêmicas, que decorrem de sua ligação com grupos sulfidrilas intracelulares. Manifestam-se por efeitos cardiotoxicos diretos, com fibrilação atrial e lesões hepáticas (hepatite tóxica) e nefrite hemorrágica. Doses excessivas de medicamentos antimoniais usados como parasiticidas podem determinar distúrbios neurológicos, incluindo cefaleia, irritabilidade, tremores, etc.

Embora o principal uso dos antimoniais seja no tratamento das leishmanioses, estudos relatam o potencial citotóxico de complexos de antimônio(III) e antimônio(V) contra várias linhagens de células tumorais humana incluindo THP-1 (leucemia monocítica) e HeLa (carcinoma uterino). Na tentativa de explorar ao máximo o potencial terapêutico dos antimoniais, a atividade antimicrobiana de complexos de antimônio também vem sendo investigada. Estudos demonstram que compostos de antimônio possuem atividade contra espécies de bactérias gram-positivas, gram-negativas) além de espécies de fungos e leveduras.

Há relatos de ocorrência de casos de câncer pulmonar em trabalhadores de mineradoras de antimônio. O efeito cancerígeno poderia ter sido causado

pela inalação de compostos de antimônio. Porém, como nestas minas há também exposição a outros compostos voláteis de metais tóxicos, tais como o arsênio, não se pode afirmar a ação cancerígena do antimônio (BOECK *et al.*, 2003). Em um estudo dos efeitos subcrônicos do Sb em ratos, Hiraoka, 1986, observou um retardo no crescimento e uma perda de massa corpórea. Efeitos circulatórios como edemas e aumento da pressão arterial foram relatados por Cotten e Logan (1966) após exposição ao Sb, bem como alterações eletrocardiográficas. Degenaração do miocárdio também foi observada por Watt (1983). Estudos bastante antigos (Chopra, 1927), relatam acúmulo de lipídeos nos rins e fígado de animais expostos ao Sb e perda de função hepática e renal.

Dados controversos sobre a mutagenicidade e clastogenicidade do Sb já foram realizados. Gurani *et al.* (1992) observaram aberrações cromossômicas em espermatozoides frente a exposição ao Sb, no entanto alterações na motilidade e mobilidade dos mesmos não foram observadas. Este mesmo autor em outro estudo (1993) demonstrou que a frequência de aberrações cromossômicas induzidas era diretamente proporcional ao tempo de exposição e a dose, sendo que doses de 50 mg foram letais. Kirkland *et al.* (2007) relataram a indução de micronúcleo e aberrações cromossômicas em células reprodutivas frente a exposição ao Sb.

Segundo Darbre (2006) o Sb pertence ao grupo dos metais ditos metaloestrogênicos, no entanto não há nenhum estudo biológico que comprove esse dado. Estudos de exposição hídrica a até 1200 mg Sb não demonstraram efeitos tóxicos, nem alterações em parâmetros reprodutivos (Omura *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* (MANN *et al.*, 2006) demonstram o potencial do Sb em induzir apoptose em diferentes tipos celulares, por uma mesma via de sinalização. Neste estudo os autores propõem o uso de Sb₂O₃ no tratamento de tumores líquidos, visto que este tipo de célula foi a que apresentou mais sensibilidade a exposição ao Sb. Gebel (1998) demonstrou que o Sb tem habilidade de passar pela placenta e gerar má-formações fetais tais como anomalias ósseas. Miranda e colaboradores (2006) investigaram a embriotoxicidade do Sb em estudo com ratas Wistar grávidas tratadas por via

subcutânea com a administração de fármacos a base de Sb em diferentes doses (Sb^{+5} : 75, 150, 300 $\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$). O fármaco foi considerado embriotóxico para ratos a partir da dose de 150 $\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$, concluindo-se que o aumento gradual da concentração de Sb no sangue materno proveniente durante a gestação proporcionou que parte deste antimônio fosse transferida através da placenta para os fetos. Apesar de não terem sido observados sinais de efeitos tóxicos nas mães, alguns fetos apresentam crescimento pré-natal retardado.

A toxicidade exercida pelo antimônio e suas espécies levou ao estabelecimento de legislações ambientais referentes às concentrações máximas permissíveis (CMP) em água potável e no meio ambiente. A Agência de Proteção Ambiental norte americana (EPA) considera o Sb e seus compostos como poluidores prioritários (EPA, 2008). A União Europeia e o Japão determinaram que a concentração máxima permitida (CMP) de Sb em água para recreação e potável seja, respectivamente, igual a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e menor que 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ZHENG et al., 2000). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2003) recomenda que a CMP de Sb em água potável não deve ultrapassar 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

CAPÍTULO I:

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO SOBRE O SISTEMA ENDÓCRINO E REPRODUTIVO DE RATOS WISTAR.

RESUMO

Diversas substâncias apresentam o potencial de alterar o sistema endócrino de animais e humanos, prejudicando a homeostasia e a reprodução. Dentre estas substâncias alguns metais já foram correlacionados a efeitos desreguladores endócrinos, sendo chamados de metalormônios. O antimônio é um metal utilizado no tratamento de doenças parasitárias e como retardante de chamas, porém seu principal uso é na catálise de polímeros plásticos como o PET, utilizado para fazer embalagens de refrigerantes, sucos e água. A quantidade de antimônio que migra da resina plástica e contamina o líquido armazenado depende da temperatura, tempo armazenamento e do pH do líquido. Embora as concentrações de Sb encontradas em líquidos armazenados em PET sejam baixas, o risco de exposição humana existe e precisa ser estudado. Frente a este cenário o principal objetivo deste capítulo foi avaliar os efeitos do Sb como desregulador endócrino e sobre a toxicologia reprodutiva. Para tanto foram realizados três ensaios propostos pela EPA, padronizados para detectar com potencial efeitos desregulador endócrino. O ensaio uterotrófico, realizado com fêmeas imaturas não demonstrou alterações no peso do útero, nem na morfologia uterina e vaginal de animais expostos ao Sb. O ensaio de Hershberger não demonstrou alterações (anti)androgênicas, frente a exposição ao Sb, no entanto a morfologia da tireoide apresentou alterações significativas que podem levar a perda da função deste órgão. O ensaio com machos adultos não detectou alterações endócrinas perante os parâmetros propostos pela EPA, no entanto alterações morfológicas na tireoide e nos testículos foram observadas, comprometendo a funcionalidade destes dois órgãos. Desta forma conclui-se que o Sb não possui propriedades desreguladoras endócrinas, mas exerce efeitos tóxicos sobre a tireoide e os testículos, alterando a morfologia e consequentemente a fisiologia destes órgãos.

Palavras-chave: Antimônio, desreguladores endócrinos, tireóide.

1 INTRODUÇÃO

A revolução industrial, as melhorias na agricultura e na medicina propiciaram um aumento populacional e também um aumento de resíduos sejam eles provenientes da atividade industrial direta ou subprodutos desta atividade bem como de outras atividades antropogênicas. Dentre os resíduos das atividades industriais, agrícolas e antropogênicas estão as dioxinas, pesticidas, hormônios sintéticos, anabolizantes e quimioterápicos conhecidos por seus efeitos sobre o sistema endócrino de humanos e animais. Poluentes capazes de afetar o sistema endócrino são conhecidos como desreguladores endócrinos e seus efeitos podem causar danos a saúde, alterações no comportamento, crescimento e no desenvolvimento, no metabolismo e anomalias na função reprodutiva e na homeostase. Vale ressaltar que o sistema endócrino nos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações hormonais, sendo essa a principal razão porque teores vestigiais de químicos orgânicos antropogênicos podem ser tão perniciosos (WITOSRCH, 2002).

Há uma preocupação crescente com a ação perturbadora que diversos poluentes orgânicos desencadeiam no sistema endócrino dos animais. A constatação repetida de efeitos nefastos, causados em várias populações da fauna selvagem e até no próprio homem, foi o ponto de partida para a eclosão mundial de inúmeras pesquisas em busca dos designados desreguladores endócrinos. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USA EPA) define desreguladores endócrinos como sendo “agentes exógenos que interferem na produção, transporte, metabolismo, processos de interação, ação, degradação ou eliminação dos hormônios naturais” (KAVLOCK et al., 1996).

Estas substâncias são na sua maioria poluentes químicos e derivados de químicos antropogênicos que constituem diversos tipos de resíduos industriais, agrícolas ou domésticos. As substâncias causadoras de disfunções endócrinas são classificadas como hormônios naturais ou como substâncias artificiais. Os hormônios naturais incluem aqueles que ocorrem naturalmente no corpo humano e dos animais, como o estrogênio, a progesterona e a testosterona, e os fitoestrogênios, substâncias contidas em algumas plantas,

como os rebentos de alfafa e as sementes de soja, que apresentam uma atividade semelhante aos estrogênios quando ingeridas pelo organismo. As substâncias artificiais contemplam os hormônios sintéticos, incluindo os hormônios idênticos aos hormônios naturais, como os contraceptivos orais, as terapias hormonais de substituição e alguns aditivos utilizados na alimentação animal, e substâncias químicas artificiais, concebidas para utilizações na indústria como em alguns produtos de limpeza, na agricultura e nos bens de consumo. Incluem também as substâncias químicas que são subprodutos de processos industriais, como as dioxinas, que atualmente são conhecidas por interferirem com o sistema endócrino dos seres humanos e dos animais (MORA-COSTA, 2014). Em geral os desreguladores endócrinos são compostos muito estáveis e, portanto persistentes; muitas vezes lipofílicos e semi-voláteis, o que facilita a rápida e vasta dispersão ambiental (KAVLOCK et al., 1996).

Os efeitos dos desreguladores endócrinos manifestam-se, genericamente, ao nível do sistema endócrino, causando efeitos adversos à saúde, alterações no comportamento, crescimento, desenvolvimento, metabolismo e anomalias na função reprodutiva e na homeostase. Em geral os efeitos relacionados ao sistema reprodutivo, tais como baixa motilidade dos espermatozóides, infertilidade, endometriose, má formação genital masculina, entre outros são os mais comuns. (EERTMANS et al., 2003).

Durante as duas últimas décadas, diversos relatos têm sido publicados em diferentes países sobre uma ampla gama de modificações nas condições de saúde humana e animal, potencialmente associadas a disfunções no equilíbrio endócrino. Uma das primeiras a chamar a atenção dos pesquisadores foi a diminuição na razão de sexos ao nascimento (razão homens/mulheres), superior à unidade em diferentes populações. A estes fatos se acrescentaram os relatos de modificações na qualidade dos espermatozóides (em termos de concentração, motilidade e anomalias celulares) e aumento na incidência de infertilidade, modificações na libido, doença nodular da tireoide, prematuridade, baixo peso ao nascer, malformações urogenitais masculinas (sobretudo criptorquidia e hipospádia) e alguns tipos de neoplasias como o câncer de testículo, e mais recentemente

uma elevação na distribuição de câncer esporádico da mama em mulheres jovens (IUPAC, 2003; MOURA-COSTAS, 2014).

Assume-se hoje que a explicação para a ocorrência conjunta desta série de fenômenos que vêm sendo crescentemente debatidos decorreria da exposição humana e animal a certas substâncias químicas presentes no ambiente. Estas, pela similitude de sua estrutura química com hormônios endógenos, alteram a ação dos mesmos em geral acoplando-se aos receptores hormonais nas células, ou bloqueando a ligação dos mesmos, estimulando assim a atividade hormonal num ritmo independente daquele definido pela homeostasia endócrina (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

No que diz respeito às espécies animais que vivem em terra, incluindo os mamíferos, pensa-se que a exposição seja, sobretudo, de origem alimentar. Quanto aos seres humanos, as possíveis vias de exposição aos desreguladores endócrinos incluem a exposição direta no local de trabalho ou através de produtos de consumo como os alimentos, determinados plásticos, tintas, detergentes, cosméticos, e ainda a exposição indireta através do ambiente (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Diversas substâncias são adicionadas de forma não intencional a alimentos e medicamentos. São aditivos, corantes, estabilizantes entre outros. Dentre as substâncias adicionadas de forma não intencional estão as substâncias que formam as embalagens (*food contact substances*). Como estas substâncias não são ingeridas de forma direta, não há uma obrigatoriedade em testar a sua toxicidade. Porém diversos estudos recentes vêm demonstrando que muitas das substâncias utilizadas na formulação de embalagens podem migrar da embalagem para o alimento armazenado, podendo exercer efeitos deletérios sobre os indivíduos que as consomem. Dentre estas substâncias está o trióxido de antimônio, utilizado na formulação das embalagens PET (ERGENE et al., 2008).

O tereftalato de poli(etileno) (*polyethylene terephthalate* - PET) é uma resina plástica comumente usada para fazer recipientes onde água e líquidos não alcoólicos são armazenados. Apesar do nome, o PET não é um ftalato, logo as propriedades deste composto não necessariamente são semelhantes as dos ftalatos que conhecidamente são desreguladores endócrinos. A

American Plastics Council sinaliza claramente que o PET não é um ftalato: “*Plastic beverage bottles sold in the United States are made from a type of plastic known as polyethylene terephthalate (PET). Although polyethylene terephthalate (the plastic) and phthalate (the additive) may have similar names, the substances are chemically dissimilar. PET is not considered an orthophthalate, nor does PET require the use of phthalates or other softening additives.*” Adicionalmente os ftalatos não são utilizados como substratos ou precursores para a manufatura das PET (SAX, 2010). O PET é sintetizado a partir esterificação do ácido tereftálico (*terephthalic acid*) com o etileno glicol (*ethylene glycol*) ou a partir esterificação do dimetil tereftalato (*dimethyl terephthalate*) com o etileno glicol ambos produzindo bis(hydroxyethyl)terephthalate (BHET) que posteriormente sofre polimerização gerando o PET. A catálise da reação é realizada pelo Sb_2O_3 (TYLENDÁ e FOWLER, 2007). O PET não sofre degradação por isso os produtos utilizados na sua síntese não são liberados para os líquidos armazenados. Entretanto alguns compostos, tais como Sb_2O_3 , formaldeído e acetaldeído são comumente liberados a partir do PET (BACH et al., 2012). O formaldeído e o acetaldeído não representam um risco para humanos uma vez que estes compostos não são detectados na água armazenada em PET (BACH et al., 2012). No entanto o Sb_2O_3 é frequentemente detectado na água mineral armazenada em garrafas PET (RUNGCHANG et al., 2013; KERESZTES et al., 2009) e a liberação do mesmo para o líquido adjacente depende de fatores tais como temperatura, tempo de armazenamento e pH do líquido armazenado (KERESZTES et al., 2009). Desta forma a presença de antimônio em água e/ou líquidos armazenados em garrafas PET representa um risco de exposição humana a este metal que é considerado não essencial.

Diversos trabalhos têm relatado que a água armazenada em garrafas PET possui potencial desregulador endócrino (HEINZE 2011; PLOTAN et al., 2013). Pinto e Reali (2009) observaram que a água armazenada em garrafas PET possui atividade estrogênica variável, dependendo da marca da garrafa e da fonte de água. Plotan et al., (2013) testaram atividade estrogênica, (anti)androgênica, progesterônica e glucocorticóidica em amostras de água mineral armazenadas em PET e em vidro. A água armazenada em PET exibiu

atividade estrogênica, (anti)androgênica, progesterônica e glicocorticóidica. Em alguns poucos casos a água armazenada em recipientes de vidro exibiu atividade desreguladora endócrina; nestes casos os autores atribuíram a atividade à contaminação da água em sua fonte ou durante o processamento e não devido ao armazenamento.

Alguns estudos tem relacionado a disfunção endócrina causada pela água armazenada em garrafas PET ao antimônio presente nas mesmas (SAX, 2010; BACH et al., 2012). Apenas um estudo avaliou diretamente os efeitos do trióxido de antimônio sobre o sistema endócrino e reprodutivo *in vivo*, no entanto os dados foram bastante inconclusivos (OMURA et al., 2002). O estudo de Choe *et al.* (2003) mostrou que *in vitro* o antimônio possui alta atividade estrogênica. Giaccio et al. (2012) correlacionaram positivamente o decréscimo na qualidade do sêmen de homens na região de Nápoles (Itália) com a concentração de antimônio na água e no solo da região. Em uma revisão do Environmental Health Canada (2010) fica claro que ao antimônio é capaz de exercer diversos efeitos tóxicos sobre os organismos, especialmente efeitos genotóxicos e carcinogênicos. Entretanto esta mesma revisão deixa claro que não existem dados conclusivos sobre os efeitos do Sb sobre o sistema endócrino e reprodutivo.

Embora estudos relacionando humanos a exposição à desreguladores endócrinos sejam de importância médica, os mesmos são de difícil realização, pois envolvem fatores éticos e o ciclo reprodutivo de um humano leva cerca de 20 anos para se completar e mais cerca de 20 anos para verificar-se a fertilidade da descendência (TREOLAR et al., 1967). Devido a estes fatores que dificultam os estudos com humanos, muitos dos estudos sobre efeitos de desreguladores endócrinos têm sido realizados em modelos de mamíferos como os ratos e camundongos, uma vez que há grande similaridade entre o sistema endócrino destes e de seres humanos (JUGAN, 2010).

Um biomarcador é uma resposta fisiológica, morfológica, molecular ou genética individual, alterada num organismo e, é a consequência da exposição do mesmo a um agente exógeno, substância química poluente ou contaminante. Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos deletérios.

Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002).

Diversos biomarcadores têm sido aplicados para avaliar disfunção endócrina em mamíferos. Os pontos iniciais de disfunção endócrina e reprodutiva são o eixo composto pelo hipotálamo e pela hipófise. A hipófise quando estimulada pelo GnRH, liberado pelo hipotálamo, produz as gonadotropinas: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), sendo que a mensuração das subunidades beta de ambos os hormônios (LH β e FSH β) na hipófise é frequentemente utilizada como marcador de disfunção endócrina a nível hipofisário (LEVAVI-SIVAN et al., 2010).

A mensuração da concentração dos hormônios esteróis (estradiol e testosterona) tanto no plasma quanto nas gônadas, também tem se mostrado útil na avaliação dos efeitos de substâncias desreguladoras endócrinas. Excesso de hormônios estrogênicos (17 β estradiol) em machos está relacionada a exposição a substâncias de efeito estrogênico; já a falta destes hormônios em fêmeas está relacionada a exposição a substâncias de efeitos anti-estrogênicos. O excesso de androgênicos (testosterona) em fêmeas está relacionado a desreguladores endócrinos de efeito androgênico, enquanto que a falta destes hormônios em machos está associada exposição a desreguladores endócrinos de efeito anti-androgênico (JUGAN et al., 2010).

Associados a mensuração de hormônios sexuais, a mensuração de hormônios tireoideanos (T3 e T4) e hormônios adrenais (cortisol) também são utilizados para a detecção de efeitos desreguladores endócrinos.

Além da mensuração de hormônios, há diversos outros marcadores que indicam disfunção endócrina. Entre eles estão alteração no peso das gônadas (ovários e testículos) e de órgãos acessórios correlacionados (epidídimo, próstata, vesícula seminal, músculo levantador anibulbocavernoso/ músculo levantador do ânus, tireóide, etc). Alterações histológicas nestes órgãos também são frequentemente utilizadas para avaliar danos reprodutivos e endócrinos. Atraso no desenvolvimento das células germinativas, bem como avanço neste processo são frequentemente associados a efeitos

desreguladores endócrinos. Alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos, morte e/ou atraso do desenvolvimento das células germinativas e alterações morfológicas como um todo, são indicativos de alterações no sistema endócrino e reprodutivo. (SCHULZ et al., 2010).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do Sb_2O_3 sobre o sistema endócrino e reprodutivo de ratos Wistar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar alguns dos ensaios da fase 1 de *screening* proposta pela EPA para avaliar se o Sb_2O_3 possui propriedades desreguladores endócrinas. Dentre os ensaios propostos pela EPA foram realizados os ensaios de Hershberguer, uterotrófico e machos adultos;
- Expor fêmeas imaturas ao Sb_2O_3 seguindo o ensaio uterotrófico a fim de avaliar (anti)estrogenicidade;
- Expor ratos machos castrados ao Sb_2O_3 seguindo o ensaio de Hershberguer para avaliar (anti)androgenicidade e inibição da 5α -reductase;
- Expor machos adultos por 15 dias ao Sb_2O_3 (*15-day intact adult male*) a fim de se avaliar (anti)estrogenicidade, (anti)androgenicidade, agonismo e antagonismo da progesterona, inibição da síntese de esteróides, modulação da tireóide, modulação das gonadotropinas, modulação da prolactina.

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 15-16 animais experimentais em cada um dos grupos em todos os ensaios realizados. O número de animais foi estipulado com base em estudos toxicológicos prévios (MARTINO-ANDRADE et al., 2002) e confirmado através de cálculo estatístico. Por exemplo, o tamanho da amostra para os ensaios de concentrações hormonais intragonadais e plasmáticas (parâmetro que normalmente apresenta grande variabilidade entre os animais) foi calculado com auxílio do programa G*Power 3.1.0. Para tanto, os seguintes parâmetros foram utilizados:

$p = 0.05$;

Poder estatístico = 0.80;

Tamanho do efeito (*effect size*) = ~0.85 a 1.15

“n” calculado = 11 a 18 animais/grupo

O tamanho do efeito (*effect size*) foi calculado com base na média de peso da gônada e no desvio padrão dos níveis de hormônios de ratos controle, publicados anteriormente (MARTINO-ANDRADE et al., 2010). Para que seja detectada uma redução de 20 a 30% nos valores de concentrações hormonais em relação ao grupo controle (*effect size* ~ 0.85 a 1.15) são necessários entre 11 e 18 animais por grupo.

3.2 MANUTENÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ASSEPSIA EXPERIMENTAL

Para garantir que o único interferente nestes experimentos fosse a presença do Sb_2O_3 , os animais foram mantidos em condições sanitárias adequadas, impedindo a contaminação dos mesmos por patógenos externos que poderiam influenciar nos resultados finais.

Primeiramente foram obtidos animais produzidos sob condições sanitárias adequadas no TECPAR e transportados até o laboratório de Toxicologia Celular da UFPR. No laboratório os animais foram mantidos em estantes ventiladas estéreis ao longo de todo o experimento. A água, a ração e

o cepilho utilizados foram todos autoclavados para a manutenção da assepsia dos animais. O acesso às estantes e a manipulação dos animais foi realizado por manipuladores utilizando máscara, touca e luvas descartáveis.

Ao longo de todos os experimentos as caixas foram limpas três vezes na semana, com detergente neutro e água sanitária, e posteriormente com álcool 70%. O cepilho, a água e a ração foram substituídas por uma quantidade adequada nova e autoclavada. A cada 15 dias a estante ventilada foi lavada com sabão neutro e álcool 70%. As garrafas de água eram lavadas e autoclavadas semanalmente.

3.3 DETERMINAÇÃO DAS DOSES DE Sb_2O_3

As doses de Sb foram estabelecidas conforme a dose diária estimada para consumo humano pela WHO; esta instituição estima um consumo de cerca de 100 μg de Sb por dia para um ser humano adulto. Considerando um adulto médio de 70 Kg, a dose diária seria de aproximadamente 1,5 μg de Sb por quilograma de massa corpórea (1,5 $\mu g/kg$). Esta dose corresponde à dose de Sb que o animal deve receber por quilograma de massa corpórea diariamente. No entanto o composto estudado é o Sb_2O_3 , que contém Sb e também oxigênio em sua massa. Desta forma deve-se considerar o cálculo estequiométrico, para que a dose de Sb_2O_3 administrada contenha a quantidade de Sb desejada. Desta forma foram utilizadas 5 doses de Sb_2O_3 , que correspondem às seguintes doses de Sb:

TABELA 1. DOSE DE SB E Sb_2O_3

Dose	Dose Sb/kg/dia	Dose Sb_2O_3 /kg/dia
Dose 1	0,15 $\mu g/kg/dia$	0,17955 $\mu g/kg/dia$
Dose 2	1,5 $\mu g/kg/dia$	1,7955 $\mu g/kg/dia$
Dose 3	15 $\mu g/kg/dia$	17,955 $\mu g/kg/dia$
Dose 4	150 $\mu g/kg/dia$	179,55 $\mu g/kg/dia$
Dose 5	1500 $\mu g/kg/dia$	1795,5 $\mu g/kg/dia$

FONTE: a autora (2016).

3.4 INVESTIGAÇÃO DE DISFUNÇÃO ENDÓCRINA E/OU REPRODUTIVA

Para investigação de disfunções endócrinas e/ou reprodutivas foram realizados 3 ensaios, que seguiram a risca os protocolos propostos pela EPA. Os ensaios realizados foram: Ensaio de Hershberger, ensaio Uterotrófico, e Ensaio com machos adultos.

3.4.1 Ensaio uterotrófico

O ensaio uterotrófico foi realizado de acordo com o guia da EPA “*Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1600*”. Fêmeas foram obtidas com 19 ± 1 dias de idade (19 ± 1 dias após o nascimento) e mantidas sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas). Os animais foram alocados em caixas de poliuretano (aproximadamente 2000 cm^3) em grupos de 4 animais por caixa. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os animais foram aclimatados por 2 dias antes do início do experimento.

O experimento iniciou-se quando as fêmeas tinham 21 ± 1 dias de idade. O experimento teve duração de 3 dias consecutivos, conforme o protocolo da EPA. Nestes três dias os animais receberam diariamente uma dose de Sb_2O_3 /Estradiol/Tamoxifeno (conforme o grupo ao qual pertencem) entre as 7 e 9 h. Foram estabelecidos 9 grupos experimentais, cada um com 16 fêmeas imaturas, conforme segue:

TABELA 2. GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO UTEROTRÓFICO.

Grupo	Substância	Dose	Via
Controle	Óleo canola	5 ml/kg/dia	Oral
Estrogenicidade	17 α etinil-estradiol	0.4mg/kg/dia (dissolvido em óleo de canola)	Oral
Anti-estrogenicidade	17 α etinil-estradiol Tamoxifen	0.4 mg/kg/dia 10mg/kg/dia (dissolvido em óleo de canola)	Oral Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 1 - 0,15 μ gSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 2 - 1,5 μ gSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 3 - 15 μ gSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 4 - 150 μ gSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 5 - 1500 μ gSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃ + Estradiol	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃ 17 α etinil-estradiol	DOSE 5 - 1500 μ gSb/kg/dia 0,4 mg/kg/dia	Oral Oral

FONTE: A autora (2016).

Os animais foram mortos 24 h após a terceira exposição por deslocamento cervical, com prévia anestesia por halotano. Após a morte, o útero foi cuidadosamente removido, limpo, seco e pesado, sendo avaliados o peso total e relativo deste órgão. Após a pesagem um fragmento do útero e outro da a vagina foram processados histologicamente.

3.4.2 Ensaio de Hershberger

O ensaio de Hershberger foi realizado de acordo com o guia da EPA “*Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1400*”. Machos foram obtidos com 50 dias de idade (50 dias após o nascimento) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 3^{\circ}$.C) e luminosidade

(ciclo claro/escuro de 12 horas) no Laboratório de Bioensaios no Depto de Biologia Celular. Os animais foram alocados em caixas de poliuretano (aproximadamente 2000 cm³) em grupos de 4 animais por caixa. Os animais receberam água e ração *ad libidum*.

Após 2 dias de aclimação, a castração dos machos foi realizada. Para a castração os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xylazina (15 mg/kg), ambas injetadas intraperitonealmente, e os testículos e epidídimos foram removidos por uma incisão cirúrgica no saco escrotal utilizando material cirúrgico estéril. Após a remoção o saco foi suturado e os animais tratados com Enrofloxacino 5mg/kg (a cada 12h por 2 dias) e Cetoprofeno 5 mg/kg (a cada 24h por 3 dias) para amenizar o desconforto pós cirúrgico e evitar infecções. Os animais passaram por um período de recuperação de 7 dias para que então se iniciasse o experimento.

Foram estabelecidos 9 grupos experimentais cada um composto de 16 machos castrados, conforme segue:

TABELA 3. GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE HERSHBERGER

Grupo	Substância	Dose	Via
Controle	Óleo canola	5 ml/kg/dia	Oral
	Óleo canola	0,5 ml/kg/dia	Subcutâneo
Androgenicidade	Propionato testosterona	0,4 mg/kg/dia	Subcutâneo
	Óleo canola	5 ml/kg/dia	Oral
Anti-androgenicidade	Flutamida	3 mg/kg/dia	Oral
	Propionato testosterona	0,4 mg/kg/dia	Subcutâneo
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 1 – 0,15µgSb/kg/dia	Oral
	Óleo canola	0,5 ml/kg/dia	Subcutâneo
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 2 – 1,5µgSb/kg/dia	Oral
	Óleo canola	0,5 ml/kg/dia	Subcutâneo
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 3 - 15µgSb/kg/dia	Oral
	Óleo canola	0,5 ml/kg/dia	Subcutâneo
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 4 - 150µgSb/kg/dia	Oral
	Óleo canola	0,5 ml/kg/dia	Subcutâneo
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 5 - 1500µgSb/kg/dia	Oral
	Óleo canola	0,5 ml/kg/dia	Subcutâneo
Sb ₂ O ₃	Solução aquosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 5 - 1500µgSb/kg/dia	Oral
	Testosterona Propionato Testosterona	0,4mg/kg/dia	Subcutâneo

FONTE: A autora (2016).

A exposição ocorreu diariamente entre as 7- 9 h durante um período de 10 dias. Os animais foram mortos 24h após a última dose. Previamente a morte, os animais foram anestesiados com halotano e decapitados. Logo após a morte, o animal foi dissecado e foram avaliados os seguintes pesos conforme sugere o ensaio proposto pela EPA: próstata, vesícula seminal, músculo levantador do ânus, glândea peniana, adrenais pareadas, hipófise e tireóide.

Conjuntamente uma parte da tireóide e adrenal direita foram processados histologicamente.

O sangue foi coletado e processado para obtenção do plasma, que foi armazenado a -80°C e será utilizado para a mensuração futura de LH, testosterona, estradiol, T3 e T4, através de ensaios de ELISA.

3.4.3 Ensaio com machos adultos por 15 dias

O ensaio com machos adultos foi realizado de acordo com o guia da EPA “*Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines – 15-day adult male rat assay*”). Os animais necessários para este ensaio foram obtidos com 67 ± 1 dias de idade e mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas). Os animais foram alocados em caixas de poliuretano (aproximadamente 2000 cm^3) em grupos de 3 animais por caixa, totalizando 15 animais por grupo. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os animais foram aclimatados por 3 dias antes do início do experimento.

Os animais foram gavados por 15 dias consecutivos com o veículo ou com a solução de Sb o entre as 9h e 11h.

Foram estabelecidos 6 grupos experimentais conforme segue:

TABELA 4. GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO COM MACHOS ADULTOS

Grupo	Substância	Dose	Via
Controle	Óleo canola	5ml/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 1 - 0,15µgSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 2 - 1,5µgSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 3 - 15µgSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 4 - 150µgSb/kg/dia	Oral
Sb ₂ O ₃	Solução oleosa de Sb ₂ O ₃	DOSE 5 - 1500µgSb/kg/dia	Oral

No 15^o. dia de exposição, 2h após a última exposição, os animais foram mortos por decapitação com anestesia prévia por halotano.

Logo após a morte os seguintes tecidos foram dissecados e tiveram suas massas mensuradas: hipófise, tireóide, adrenais, próstata, vesícula seminal, músculo levantador do ânus, epidídimos, testículos e da glândula peniana.

Conjuntamente um fragmento da próstata e outro da vesícula, o testículo direito, adrenal direita e uma parte da tireoide foram processados histologicamente. Foi também coletado o sangue que foi processado para obtenção do soro, que será utilizado futuramente para a mensuração de testosterona, estradiol, progesterona, TSH e T4 através de ensaios de ELISA.

Um fragmento do testículo foi armazenado a -80^o.C para análises bioquímicas posteriores.

3.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os tecidos coletados para análises histológicas foram mantidos em solução fixadora de Alfac (formol, álcool e ácido acético glacial) por 16 horas, armazenados em álcool 70% e posteriormente sofreram processamento histológico, no qual o material foi desidratado em série crescente de etanol,

diafanizado em xilol e incluído e emblocado em Paraplast (Sigma®). Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo e distendidos em lâminas de vidro com o auxílio de uma placa aquecedora. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, sendo que nesta técnica os núcleos que possuem grande quantidade de moléculas ácidas se coram com hematoxilina, adquirindo tons arroxeados e citoplasma, rico em substâncias básicas, se cora com eosina, adquirindo tons rosados.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS TESTICULARES

As amostras de tecidos acondicionado em -80°C foram homogeneizadas em tampão fosfato Tris-HCl em pH 7,6, contendo 1mM de EDTA e 1mM de PMSF, e centrifugadas a 12000 g, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a realização dos seguintes ensaios:

- Peroxidação de lipídios: A quantidade de lipídeos peroxidados foi quantificado segundo JIANG et al. (1991, 1992) pelo método FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange*).

-Carbonilação de proteínas: A carbonilação proteica foi quantificada segundo LEVINE et al., (1994).

-Concentração de glutathiona reduzida (GSH): A concentração de glutathiona reduzida foi quantificada segundo SEDLAK e LINDSAY, (1968). A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8,16, 24 e 32 nM GSH).

-Atividade da enzima Glutathiona S-transferase: A atividade da GST foi mensurada pelo método de KEEN (1976) onde GST catalisa a reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 340 nm.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

Para todos os dados foi primeiramente testada a normalidade através dos testes D'Agostinho & Pearson, Shapiro Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados apresentaram distribuição Gaussiana foi então aplicado o

teste de ANOVA 1 via seguido do pós teste de Tukey. Quando os dados não apresentavam distribuição Gaussiana foi aplicado o teste de Kruska-Wallis seguido do pós-teste Dunn.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO UTEROTRÓFICO

O tempo de exposição deste ensaio pode ser considerado uma exposição aguda, já que a mesma durou apenas 3 dias. No entanto no período da vida em que os animais se encontravam, logo após o desmame, pode representar um período crítico para a exposição, visto a sensibilidade dos animais nesta fase. Em humanos esta fase corresponderia ao início da puberdade (Barlas et al., 2014).

De um modo geral não foram observados sinais de toxicidade clínica, tais como diarreia, dispneia, alterações motoras e /ou comportamentais ao longo do experimento. Houve mortalidade de 1 animal em cada um dos grupos experimentais, possivelmente devido a algum erro no procedimento de gavagem.

Durante a autópsia, foram verificados diversos animais, distribuídos homogeneamente entre os grupos com dilatação da pelve renal e hidronefrose. Tais alterações serão tratadas com maiores detalhes no segundo capítulo desta tese.

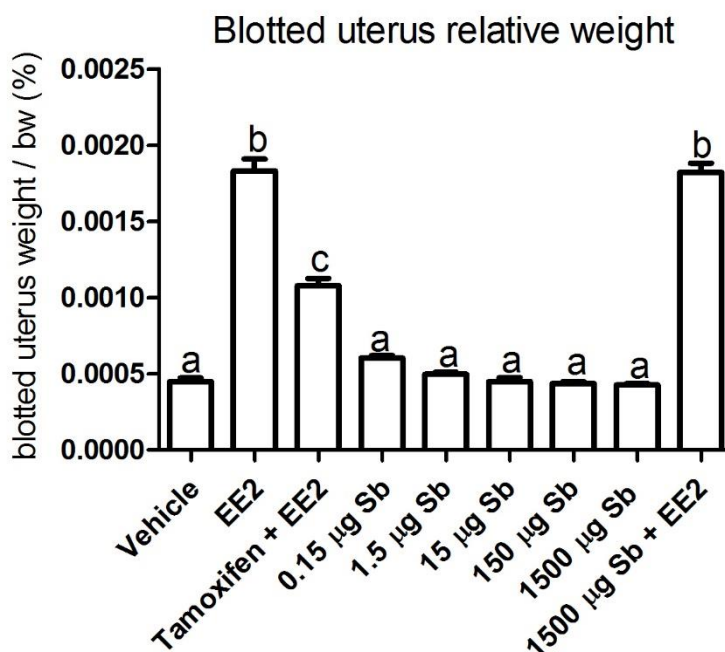
O objetivo principal deste ensaio é avaliar efeitos estrogênicos, por isto o dado referente ao peso do útero é o mais relevante para este ensaio. De menor relevância, porém ainda muito esclarecedor, são os dados referentes a histologia do útero e da vagina.

O peso do útero aumentou no grupo exposto ao estradiol em relação ao grupo exposto apenas ao veículo, demonstrando que os animais foram sensíveis à desregulação endócrina estrogênica, conforme esperado para o presente teste e já demonstrado por diversos autores (BARLA et al., 2014, DIXON et al., 2012). O grupo exposto conjuntamente ao estradiol e ao tamoxifeno teve como objetivo avaliar se os animais eram sensíveis ao efeito anti-estrogênico do tamoxifeno, ou seja, para avaliar se o tamoxifeno seria capaz de bloquear os efeitos do estradiol. Neste caso o peso do útero apresentou-se aumentado em relação ao grupo controle porém diminuído em relação ao grupo exposto apenas ao estradiol, demonstrando que os animais

foram sensíveis ao efeito anti-estrogênico do tamoxifeno. Zaho e colaboradores (2011), validando os protocolos de ensaios de disfunção endócrina propostos pela EPA, relatam o efeito antagonista parcial do tamoxifeno em relação ao estradiol, embora a dose de tamoxifeno seja 2.5 vezes mais alta que a do estrogênio.

Todos os grupos expostos ao Sb não apresentaram alteração no peso do útero em relação ao grupo controle, demonstrando que o Sb não possui propriedades estrogênicas (figura 1). Para testar o potencial anti-estrogênico do Sb foi estabelecido um grupo exposto concomitantemente a maior dose de Sb e ao estradiol. O Sb não foi capaz de bloquear o efeito do estradiol em relação ao aumento do peso do útero: neste caso o peso do útero apresentou-se aumentado em relação ao grupo controle, porém foi similar ao peso dos animais tratados apenas com estradiol. Desta forma, com relação ao peso do útero, o Sb não apresentou propriedades estrogênicas nem anti-estrogênicas

FIGURA 1. MASSA RELATIVA DO ÚTERO.



FONTE: A autora (2016).

Vehicle: animais expostos apenas ao óleo de canola (grupo controle); EE2: Animais expostos a 0,4 mg de 17 α etinil-estradiol/kg; Tamoxifen+EE2: Animais expostos 10 mg de tamoxifeno/kg e posteriormente a 0,4 mg de 17 α etinil-estradiol/kg; 0.15 μ g Sb: animais expostos a 0,15 μ g Sb/kg; 1,5 μ g Sb: animais expostos a 1,5 μ g Sb/kg; 15 μ g Sb: animais expostos a 15 μ g Sb/kg;

150 µg Sb: animais expostos a 150 µg Sb/kg; 1500 µg Sb: animais expostos a 1500 µg Sb/kg; 1500 µg Sb + EE2: animais expostos a 1500 µg Sb/kg e posteriormente a 0,4 mg de 17αetnil-estradiol l/kg. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Até o presente momento, não havia estudos correlacionando a exposição a Sb com disfunções endócrinas. No entanto, aumento no peso do útero de animais expostos ao cádmio, seguindo o mesmo procedimento experimental deste trabalho, demonstram a possibilidade de um metal agir como desregulador endócrino (Zhang et al., 2007).

O ensaio uterotrófico é um experimento in vivo que identifica possíveis mecanismos de ação estrogênica bem como anti-estrogênica. A ausência de dados que confirmem a disfunção endócrina causada pelo Sb, não exclui a possibilidade do mesmo exercer efeitos (anti)estrogênicos. Segundo Barla et al. (2014) ensaios in vitro, como por exemplo o YES (yeast estrogen screen), devem também ser realizados para excluir definitivamente a possibilidade de ausência de efeitos desreguladores endócrinos

Com relação a análise histológica do útero, os animais expostos ao estradiol apresentaram um espessamento do endométrio, do miométrio, hipertrofia das células endometriais e hiperplasia glandular (Figura 2; Tabela 5). Os animais expostos à combinação estradiol+tamoxifeno tiveram alterações semelhantes as descritas para o grupo exposto ao estradiol, porém menos pronunciadas visto o efeito antagonista do tamoxifeno sobre o estradiol. Já os animais expostos ao antimônio não apresentaram alterações uterinas de caráter estrogênico nem antiestrogênico. A tabela 5 demonstra o tipo e a frequência das alterações em cada grupo.

A análise histológica da vagina dos animais expostos ao estradiol demonstrou hiperplasia do epitélio escamoso estratificado da vagina, cornificação do epitélio, com deposição de várias camadas de queratina em relação ao grupo controle. Estas alterações também foram evidenciadas nos animais expostos à combinação estradiol+tamoxifeno, porém de forma muito mais sutil. Nenhum dos grupos expostos ao Sb demonstrou alterações histológicas na vagina correlacionadas aos efeitos (anti)estrogênicos. A

frequência de alterações histológicas em cada grupo experimental estão demonstradas na tabela 5 e as alterações ilustradas na figura 3.

TABELA 5. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS UTERINAS.

Útero	Controle	EE2	EE2+Tamox	0.15	1.5	15	150	1500	EE2+1500
Espessamento do endométrio	0(10)	10(10)	10(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	10(10)
Hipertrofia das células epiteliais endometriais	0(10)	10(10)	10(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	10(10)
Hiperplasia das glândulas endometriais	0(10)	10(10)	10(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	10(10)

FONTE: A autora (2016).

Controle: animais expostos apenas ao óleo de canola (grupo controle); EE2: Animais expostos a 0,4 mg de 17 α etnil-estradiol/kg; Tamoxifen+EE2: Animais expostos 10 mg de tamoxifeno/kg e posteriormente a 0,4 mg de 17 α etnil-estradiol/kg; 0.15 μ g Sb: animais expostos a 0,15 μ g Sb/kg; 1,5 μ g Sb: animais expostos a 1,5 μ g Sb/kg; 15 μ g Sb: animais expostos a 15 μ g Sb/kg; 150 μ g Sb: animais expostos a 150 μ g Sb/kg; 1500 μ g Sb: animais expostos a 1500 μ g Sb/kg; 1500 μ g Sb + EE2: animais expostos a 1500 μ g Sb/kg e posteriormente a 0,4 mg de 17 α etnil-estradiol l/kg.

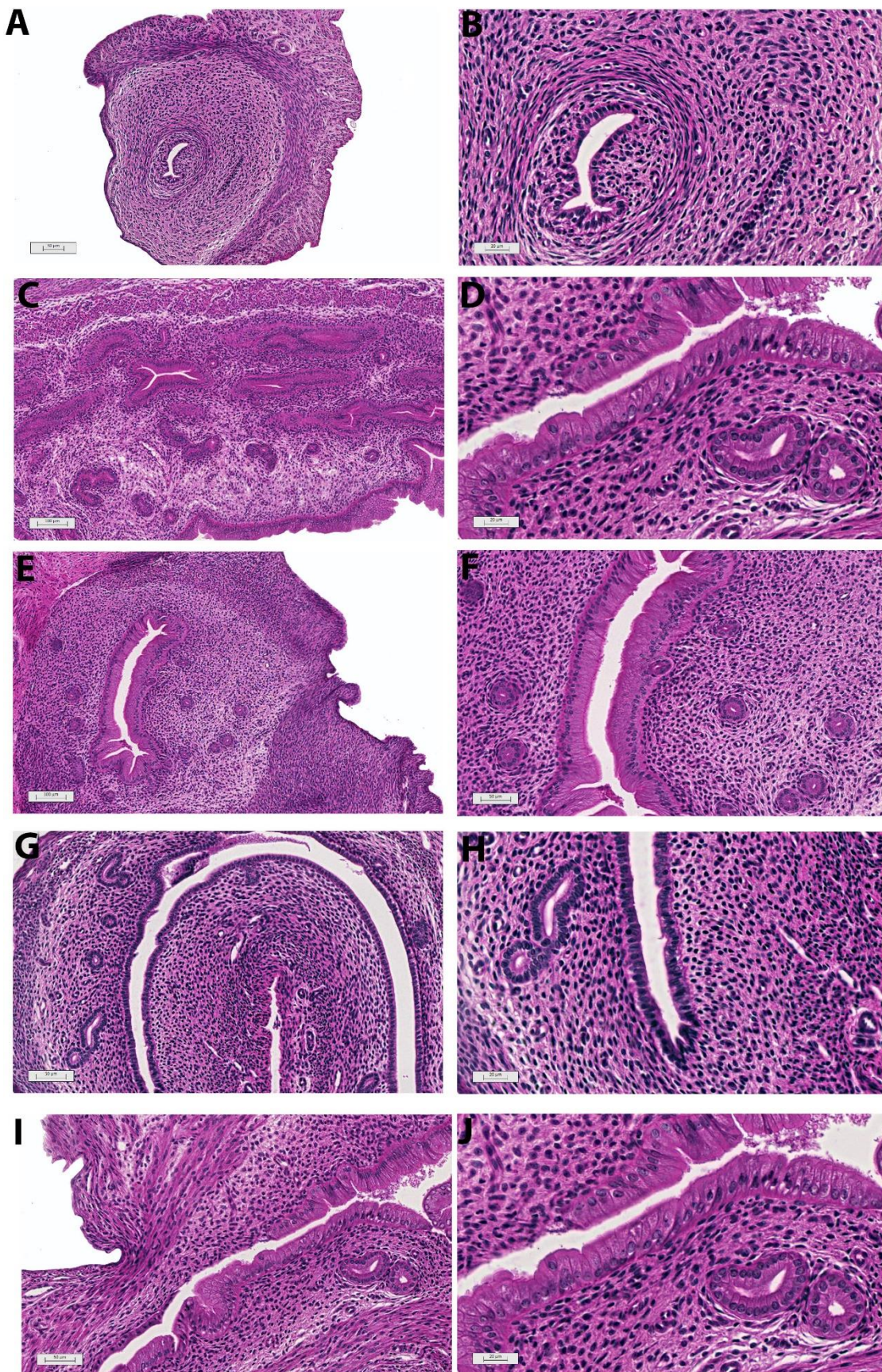
TABELA 6. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS VAGINAIS.

Vagina	Controle	EE2	EE2+Tamox	0.15	1.5	15	150	1500	EE2+1500
Hiperplasia do epitélio escamoso estratificado	0(10)	10(10)	10(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	10(10)
Queratinização epitélio vagina	0(10)	10(10)	10(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	10(10)
Edema da lamina própria	0(10)	10(10)	10(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	10(10)

FONTE: A autora (2016).

Controle: animais expostos apenas ao óleo de canola (grupo controle); EE2: Animais expostos a 0,4 mg de 17 α etnil-estradiol/kg; Tamoxifen+EE2: Animais expostos 10 mg de tamoxifeno/kg e posteriormente a 0,4 mg de 17 α etnil-estradiol/kg; 0.15 μ g Sb: animais expostos a 0,15 μ g Sb/kg; 1,5 μ g Sb: animais expostos a 1,5 μ g Sb/kg; 15 μ g Sb: animais expostos a 15 μ g Sb/kg; 150 μ g Sb: animais expostos a 150 μ g Sb/kg; 1500 μ g Sb: animais expostos a 1500 μ g Sb/kg; 1500 μ g Sb + EE2: animais expostos a 1500 μ g Sb/kg e posteriormente a 0,4 mg de 17 α etnil-estradiol l/kg.

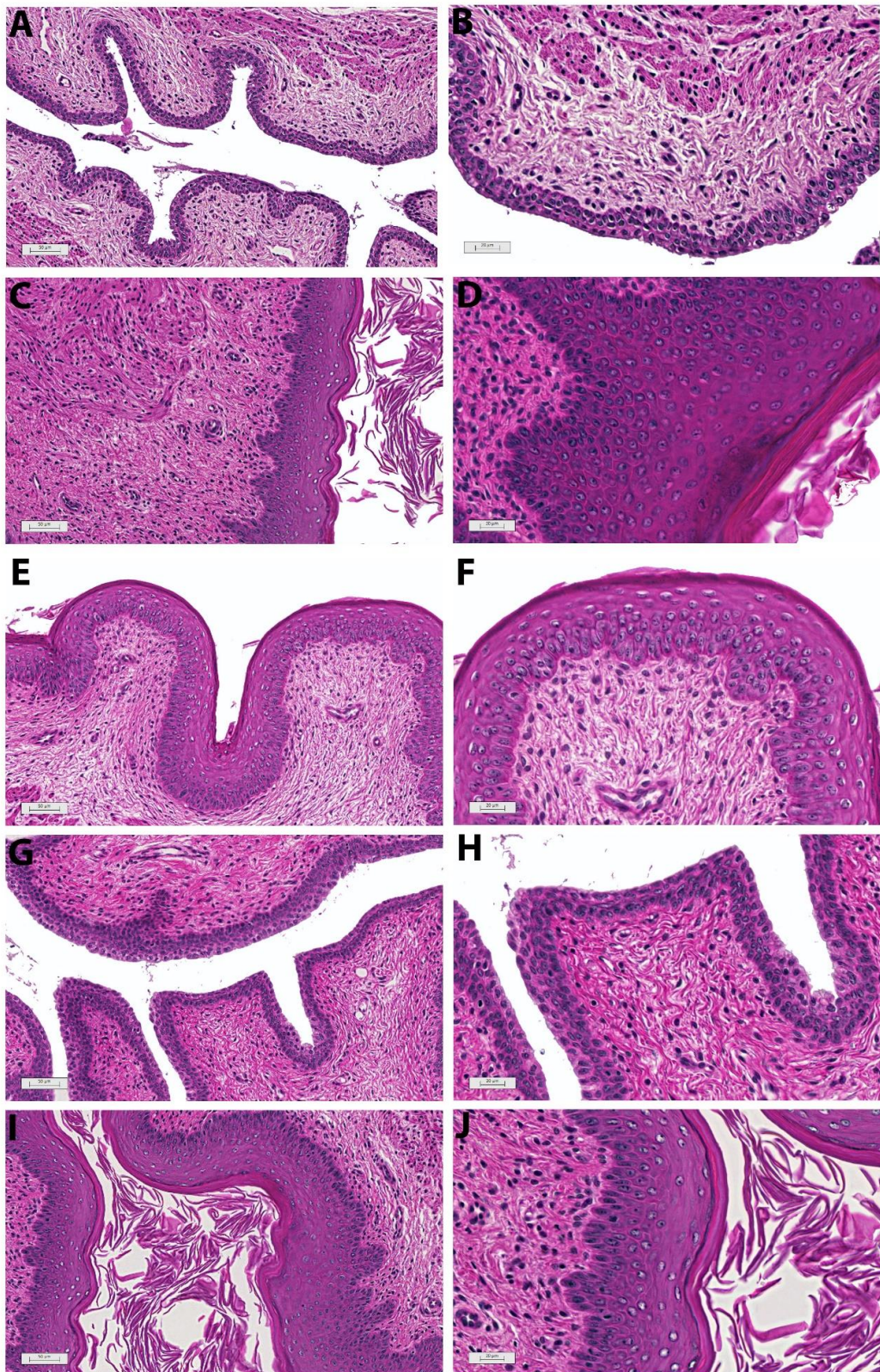
FIGURA 2. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS UTERINAS.



FONTE: A autora (2016).

Figura 2: A e B: útero de animal controle. C e D: útero de animal exposto ao estradiol (observar aumento do número de glândulas e hipertrofia das células do endométrio). E e F: útero de animal exposto ao estradiol+tamoxifeno (observar aumento do número de glândulas e hipertrofia das células do endométrio, porém menos intensas em relação às observadas nos animais expostos somente ao estradiol). G e H: útero de animal exposto ao antimônio (não houve alterações morfológicas entre os grupos expostos). I e J: útero de animal exposto ao antimônio na maior dose combinado com estradiol (observar aumento do número de glândulas e hipertrofia das células do endométrio).

FIGURA 3. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS
VAGINAIS.



FONTE: A autora (2016).

Figura 3: A e B: vagina de animal controle. C e D: vagina de animal exposto ao estradiol (observar aumento do número de camadas de células epiteliais hipertrofiadas e a espessa camada de queratina sobre as mesmas). E e F: vagina de animal exposto ao estradiol+tamoxifeno (observar aumento do número de camadas de células epiteliais hipertrofiadas e a espessa camada de queratina sobre as mesmas, porém menos intensas em relação às observadas nos animais expostos somente ao estradiol). G e H: vagina de animal exposto ao antimônio (não houve alterações morfológicas entre os grupos expostos). I e J: vagina de animal exposto ao antimônio na maior dose combinado com estradiol (observar aumento do número de camadas de células epiteliais hipertrofiadas e a espessa camada de queratina sobre as mesmas).

As alterações uterinas e vaginais correlacionados à exposição ao estradiol e a combinação estradiol+tamoxifeno estão dentro do esperado para estes grupos experimentais e já foram comprovadas por outros autores que atuaram na validação de ensaios uterotróficos (DIXON et al., 2012; KYIAMA et al., 2015). Zhan e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição ao metal Cd aumenta a espessura do epitélio luminal e do endométrio uterinos, demonstrando a possibilidade de um metal agir como desregulador endócrino, diferentemente do que foi demonstrado para o metal Sb. Shameem et al., (2015) demonstram a habilidade do As, Ld, Hg e Pb em alterar a morfologia de órgãos endócrinos, como a tireóide, adrenal, hipófise e pâncreas, mas não a morfologia uterina e vaginal.

4.2 EXPERIMENTO DE HERSHBERGER

A relação entre os pesos total da hipófise, tireoide e adrenais e o peso corpóreo de não apresentou diferença significativa entre os grupos testados (TABELA 7). Vesícula seminal, próstata e músculo levantador do ânus e glândula peniana apresentaram a relação massa órgão/ massa corpórea aumentada no grupo exposto a testosterona em relação ao grupo controle, indicando que estes tecidos são suscetíveis a desregulação endócrina androgênica. Quando comparamos os grupos testosterona e testosterona+flutamida, verifica-se uma diminuição da massa da vesícula seminal, próstata e músculo levantador do ânus e glândula peniana neste último grupo, demonstrando a suscetibilidade a

desregulação endócrina anti-androgênica. Essa diminuição não foi o suficiente para retornar aos valores semelhantes aos do grupo controle, indicando um mecanismo de antagonismo parcial da flutamida em relação a testosterona. Estes resultados confirmam o esperado conforme descrito por Liu e colaboradores (2011), que validaram os protocolos para o ensaio de Hershberger.

Não houve alteração significativa nas massas destes órgãos em todos os animais expostos ao Sb, indicando que o mesmo não possui propriedades androgênicas. Quando comparados os grupos expostos a testosterona+flutamida e testosterona+1500 µg Sb, verifica-se em ambos um aumento no peso dos órgãos supracitados, semelhante ao observado no grupo exposto somente a testosterona, indicando que o Sb não possui propriedades anti-androgênicas semelhantes as da flutamida (tabela 7, Figura 4).

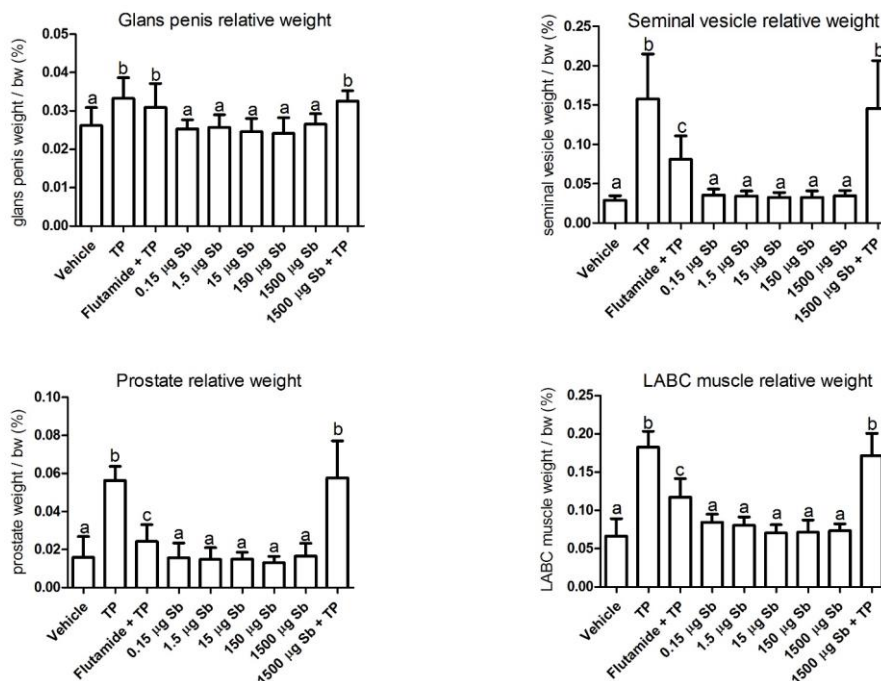
TABELA 7. ÍNDICES SOMÁTICOS.

	Controle	TP	TP + Fluta.	0.15 µg	1.5 µg	15 µg	150 µg	1500 µg	1500 µg+TP
Hipófise	0.0037±0.00056	0.0032±0.00082	0.0035±0,0006	0.0033±0.00059	0.0034±0.001	0.0035±0.00053	0.0037±0.00068	0.0035±0.00096	0.003±0.00067
Tireóide	0.0038±0.00089	0.0042±0.0012	0,0038±0.00089	0.0041±0.0011	0.0042±0.0013	0.004±0.0012	0.0043±0.0011	0.0044±0.0012	0.0045±0.0011
Adrenal	0.01±0.0015	0.0094±0.0017	0.0098±0.0021	0.01±0.0015	0.01±0.0009	0.01±0.0011	0.01±0.0013	0.01±0.0009	0.0094±0.0014
Glande penina	0.026±0.0047	0.033±0.0054 ^b	0.031±0.0062 ^b	0.025±0.0023	0.026±0.0033	0.025±0.0034	0.024±0.0041	0.026±0.0027	0.032±0.0027 ^b
Vesícula seminal	0.029±0.0059	0.16±0.057 ^a	0.081±0.03 ^b	0.036±0.008	0.034±0.0063	0.033±0.0061	0.033±0.0085	0.035±0.0067	0.14±0.061 ^a
Prostata	0.016±0.011	0.056±0.007 ^a	0.024±0.0089 ^b	0.016±0.0077	0.015±0.0062	0.015±0.0037	0.013±0.0033	0.017±0.0067	0.061±0.028 ^a
Músculo levantador ânus	0.066±0.023	0.18±0.021 ^a	0.12±0.024 ^b	0.084±0.011	0.08±0.011	0.07±0.011	0.071±0.016	0.073±0.0089	0,17±0.029 ^a

FONTE: A autora (2016).

Controle: animais expostos apenas ao óleo de canola (grupo controle); TP: Animais expostos a 0,4 mg de propionato de testosterona/kg; TP+Fluta: Animais expostos 3 mg de futamida/kg e posteriormente a 0,4 mg de propionato de testosterona /kg; 0.15 µg Sb: animais expostos a 0,15 µg Sb/kg; 1.5 µg Sb: animais expostos a 1,5 µg Sb/kg; 15 µg Sb: animais expostos a 15 µg Sb/kg; 150 µg Sb: animais expostos a 150 µg Sb/kg; 1500 µg Sb: animais expostos a 1500 µg Sb/kg; 1500 µg Sb + TP: animais expostos a 1500 µg Sb/kg e posteriormente a 0,4 mg de propionato de testosterona l/kg. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

FIGURA 4. MASSAS RELATIVAS.



FONTE: A autora (2016).

Vehicle: animais expostos apenas ao óleo de canola (grupo controle); TP: Animais expostos a 0,4 mg de propionato de testosterona/kg; TP+Fluta: Animais expostos 3 mg de futamida/kg e posteriormente a 0,4 mg de propionato de testosterona /kg; 0.15 µg Sb: animais expostos a 0,15 µg Sb/kg; 1.5 µg Sb: animais expostos a 1,5 µg Sb/kg; 15 µg Sb: animais expostos a 15 µg Sb/kg; 150 µg Sb: animais expostos a 150 µg Sb/kg; 1500 µg Sb: animais expostos a 1500 µg Sb/kg; 1500 µg Sb + TP: animais expostos a 1500 µg Sb/kg e posteriormente a 0,4 mg de propionato de testosterona l/kg. Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

lavicoli et al., (2009), demonstraram os efeitos de diversos metais (Cd, As, Pb, Mn e Zn) sobre o sistema endócrino e reprodutivos de ratos machos. No entanto os estudos com metais referem-se mais a toxicologia geral e sistêmica e não são direcionados às disfunções endócrinas, demonstrando a importância do presente trabalho e a necessidade do estudo do potencial desregulador endócrino de uma gama maior de metais.

Neste experimento foi avaliada apenas a histologia da tireoide, visto ser este um dos órgãos de preferencial biocamululação do Sb. A adrenal também é um órgão preferencial de bioacumulação do Sb, no entanto não foi possível avaliar sua histologia devido ao plano de emblocagem e de corte utilizados não

se mostrarem adequados para esta finalidade. Para que fosse possível avaliar a histologia da adrenal, seria necessário desbastar os blocos histológicos até aproximadamente a região central do tecido e então refazer todas as lâminas, pois somente assim seria possível avaliar as diferentes regiões que compõe este órgão. A remoção dos testículos neste ensaio, fez com que ocorresse uma regressão da próstata e da vesícula seminal, tornando muitas vezes inviável a análise histológica destes tecidos por não haver material suficiente.

Baseado em outros estudos sobre alterações histológicas tireoideanas (OKAN et al., 2015; XI et al., 2013) foram estabelecidas as seguintes alterações: proliferação do epitélio folicular, vacuolização do colóide, vacuolização das células do epitélio folicular, desorganização dos folículos, necrose folicular, presença de diferentes tipos celulares intracelular e proliferação de células mononucleares.

Dentre as alterações consideradas as desorganizações foliculares foram mais frequentes nos animais expostos ao PT, PT+flutamida, 0,15 µg de Sb e PT + 1500 µg de Sb. As vacuolizações foliculares foram mais pronunciadas nos animais expostos a PT,15 e 150 µg de Sb. As necroses foram mais comuns nos animais expostos a 15 µg de Sb enquanto que a presença de células intracelulares foi mais marcante nos animais expostos a 0,15 µg de Sb (Tabela 8, Figura 5)

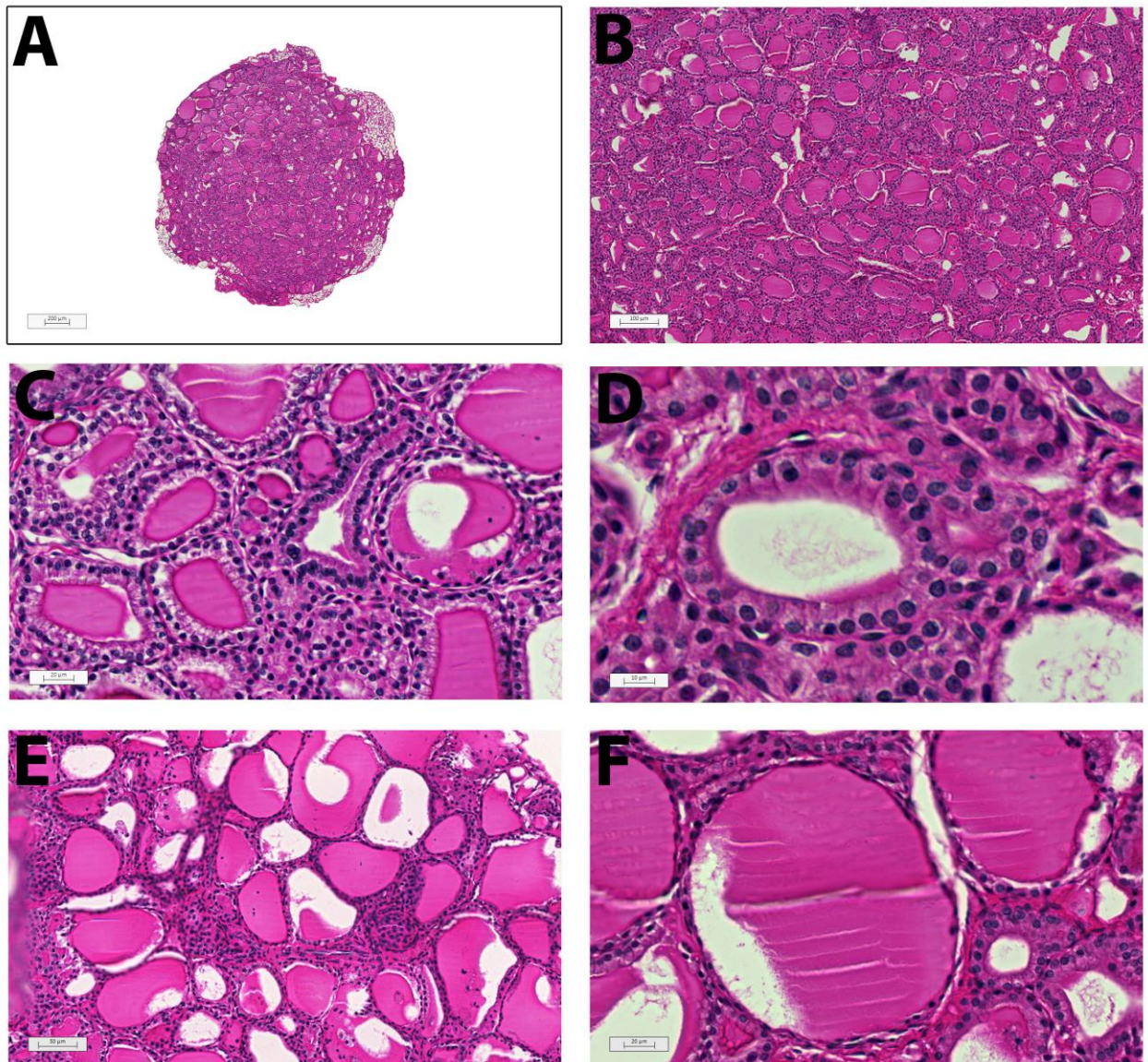
TABELA 8. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA TIREÓIDE DOS ANIMAIS REFERENTES AO EXPERIMENTO DE HERSHBERGER.

Tireóide	Controle	PT	PT+Flutamide	0.15	1.5	15	150	1500	PT+1500
Desorganização folicular	1(10)	4(10)	4(10)	2(10)	2(10)	6(10)	2(10)	4(10)	8(10)
Vacuolização colóide	0(10)	6(10)	2(10)	2(10)	0(10)	4(10)	4(10)	0(10)	2(10)
Necrose	0(10)	2(10)	4(10)	2(10)	0(10)	6(10)	2(10)	2(10)	4(10)
Presença de células dentro do colóide	0(10)	0(10)	0(10)	4(10)	2(10)	2(10)	0(10)	2(10)	3(10)

FONTE: A autora (2016).

Controle: animais expostos apenas ao óleo de canola (grupo controle); TP: Animais expostos a 0,4 mg de propionato de testosterona/kg; TP+Fluta: Animais expostos 3 mg de futamida/kg e posteriormente a 0,4 mg de propionato de testosterona /kg; 0.15 µg Sb: animais expostos a 0,15 µg Sb/kg; 1.5 µg Sb: animais expostos a 1,5 µg Sb/kg; 15 µg Sb: animais expostos a 15 µg Sb/kg; 150 µg Sb: animais expostos a 150 µg Sb/kg; 1500 µg Sb: animais expostos a 1500 µg Sb/kg; 1500 µg Sb + TP: animais expostos a 1500 µg Sb/kg e posteriormente a 0,4 mg/Kg de propionato de testosterona.

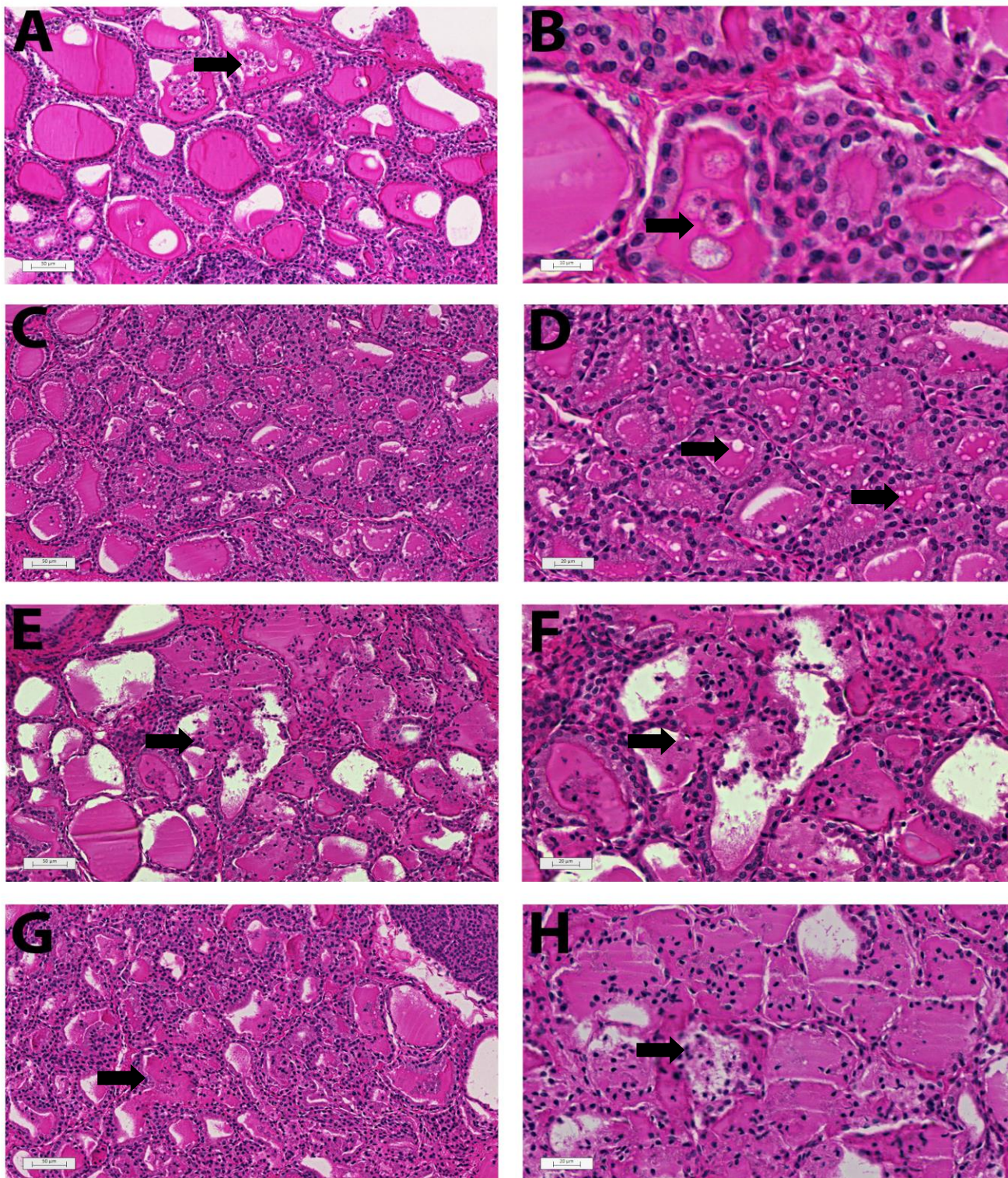
FIGURA 5. TIREOIDE NORMAL.



FONTE: A autora (2016).

A: Visão geral de uma tireoide inteira. B: Visão geral da estrutura do tecido tireoideano com seus folículos. C e D: Folículos ativos, caracterizados pelo epitélio folicular de cúbico a cilíndrico. E e F: Folículos inativos, caracterizados pelo maior tamanho quando comparados aos folículos ativos, epitélio folicular pavimentoso e pela grande quantidade de colóide no interior.

FIGURA 6. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA TIREOIDE.



FONTE: A autora (2016).

A e B: Presença de células dentro do colóide (seta). C e D: Vacuolização do colóide (seta). E e F: Necrose folicular (seta). G e H: Desorganização folicular.

Dentre as lesões avaliadas as que mais preocupam, por comprometerem o funcionamento do órgão são as necroses e as desorganizações foliculares. Em ambos os casos as unidades fundamentais da tireoide perdem sua capacidade de agir corretamente, comprometendo a produção hormonal desta glândula. Alguns metais já são conhecidamente tóxicos para a tireoide, entre eles o As, que pertence a mesma família do Sb (Abdul et al., 2015). Segundo este autor a forma de interação entre o antimônio e a tireoide não estão bem estabelecidas, mas sabe-se que existe uma correlação positiva entre a exposição ocupacional de trabalhadores ao As e efeitos sobre a glândula e os hormônios por ela secretados. Segundo proposto por Abdul e colaboradores os dois possíveis mecanismos pelos quais o As altera o funcionamento da tireoide são: através do bloqueio da síntese hormonal nesta glândula e pela morte dos folículos.

Os efeitos mais pronunciados sobre a tireoide se manifestaram nos indivíduos expostos ao TP e ao TP+1500 µg Sb, indicando que os hormônios esteroides tem um papel importante na toxicidade tireoideana. Rajab et al. (2015) relataram a influência hormonal sobre a toxicidade tireoideana, demonstrando que concentrações crescentes de hormônios afetam a morfologia desta glândula, levando a perda de sua função.

4.3 EXPERIMENTO COM MACHOS ADULTOS

Este ensaio avaliou o peso relativo dos seguintes órgãos: hipófise, tireoide, adrenais, glândula peniana, próstata, vesícula seminal, testículos, epidídimos e músculo levantador do ânus. Para todos estes parâmetros avaliados, não houve diferença significativa entre os animais expostos e o grupo controle. Este dado é um indicativo de que na fase adulta, após a maturação sexual já ter se completado os animais não são suscetíveis a possíveis alterações endócrinas e reprodutivas correlacionadas à exposição do antimônio (Tabela 9).

TABELA 9. ÍNDICES SOMÁTICOS.

	Controle	0,15 µg Sb	1,5 µg Sb	15 µg Sb	150 µg Sb	1500 µg Sb
Hipófise	0.002763±0.00025	0.002841±0.00043	0.02887±0.00039	0.002741±0.00053	0.002615±0.00053	0.002795±0.00045
Tireoide	0.005076±0.0015	0.004895±0.0013	0.004774±0.001	0.004449±0.00064	0.004437±0.00073	0.004567±0.0014
Glande peniana	0.03109±0.0039	0.03098±0.0039	0.03075±0.0054	0.03129±0.0042	0.02687±0.0082	0.02863±0.0075
Adrenal	0.005747±0.0015	0.005447±0.00083	0.005388±0.0014	0.00597±0.0012	0.0058±0.0013	0.006036±0.0016
Testículos	0.4226±0.071	0.4436±0.042	0.4359±0.038	0.4637±0.044	0.4395±0.043	0.4582±0.039
Epidídimo	0.136±0.012	0.1308±0.012	0.1314±0.011	0.1351±0.019	0.1294±0.012	0.1365±0.011
Vesícula seminal	0.1260±0.031	0.1210±0.027	0.1296±0.033	0.1239±0.024	0.1292±0.03	0.1367±0.026
Próstata	0.07885±0.016	0.08079±0.018	0.08448±0.015	0.08302±0.023	0.08858±0.027	0.08082±0.016
Musculo levantador do ânus	0.1887±0.023	0.1991±0.029	0.1995±0.033	0.1834±0.023	0.1971±0.033	0.1915±0.026

FONTE: A autora (2016).

Controle: animais expostos apenas ao óleo de canola; 0,15 µg Sb: animais expostos a 0,15 µg Sb/kg; 1,5 µg Sb: animais expostos a 1,5 µg Sb/kg; 15 µg Sb: animais expostos a 15 µg Sb/kg; 150 µg Sb: animais expostos a 150 µg Sb/kg; 1500 µg Sb: animais expostos a 1500 µg Sb/kg.

Recentemente Hampl e colaboradores (2016) revisaram os efeitos de diversas substâncias sobre o sistema endócrino e reprodutivo de machos adultos. Dentre as substâncias avaliadas nenhuma delas era um metal, demonstrando a necessidade de estudos sobre o efeito de metais sobre a toxicologia endócrina e/ou reprodutiva.

Kyiyama et al. (2015) revisaram os efeitos de 450 substâncias sobre o sistema endócrino e reprodutivo. Dentre as que mostraram propriedades desreguladoras endócrinas estão: As, Cd, Co, Pb, Hg e Zn. No entanto a maioria dos estudos por eles revisados eram *in vitro*, dificultado a extrapolação destes dados para o organismo como um todo. Mesmo assim, em nenhuma das citadas revisões aparece o Sb como desregulador, seja por este não possuir este tipo de propriedade ou seja por não haverem estudos relatando esta propriedade para este metal.

Assim como citado para o ensaio de Hershberger, apenas a avaliação dos pesos de órgãos não é o suficiente para responder se há ou não disfunção endócrina associada a exposição ao Sb, sendo necessários avaliar outros padrões. Neste quesito foram também avaliadas as alterações histológicas na tireoide, testículos, vesícula seminal e próstata. Pelas mesmas razões discutidas anteriormente, não foi avaliada a histologia da adrenal.

Em relação às alterações histológicas na tireoide, houve uma maior desorganização folicular nos animais expostos a 15 e 150 μg Sb/kg e maior incidência de necroses nos animais expostos a 1.5 e 15 μg Sb/kg (Tabela 10). As discussões feitas em relação aos dados de lesões tireoideanas para o ensaio de Hershberger, aplicam-se também ao presente ensaio.

Com relação a morfologia dos testículos diversos parâmetros foram avaliados diversos tais como: presença de túbulos atróficos, ausência de células reprodutivas dentro dos túbulos, túbulos apenas com células germinativas, necrose tubular e obliteração dos túbulos. Dentre as alterações citadas, foram observadas apenas obliterações toais e/ou parciais e necroses em todos os grupos expostos ao Sb, sendo estas últimas mais frequente em animais expostos a 15 μg Sb/kg (Tabela 10, Figura 7)

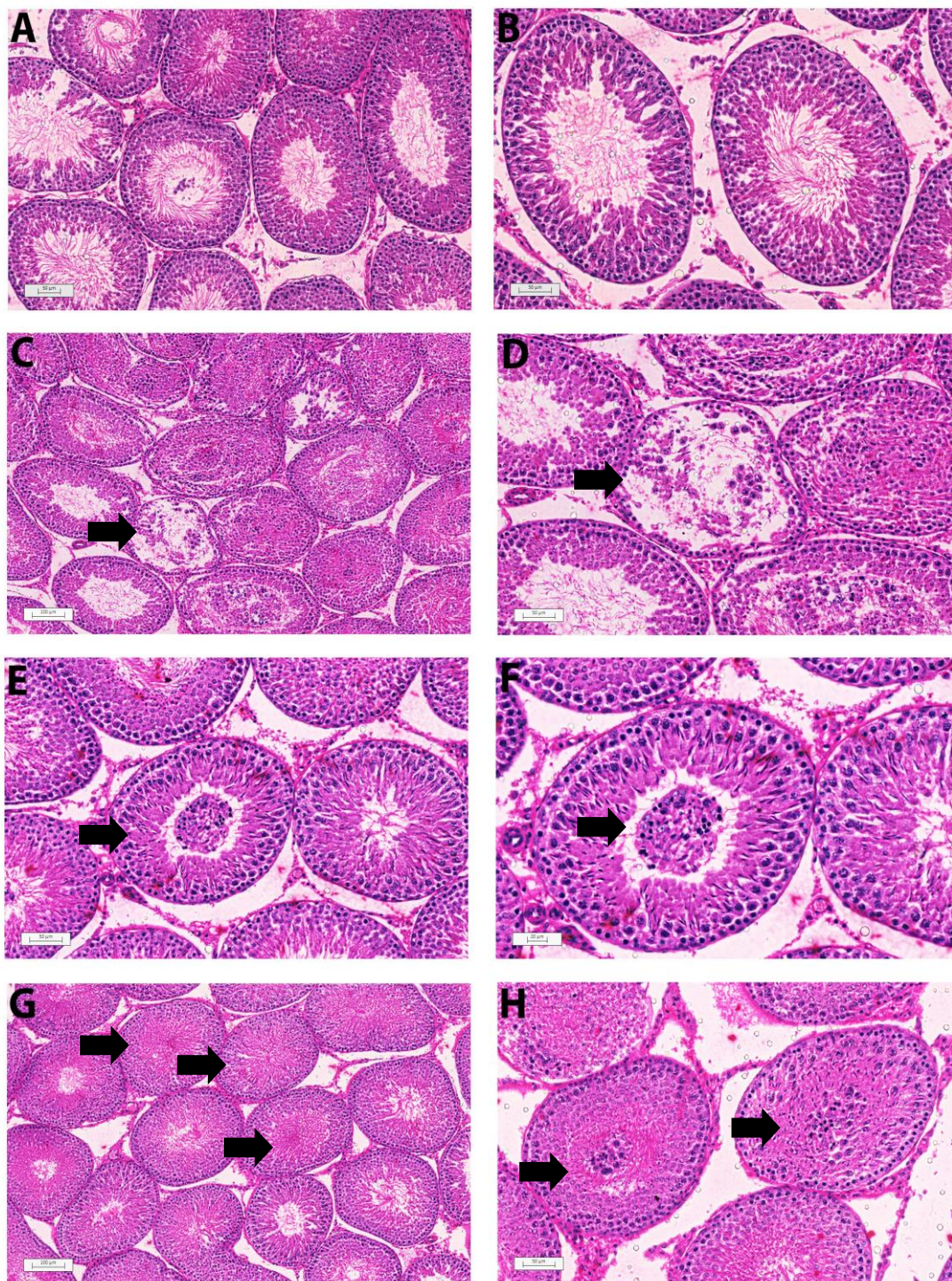
TABELA 10. FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA TIREOIDE E NOS TESTÍCULOS.

Tireoide	Controle	0.15	1.5	15	150	1500
Desorganização folicular	0(10)	2(10)	0(10)	6(10)	4(10)	0(10)
Vacuolização colóide	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	1(10)	0(10)
Necrose	0(10)	4(10)	6(10)	6 (10)	2(10)	0(10)
Presença de células dentro do colóide	0(10)	0(10)	2(10)	0(10)	0(10)	4(10)
Testículo	Controle	0.15	1.5	15	150	1500
Túbulos obliterados	0(10)	5(10)	6(10)	10(10)	10(10)	4(10)
Túbulos Necróticos	0(10)	2(10)	2(10)	6(10)	3(10)	2(10)

FONTE: A autora (2016).

Controle: animais expostos apenas ao óleo de canola; 0,15 µg Sb: animais expostos a 0,15 µg Sb/kg; 1,5 µg Sb: animais expostos a 1,5 µg Sb/kg; 15 µg Sb: animais expostos a 15 µg Sb/kg; 150 µg Sb: animais expostos a 150 µg Sb/kg; 1500 µg Sb: animais expostos a 1500 µg Sb/kg

FIGURA 7. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NOS TESTÍCULOS.



FONTE: A autora (2016).

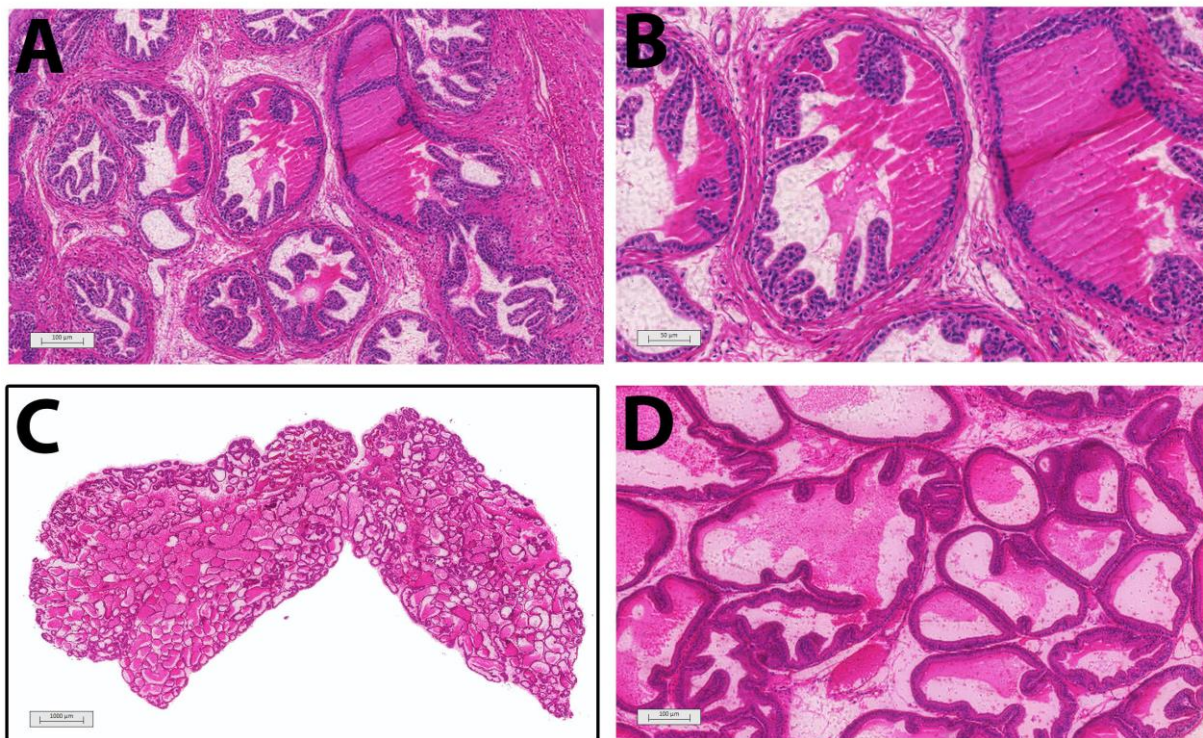
A e B: Morfologia normal dos túbulos seminíferos. C e D: Túbulo necrótico. E e F: Obliteração parcial dos túbulos. G e H: Obliteração total dos túbulos.

A necrose dos túbulos é preocupante, visto que a perda de túbulos seminíferos acarreta um prejuízo reprodutivo para o animal. Zaho et al., (2016)

relata a necrose dos túbulos seminíferos em animais expostos ao ferro. Nas revisões de Hampl et al. (2016) e Kyiama et al. (2015) diversos metais são relatados por induzir toxicidade testicular, através da atrofia dos túbulos, redução do diâmetro dos mesmos e ausência de células germinativas dentro dos túbulos (*Sertoly cell only tubule*). Todos estes casos demonstram a habilidade de metais em alterar a histologia de um órgão essencial a continuidade física da espécie, corroborando os dados encontrados no presente trabalho.

A próstata e a vesícula seminal não apresentaram alterações histológicas frente à exposição ao Sb. Imagens ilustrativas da morfologia destes dois o órgãos então representadas na figura 8.

FIGURA 8. MORFOLOGIA DA VESÍCULA SEMINAL E DA PRÓSTATA.



FONTE: A autora (2016).

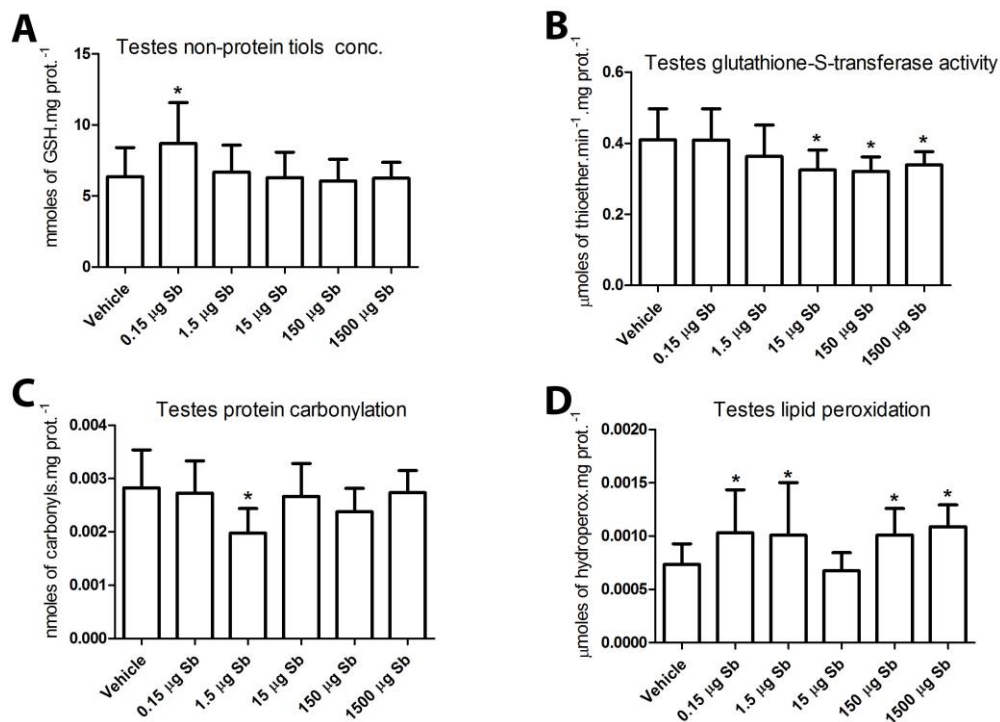
A e B: Vesícula seminal. C e D: Próstata.

As análises bioquímicas de testículos revelaram um decréscimo na concentração de GSH nos animais expostos a 0.15 µg Sb/kg e um decréscimo na atividade da GST nos animais expostos as três maiores doses. Com relação aos danos em macromoléculas, houve um decréscimo na carbonilação proteica

nos indivíduos expostos a 1.5 µg Sb/kg e um aumento na peroxidação de lipídeos nas duas menores e nas duas maiores doses. Todas as alterações bioquímicas observadas não apresentaram padrão dose dependente. Guesmi et al. (2016) relatam a susceptibilidade de testículos de ratos ao estresse oxidativo induzido de forma proposital por peróxido de hidrogênio, demonstrando que apesar da barreira hematotesticular, certas substâncias podem transpassá-la e alterar o estado redox bem como causar danos em macromoléculas testiculares.

Ognjanović et al. (2016) demonstraram que o metal Cd é capaz de induzir estresse oxidativo em células testiculares, causando um decréscimo na atividade das enzimas antioxidantes. No presente estudo a enzima antioxidante GST também apresentou sua atividade diminuída frente a exposição ao metal Sb, indicando que os metais possuem a propriedade de alterar a atividade deste tipo de enzima nas células testiculares. Kokoszko et al. (2008) não observaram alterações na peroxidação lipídica de animais expostos ao ferro. Porém o estudo de Kasperczyk et al (2008) relatam um aumento na peroxidação lipídica de homens naturalmente expostos ao Pb e Zn. O contraste entre estes dois estudos demonstram que os danos em macromoléculas podem ocorrer frente a exposição a elementos metálicos, dependendo do elemento, suas características e estado de oxidação. No presente estudo o Sb demonstrou causar um aumento na peroxidação lipídica, fato que pode ser correlacionado com o aumento de incidência de necroses também observados. Tanto as necroses, quanto os danos em macromoléculas podem prejudicar a espermatogênese e a espermiogênese, afetando a qualidade do sêmen. Wang et al. (2016) correlacionaram positivamente a concentração dos metais Ni, Cu, As, Se, Mo, Cd e Pb, mas não do Sb, com o decréscimo em parâmetros de qualidade seminal em homens chineses. Já Giaccio et al (2012) encontraram forte correlação ente a concentração de Pb e Sb plasmáticas e diminuição da qualidade do sêmen de homens na Itália.

FIGURA 9. ANÁLISES BIOQUÍMICAS EM TESTÍCULOS.



FONTE: A autora (2016).

Vehicle: animais expostos apenas ao óleo de canola; 0,15 μg Sb: animais expostos a 0,15 μg Sb/kg; 1,5 μg Sb: animais expostos a 1,5 μg Sb/kg; 15 μg Sb: animais expostos a 15 μg Sb/kg; 150 μg Sb: animais expostos a 150 μg Sb/kg; 1500 μg Sb: animais expostos a 1500 μg Sb/kg

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os três modelos (fêmeas imaturas, machos castrados e machos adultos) mostraram resultados satisfatórios frente aos ensaios de disfunção endócrina, mostrando serem modelos apropriados para este tipo de ensaio.

O presente estudo demonstrou que o Sb não possui propriedades anti-estrogênicas ou estrogênicas perante o ensaio uterotrófico.

O Sb não possui propriedades anti-androgênicas ou androgênicas perante o ensaio de Hershberger.

O Sb não possui propriedades desreguladoras endócrinas perante o ensaio com machos adultos.

O Sb mostrou alterar o padrão histológico da tireoide, apresentando-se tóxico para a mesma nos ensaios de Hershberger e machos adultos.

O Sb causou danos histológicos e em macromoléculas, bem como alterou o equilíbrio oxido-redutor de células testiculares.

Próstata e vesícula seminal não demonstraram ser órgãos alvo para a toxicidade antimomial.

6 REFERÊNCIAS

- ABDUL, K. S. M., SUDHEERA, S. J., EDIRIWEERA P.S., CHANNA J., MANGALA C.S. Arsenic and human health effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V. 40, p. 828-846, 2015
- BACH, C.; DAUCHY, X.; CHAGNON, M.-C.; ETIENNE, S. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. **Water research**, v. 46, n. 3, p. 571-83, 2012. Elsevier Ltd.
- BARLAS, N., SAADET, Ö. GÖZDE, K. The estrogenic effects of apigenin, phloretin and myricetin based on uterotrophic assay in immature Wistar albino rats . **Toxicology Letters**. V. 226, p.35–42, 2014.
- CHOE, S.; KIM, S.; KIM, H.; HO, J.; CHOI, Y. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. **The Science of total Environmet**, v. 312, p. 15-21, 2003.
- DIXON, D. CASEY, E. R., ALICIA, B. M., EUGENE, A. G., ERIN, P. H., ELIZABETH, A. W., JASON, P. S., YI LUD, W. N., JEFFERSONE, R. R., NEWBOLDF , S. E. Histopathologic changes in the uterus, cervix and vagina of immature CD-1 mice exposed to low doses of perfluorooctanoic acid (PFOA) in a uterotrophic assay. **Reproductive Toxicology**, v 33,p. 506–512, 2012.
- EERTMANS, F.; DHOOGHE, W.; STUYVAERT, F.; COMHAIRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in vitro**. v.17, p.515–524, 2003.
- ERGENE, S.; CELIK, A.; CAVAŞ, T.; KÖLELI, N.; AYMAK, C. The evaluation of toxicity and mutagenicity of various drinking waters in the human blood lymphocytes (HULYs) in vitro. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 7, p. 2472-5, 2008.
- GIACCIO, L.; CICCHELLA, D.; VIVO, B. DE; LOMBARDI, G.; ROSA, M. DE. Does heavy metals pollution affects semen quality in men? A case of study in the metropolitan area of Naples (Italy). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 112, p. 218-225, 2012
- GUESMI, F., BEGHLEM, H., TYAGI, A.K., ALI, M,B,, MOUHOU, R,B,, BELLAMINE, H., LANDOULSI, A- Prevention of H2O2 Induced Oxidative Damages of Rat Testis by Thymus algeriensis. **Biomed Environ Sci**. v29, p.275-285, 2016.
- HEINZE, J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-Screen. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 127, n. 1-2, p. 136-8, 2011.
- HAMPL, R., JANA, K., LUBOSLAV, S. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. V.155, p. 217-223, 2016.
- IAVICOLI, I., FONTANA, L., BERGAMASCHI, A. The effects of metals as endocrine disruptors. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**. v.12, p.206-23, 2006.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Technical report. **Pure Appl. Chem**. v.75, n.5, p. 631–681, 2003.
- JUGAN, M. N.; LEVI, Y.; BLONDEAU, J. P. Endocrine disruptors and hormone physiology.**Biochemical Pharmacology**.v.79, p.939–947, 2010.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D.M.; SINKS, T.; TILSON, H.A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. **EPA-sponsored workshop. Environm. Health Perspec.** v.104, p.715–740, 1996.

KERESZTES, S.; TATÁR, E.; MIHUCZ, V. G. et al. Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. **The Science of the total environment**, v. 407, n. 16, p. 4731-5, 2009. Elsevier B.V.

KIYAMA, R., YUKO, W. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. **Environment International.** V.83, p.11-40, 2015

KOKOSZKO, A., JAN D., ANDRZEJ L., MAŁGORZATA K. Protective effects of GH and IGF-I against iron-induced lipid peroxidation in vivo. **Experimental and Toxicologic Pathology.** V.60, p.453-458, 2008.

LEVAVI-SIVAN, B.; J. BOGERD; E.L. MAÑANÓS; A. GÓMEZ; J.J. LAREYRE. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **General and Comparative Endocrinology.**v.165. p.412–437. 2010.

LIU, Y., WenZhong, Z., Ling Y., XiaoHong, Z., XuDong, J.I.A., Ning, L.I. An Assessment of Androgenic/Anti-androgenic Effects of GH Transgenic Carp by **Hershberger Assay.** **Biomedical and Environmental Sciences.** V 24, p.445-449, 2011.

MARTINO-ANDRADE, A. J., MORAIS, R.N., SPERCOSKI, K.M., ROSSI, S.C., VECHI, M.F. GOLIN, M., LOMBARDI, N.F., GRECA, C.D., DALSEN, P.R. Effects of Tribulus terrestris on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology.** V.127, P.165-170, 2010.

MARTINO-ANDRADE, A.J., ARAÚJO, S., SANTANA, G.M., OHI, M., DALSENTER, P.R. Screening for in Vivo (Anti)estrogenic and (Anti)androgenic Activities of Technical and Formulated Deltamethrin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology.** V.35, P.379-382, 2002.

MOURA COSTA, D. D. Chapter 10: Emerging Contaminants and Endocrine System Dysfunction In: Eduardo Alves de Almeida; Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. (Org.). **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems.** 1ed.Boca Raton, FL: CRC Press, 2013, v. 1, p.242-311.

OGNJANOVIĆ, B. I., SNEŽANA D., MARKOVIĆ, N., ĐORĐEVIĆ, I., TRBOJEVIĆ, A., ŠTAJN, Z. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q₁₀ and Vitamin E. **Reproductive Toxicology.** V.29, P.191-197, 2010.

OKANA, A., NURHAYAT, B., GÖZDE, K. Investigation of effects of myricetin on thyroid-gonadal axis of male rats at prepubertal period. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** V.4, p268–279, 2015.

OMURA, M.; TANAKA, A.; HIRATA, M.; INOUE, N. Testicular toxicity evaluation of two antimony compounds, antimony trioxide and antimony potassium tartrate, in rats and mice. **Environmental health and preventive medicine**, v. 7, n. 1, p. 15-8, 2002.

PINTO, B.; REALI, D. Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 212, n. 2, p. 228-32, 2009.

PLOTAN, M.; FRIZZELL, C.; ROBINSON, V.; ELLIOTT, C. T.; CONNOLLY, L. Endocrine

disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. **Food chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1590-6, 2013.

NJIA, M., ALI, R., MIRELA, U., MAJA, C. Histological and ultrastructural alterations of rat thyroid gland after shortterm treatment with high doses of thyroid hormones. **Saudi Journal of Biological Sciences**, In Press, Corrected Proof, Available online 13 May 2015.

RUNGCHANG, S.; NUMTHUAM, S.; QIU, X.; LI, Y.; SATAKE, T. Diffusion coefficient of antimony leaching from polyethylene terephthalate bottles into beverages. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 3, p. 322-329, 2013.

SAX, L. Polyethylene terephthalate may yield endocrine disruptors. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 4, p. 445-8, 2010.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L.R.;LAREYRE, J.J.;LEGAC, F.;CHIARINI-GARCIA, H.;NOBREGA, R.H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology** v.165. p. 390–411. 2010.

SHAMEEM, K., MOHAMMED, A., SUDHEERA, S., JAYASINGHE, E.P.S., CHANDANA, C., JAYASUMANA, P., MANGALA C.S. Arsenic and human health effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V.40, p.828-846, 2015.

TRELOAR, A,E, BOYNTON, R.E., BEHN, B.G., BROWN, B.W. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil*. V.12, p77-126, 1967.

TYLEND, C. A.; FOWLER, B. A. Chapter 18 Antimony. **Book**, p. 353-365, 2007.

WANG, Y., YANG, S., WEI, F., PENG, W., PAN, Y., JIN, L., ZHEN, H., YING-JUN, C., CHONG, L., LI, S., JING, Y., LONG-JIE, G., QIANG, Z., WEN-QING, L. Association of urinary metal levels with human semen quality: A cross-sectional study in China. **Environment International**. V. 91, p.51-59, 2016.

WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v.36, p.118–130, 2002.

XI, Y., DEHUA, L., WEI, S. Exposure to the endocrine disruptor nonylphenol alters structure and function of thyroid gland in rats. **Regulatory Peptides**. V.185, p.52–56, 2013.

ZHAO,Y., LEIMING, C., JIE, W., YINGLIANG, W., BAOYU, Y., LE, Z. **Uterotrophic assay**, Hershberger **assay**, and repeated 28-day oral toxicity study of flumorph based on the Organization for Economic Co-operation and Development draft protocols. **Experimental and Toxicologic Pathology**. V. 63, p. 143-149, 2011.

ZHAO, Q., AIHONG, M., JIAWEI, Y., JING, S., RONG, Z., LU, G., YANG, L., HONG, Z. Fe ion irradiation induced apoptosis through Nrf2 pathway in mouse testis. **Life Sciences**. V. 157, p. 32-37, 2016.

□

ZHANG, W., Jinsong, Y., Jiali, W., Pincang, X., Youqiong, X., Haimei, J., Yongshan, C. Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of **cadmium** and p-nonylphenol. **Toxicology**. V.241, p. 84-91, 2007

CAPÍTULO II:

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRIÓXIDO DE ANTIMÔNIO SOBRE AS
CONDIÇÕES ÓXIDO-REDUTORAS EM RATOS WISTAR.

Resumo

Seres humanos estão expostos a compostos antimoniais por vias intencionais, como é o caso das drogas antimoniais usadas para o tratamento de leishmaniose, bem como por vias não intencionais, como o caso da água e comida contaminados. Sb é descrito como um poluente emergente e há poucas informações sobre seus efeitos a nível biológico. No presente estudo cinco doses de Sb foram testadas em ratos Wistar (0.15 µg/kg, 1.5 µg/kg, 15 µg/kg, 150 µg/kg, e 1500 µg/kg). Ensaio com fêmeas imaturas, machos castrados e machos adultos intactos foram realizados para tentar correlacionar a interação hormonal e os efeitos do Sb. Os efeitos da exposição ao antimônio foram mensurados usando biomarcadores de toxicidade hepática, renal cardíaca, pulmonar e cerebral. Os resultados indicam que a homeostase hormonal tem um importante papel frente a toxicidade antimoniais, pois indivíduos imaturos sexualmente e indivíduos castrado tiveram efeitos mais pronunciados quando comparados a machos adultos intactos. O rim demonstrou ser o órgão mais sensível aos danos antimoniais. O antimônio altera a homeostase oxidativa em diferentes órgãos testados bem como gera danos neurológicos em ratos, sendo os efeitos correlacionados com o equilíbrio hormonal adequado.

Palavras-chave: antimônio, ratos Wistar, exposição oral, balanço hormonal.

Antimony trioxide induces oxidative and histologic alterations in target organs
following different exposure protocols

Daniele Dietrich Moura Costa^{1*}, Dandie Antunes Bozza¹, Samuel Liebel¹,
Francisco Filipak Neto¹, Anderson Joel Martino Andrade², Ciro Alberto de
Oliveira Ribeiro¹.

¹ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento
de Biologia Celular, Laboratório de Toxicologia Celular.

² Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento
de Fisiologia, Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal.

*Corresponding author:

Adress: Universidade Federal do Paraná, Rua Francisco H. dos Santos,
Curitiba, Paraná, Brasil, PO Box 19031

e-mail danidmc87@gmail.com (D.D.Moura-Costa)

phone: +55 41 33611756

Abstract

Human are exposed to antimony by intentional ways, such as antimonials used in the leishmaniosis treatment, or by non intentional ways such as water and contaminated food. This metal is described as an emergent pollutant and few information concern its effects in the various biological tissues is described. In the current study five doses of antimony (0.15 µg/kg, 1.5 µg/kg, 15 µg/kg, 150 µg/kg, and 1500 µg/kg) were tested in Wistar rats considering the range of human daily intake for this metal. Assays with immature female, castrated male and adult male rats were performed in order to establish the role of hormones on Sb toxicity. The effects were measured using biomarkers in liver, kidney, heart, lung and brain as: reduced-gluthatione concentration (GSH), gluthatione-S-transferase activity (GST) and lipid peroxidation (LPO) and protein carbonilation levels (PCO), including neurotoxicity (Acetylcholinesterase activity). Additionally histopathological findings were investigated in liver and kidney. The results indicated that hormones balance play an important hole in the toxicity of antimony trioxide after oral administration. The base for this thesis is the occurrence of biochemical disturbs in individuals from immature female and castrated males in comparison with non castrated males. Also kidney was the most sensible organ mainly for morphological parameters, but the exposure to Sb also showed effects in liver. In conclusion, antimony trioxide alters the oxidative homeostasis and neurological parameters in Wistar rats after oral administration and the hormone balance can modulate decreasing its toxic potential and risk of exposure.

Key-words: Antimony, Wistar rat, hormone, oral exposure, target tissues.

1 INTRODUCTION

Antimony is ubiquitously present in the environment as a result of natural processes and human activities (HE et al., 2012) and can exist in a variety of oxidation states where +3 and +5 states are the most present in the environmental, biological and geochemical samples (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). A good deal of research on biological effects has been, and continues to be, devoted to trace elements, particularly transition metals but less attention has been focused on the so-called metalloid elements. Among the metalloids, antimony is the one that has received the scantiest attention. Little information is available on the transformation and transport of antimony in the different biological compartments. This lack of understanding of antimony toxicity hinders further research (FILELLA; BELZILE; CHEN, 2002) despite its commercial use as a flame retardant, in PET catalysis and clinical uses to Leishmaniosis treatment (SHTANGEEVA; BALI; HARRIS, 2011b).

In particular, the high distribution and bioavailability of antimony increase the risk of exposure to human populations in different ages or gender. The hormonal balance changes along the life and few studies have showed if a misbalance of hormones may favor or not some toxicological aspects (BUCCELLI et al., 2016). Currently a large group of pollutants are identified as potent endocrine disruptors, and no study has focused in investigate the role of these potential disturbs on toxicity of chemicals.

The global consumption of antimony has increased by approximately four percent/year since 2000 (ROSKILL, 2011). The mainly use of antimony involve a condensation catalyst for the manufacture of polyethylene terephthalate (PET), films, and various food contact applications. This end-use application has been evaluated for safety and is regulated by the US Food and Drug Administration (FDA) and other international authorities (EU RAR, 2008; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004; ENVIRONMENT CANADA/HEALTH CANADA, 2010). This high applicability of Sb mainly in food packaging lead to a potential human exposure to antimony of different age or genre (ELLIOTT et al., 1998).

The trivalent antimony is the most stable form of the metal under physiological/cellular conditions leading to a more toxic potential than pentavalent state or even organic forms (STEMMER, 1976). The trivalent antimony is genotoxic and induces significant cytotoxicity and apoptosis in biological systems (DE BOECK; KIRSCH-VOLDERS; LISON, 2003), but controversially anti-tumor activity against HL-60 promyelocytic cells, S180 solid tumors, P388 leukemia, and lymphoid tumor cells were demonstrated by MANN et al., 2006.

Many countries are currently concerned about Sb human contamination (ETTLER et al., 2007; MAHER, 2009). Antimony is also highlighted as emergent substance by the United States Environmental Protection Agency or the European Union (RICHARDSON, 2012). The World Health Organization set safe drinking water levels for Sb at $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). In China, the maximum admissible Sb level in drinking water is $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the recommended level in Japan is less than $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ZHENG; OHATA; FURUTA, 2000). A study conducted by the U.S. Food and Drug administration estimated the average daily intake of antimony from food and water to be $4.6 \mu\text{g}/\text{day}$ (IYENGAR, G.V., TANNER, J. T. WOLF, W. R., ZEISLER, 32435) and Health Canada estimated a daily intake for adults of $7.44 \mu\text{g}$ while a concentration of $100 \mu\text{g}/\text{day}$ is estimated by (ATSDR, 1992). Actually Sb and its compounds are found on the list of banned hazardous compounds specified in the Basel Convention (LIU et al., 2010).

Due to its various industrial uses, the potential of human exposure is significant, but the risks associated with Sb exposure to humans remain poorly understood (SHTANGEEVA; BALI; HARRIS, 2011a). In this thesis, the current study investigated if the hormonal imbalance may modulate the potential toxicity of antimony trioxide in Wistar rats, after oral exposure to realistic low doses for human exposure.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMAL HOUSING

For the immature female assay, Wistar immature female rats (19 post-natal day - PND) were obtained from the Parana Technology Institute - Tecpar (Araucaria - Parana State). All animals were housed in clear polycarbonate cages for 2 days prior to experimentation. For the male castrated assay, Wistar male rats (50 days of age) were also obtained from the Tecpar and housed in clear polycarbonate cages for 1 week prior to castration. The procedure used for castration was based on the OECD protocol (OECD/OCDE, 2009). 57-days-old animals were castrated via a midline incision, and test chemical treatment was not commenced until 8 days later to allow for complete recovery. For the 15-day intact adult male assay, rats (63 days of age) were obtained from the same place and acclimated for 7 days prior the experiment. All experimental procedures were based on the EPA “*Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines*”.

Prior to the experiment, all animals were checked for overt signs of illness and only healthy animals were selected for the study. During the study, the animals were provided filter-sterilized tap water and rodent lab food without soy compounds (Nuvilab). Diet and water were available *ad libitum* and the animals were maintained under a 12 h light–dark cycle, at an ambient air temperature of $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a relative humidity of $50 \pm 10\%$. Animals were allocated to the various treatment groups by random sorting.

2.2 EXPERIMENTAL DESIGN

The antimony doses were established based on the EPA diary human estimative consumption (U.S. EPA, 2012). Following this estimative, an adult ingest orally approximately 100 μg of antimony every day. Considering an adult of 70 Kg of body mass, this dose correspond in rats about 1.5 μg of antimony per kilogram of body mass. So, in this study we tested 5 doses of antimony: 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The tested

compound was antimony trioxide (Sigma), the most frequent form present in PET bottle and in antimonial drugs after metabolization (BACH et al., 2012). The doses of antimony trioxide were stoichiometrically calculated to obtain the proposed antimony dosages.

Following the EPA Endocrine disruptors screening protocol for female immature assay, pups were weaned on the morning of PND 19 and randomly assigned to one of six treatment groups (n = 15 per treatment group): control – received canola oil (vehicle) 1 ml/kg; 0.15 µg of antimony (dissolved in canola oil) per kilogram of body mass (0.15 µg Sb/Kg); 1.5 µg Sb/kg; 15 µg Sb/kg; 150 µg Sb/kg and 1500 µg Sb/kg. Treatments were given for 3 consecutive days starting in the morning (9 a.m.) of PND 21 until PND 23. Twenty-four hours after the last treatment, the animals were weighed and sacrificed by manual cervical dislocation according to the American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia (i.e., manual cervical dislocation is a humane technique for the euthanasia of rats that weigh < 200 g) and the tissues were sampled as described above.

For the castrated adult male assay, male rats were treated daily in the morning (9 a.m.), starting 8 days after castration procedure, for 10 consecutive days with canola oil or antimony doses following the same experimental groups described for immature female assay. Twenty-four hours after the last treatment, the animals were weighed and euthanized by deep anesthesia with isoflurane inhalation and tissues were sampled.

For the male intact adult assay male rats were treated daily, starting on 70 PND, for 15 consecutive days with canola oil or antimony doses following the same experimental groups described for others assays. Two hours after the last treatment, the animals were weighed and euthanized by deep anesthesia with isoflurane inhalation and tissues were sampled.

During all the experiments animals were daily monitored to clinical signs such as vomiting, diarrhea, piloerection, dyspnea, motility.

2.3 SAMPLING

Before killing animals, they were weighted and liver, spleen and kidney were dissected and weighted. The somatic indexes were calculate rating the organ mass by the total body mass.

Liver, kidney, heart were sampled for biochemical assays in all experimental procedures. Lung and brain was sampled in male castrated and intact male assay. These two tissues were not sampled in female immature assay due to logistic difficult during the experiment. Tissues were stored under -80°C until biochemical assays. A piece of liver and the right kidney were also sample for histological analysis.

2.4 HISTOPATHOLOGICAL PROCEDURES

Liver and kidney were fixed in ALFAC solution (ethanol 64%, formaldehyde 6% and glacial acetic acid 5%) for 16 h, dehydrated in graded series of ethanol, posterior xylene bath, and embedded in Paraplast Plus (Sigma®) resin in Micron® 350. Sections of 5 µm thick were obtained in Leica Microtome® RM2145 and stained with hematoxylin and eosin, posteriori analyzed under light microscope.

2.5 BIOCHEMICAL ASSAYS

For GST, GSH, PCO and LPO, 0.1-0.4 g of liver, kidney, heart or lung were homogenized in 1.0 mL of Tris-HCl buffer (Sigma) (pH7.4), containing 0.1 M of PMSF (Sigma), centrifuged at 9000g for 30 min at 4 °C. Then, the supernatant (S9 fraction) was transferred to 2 mL tubes and frozen at -75 °C; prior to the assays samples were thawed on ice and supernatants were diluted by addition of ice-cold Tris-HCl in a volume that varied according to the assay's requirement (see dilution ratio on specific assays).

For the Ache activity, brain were homogenized in 1.0 mL of potassium phosphate buffer (pH 7.5), centrifuged at 12000g for 20 min at 4 °C. Then, the

supernatant was transferred to 2 mL tubes and frozen at -75°C prior to acetylcholinesterase activity assay.

Protein content assay: Total protein content was quantified following Bradford (1976). A volume of 10 μL of supernatant (diluted 1:20–50) and 250 μL of Bradford reagent (Sigma®) were placed in a 96-well microplate and absorbance was measured at 620 nm. Protein content was calculated through comparison with a standard curve of bovine serum albumin (Sigma). This assay is used to normalize and standardized the following biochemical assays.

Reduced-gluthatione concentration: GSH was measured on supernatant after protein precipitation by 10% trichloroacetic acid (Sigma) and centrifugation at 1000g for 15 min and 4°C . Supernatant (50 μL , undiluted) and 230 μL of Tris-HCl (0.4 M, pH 8.9) were placed in a 96-well microplate, followed by addition of 20 μL of 2.5 mM DTNB (Acros Organics) in 25% methanol(Merck)]. Absorbance was determined at 415 nm and GSH concentration was calculated by comparison with the standard curve for GSH (Acros Organics)(SEDLAK; LINDSAY, 1968). Blanks consisted of Tris-HCl instead of samples.

Glutathione-S-transferase activity: GST activity was measured using reduced glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB - Acros Organics) as substrates (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976). Supernatant (20 μL , diluted 1:10) was placed in 96-well microplate, immediately followed by reaction medium (180 μL , 1.5 mM GSH, 2.0 mM CDNB, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5). Absorbance increase was immediately measured at 340 nm for 160 s in intervals of 40 s. Blanks consisted of reaction medium and Tris buffer. GST activity was determined at the first interval of 1 min ($r^2\sim 0.99$) with the molar extinction coefficient for CDNB of $9.6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Lipid peroxidation: LPO was measured by ferrous oxidation-xylenol (FOX) assay(JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991). A volume of 200 μL of supernatant (not diluted) and 1400 μL of reaction solution (0.1 mM xylenol orange (Acros Organics), 25 mM H_2SO_4 (Merck), 4.0 mM butylated hydroxytoluene (BHT) (Acros Organics) and 0.25 mM ammonium ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$) (Vetec) in pure methanol) were mixed in 2 mL tubes. The tube's content was mixed once every 3 min by inversion during 20 min. Then, tubes were centrifuged at 9000g for 10 min, and 300 μL of supernatant was carefully added to a 96-well

microplate. Blank was prepared by replacing the supernatant with Tris buffer. Absorbance was measured at 570 nm and hydroperoxides concentration was determined using the apparent molar extinction coefficient for H₂O₂ and cumene hydroperoxide of $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Protein carbonilation: 200 μl of supernatant were mixed with 800 μl of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (Acros Organics) in 2.0 M hydrochloric acid (Sigma) in tubes used in the reaction and with 800 μl of 2.0 M hydrochloric acid (without DNPH) in tubes used as blanks. Tubes were mixed in vortex for 5 min and kept at 37 °C for 90 min. Proteins were precipitated by addition of 1.0 ml of 28% trichloroacetic acid and centrifuged at 9.000 g for 10 min. Pelleted proteins were washed three times by suspension in ethanol/ethyl acetate (Vetec) (1:1), mixed in vortex and centrifuged. Proteins were then solubilized in 6.0 M guanidine hydrochloride (Sigma) and tubes were centrifuged at 9.000 g for 5 min to remove any trace of insoluble material. The carbonyl content were determined at 360 nm using the molar absorption coefficient of $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for hydrazones (LEVINE et al., 1994).

Acetylcholinesterase activity: Supernatant of the brain was diluted (1:10, or 10% v / v) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5. After dilution, 50 μl were placed in a 96-well microplate, followed by 200 μl of DTNB (5,5-Dithio-bis-benzoate-2-nitro) and 50 μl of (acetylthiocholine iodide) (Sigma). Absorbance was immediately measured at 415 nm at intervals of 5 s by the method of (ELLMAN et al., 1961) modified for microplate by Silva de Assis (1998).

2.6 STATISTICAL PROCEDURES

When the samples had a Gaussian distributions, one-way analysis of variance followed by Dunnet's multiple comparison test. When, Gaussina distribution was not observed, samples were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. In both cases the statistical procedures were used to identify groups that are significantly different from the control at the $p < 0.05$ level.

3 RESULTS

3.1 CLINICAL TOXICOLOGICAL SIGNS AND SOMATIC INDEXES

The mortality was less than 6% in all tested groups but no clinical signals of toxicity were observe during the experiment. No differences in the considered indexes were observed between exposed to antimony and control.

Table 1. Body gain mass and somatic indexes

Immature Female	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Body gain mass	12.63±3.5	10.88±4.08	11.50±3.86	10.28±3.60	9.50±4.11	10.28±5.05
Relative liver mass	3.39±0.65	3.09±0.60	3.15±0.52	2.99±0.71	3.02±0.59	3.35±0.61
Relative kidney mass	0.011±0.0029	0,011±0,0033	0,010±0.0017	0.010±0.0027	0.010±0.0036	0.096±0,0021
Castrated male	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Body gain mass	43.00±11.39	37.21±10.24	37.31±8.62	35.5±7.47	38.93±10.16	41.93±5.78
Relative liver mass	4.43±0.386	4.32±0.247	4.39±0.237	4.12±0.309	4.28±0.297	4.21±0.196
Relative spleen mass	0.224±0.028	0.229±0.030	0.217±0.033	0.197±0.009	0.205±0.016	0.227±0.032
Relative kidney mass	0.317±0.010	0.321±0.024	0.317±0.019	0.321±0.028	0.309±0.016	0.322±0.023
Adult male	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Body gain mass	18.93±7.36	28.87±4.31	26.93±2.31	22.87±7.70	32.71±2.03	25.94±3.60
Relative liver mass	3.78±0.323	3.79±0.291	3.78±0.205	3.81±0.265	3.92±0.226	3.73±0.267
Relative spleen mass	0.168±0.012	0.158±0.016	0.172±0.016	0.175±0.021	0.166±0.009	0.172±0.018
Relative kidney mass	0.323±0.019	0.331±0.019	0.333±0.022	0.328±0.238	0.338±0.027	0.352±0.062

Control - canola oil (vehicle); 0.15 - 0.15 µg Sb/Kg; 1.5 - 1.5 µg Sb/kg; 15 - 15 µg Sb/kg; 150 - 150 µg Sb/kg and 1500 -1500 µg Sb/kg.

3.2 LIVER

Biochemical parameters: The results showed that the non-thiol protein concentration decreased in immature female exposed to 0.15 μg Sb/kg and in castrated male exposed to 1500 μg Sb/kg in comparison to control. This molecule concentration increased only in immature female exposed to 15 μg Sb/kg. (FIG 1 A, B and C). The GST activity decreased in all immature female groups and in castrated male groups exposed to the four lower doses of antimony in relation to control. No alteration in this enzyme activity was observed for adult male (FIG 1 D, E and F). The concentration of lipids peroxidation increased in immature female exposed to 1500 μg Sb/kg and decreased in castrated male exposed to 15, 150 and 1500 μg Sb/kg and in all adult exposed male groups (FIG 1 G, H and I). The concentration of carbonilated proteins decreased in all immature female and adult male exposed to antimony.

Figure 1. Oxidative parameters and biomolecules damages in liver.

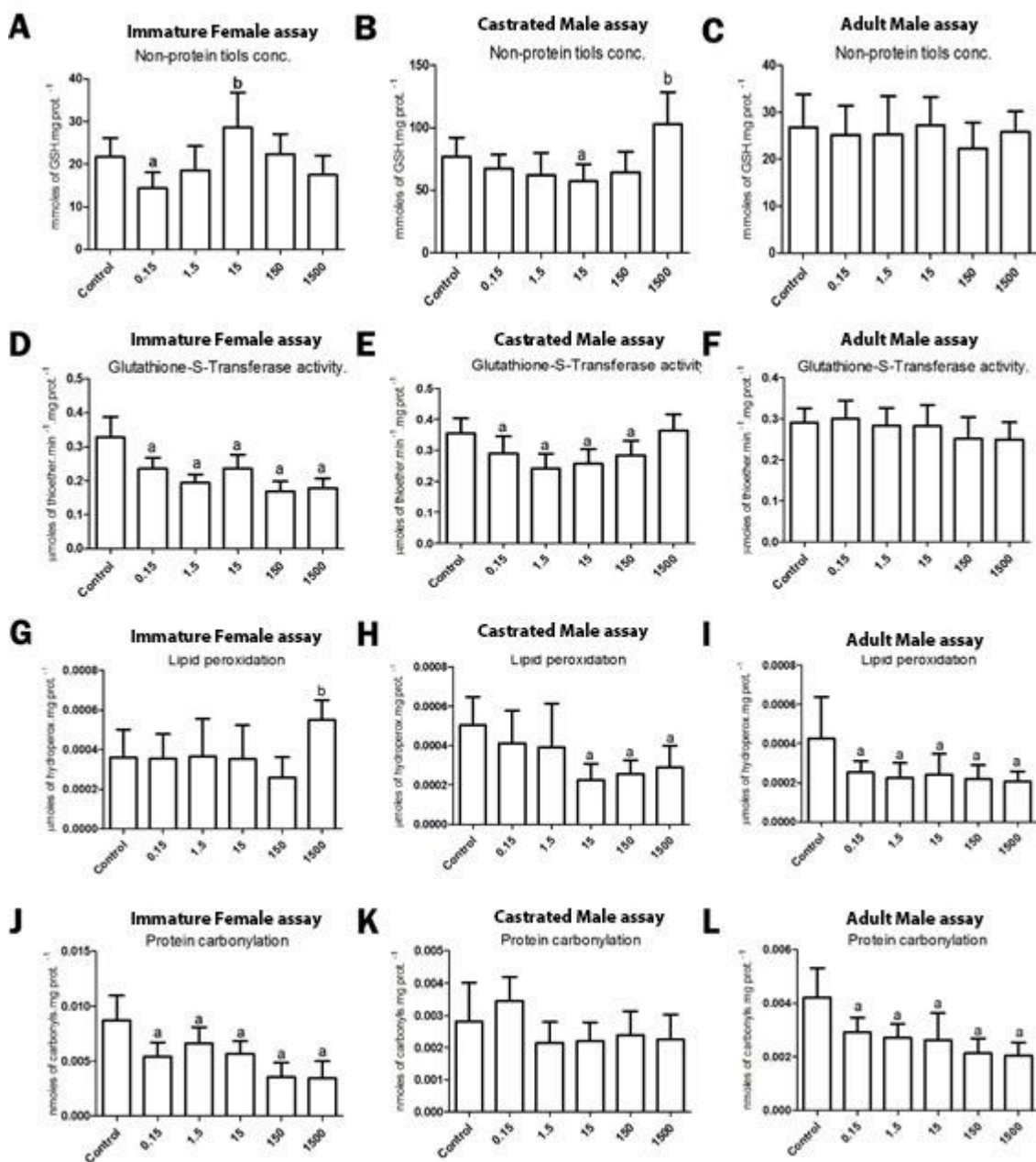


Figure 1. Biochemical parameters in liver of animals exposed to Sb. Control - canola oil (vehicle); 0.15 µg Sb/Kg; 1.5 µg Sb/kg; 15 Sb/kg; 150 µg Sb/kg and 1500 µg Sb/kg. Letters represent $P < 0.05$ in comparison with control group and different letters represent differences between tested groups. Letter a indicate a decrease in relation to control group, while letter b indicates an increase in the evaluated parameter in comparison to control group.

Histopathological findings: The most common alterations in liver histology of animals exposed to Sb are show in Figure 2 and Table 2. In immature female

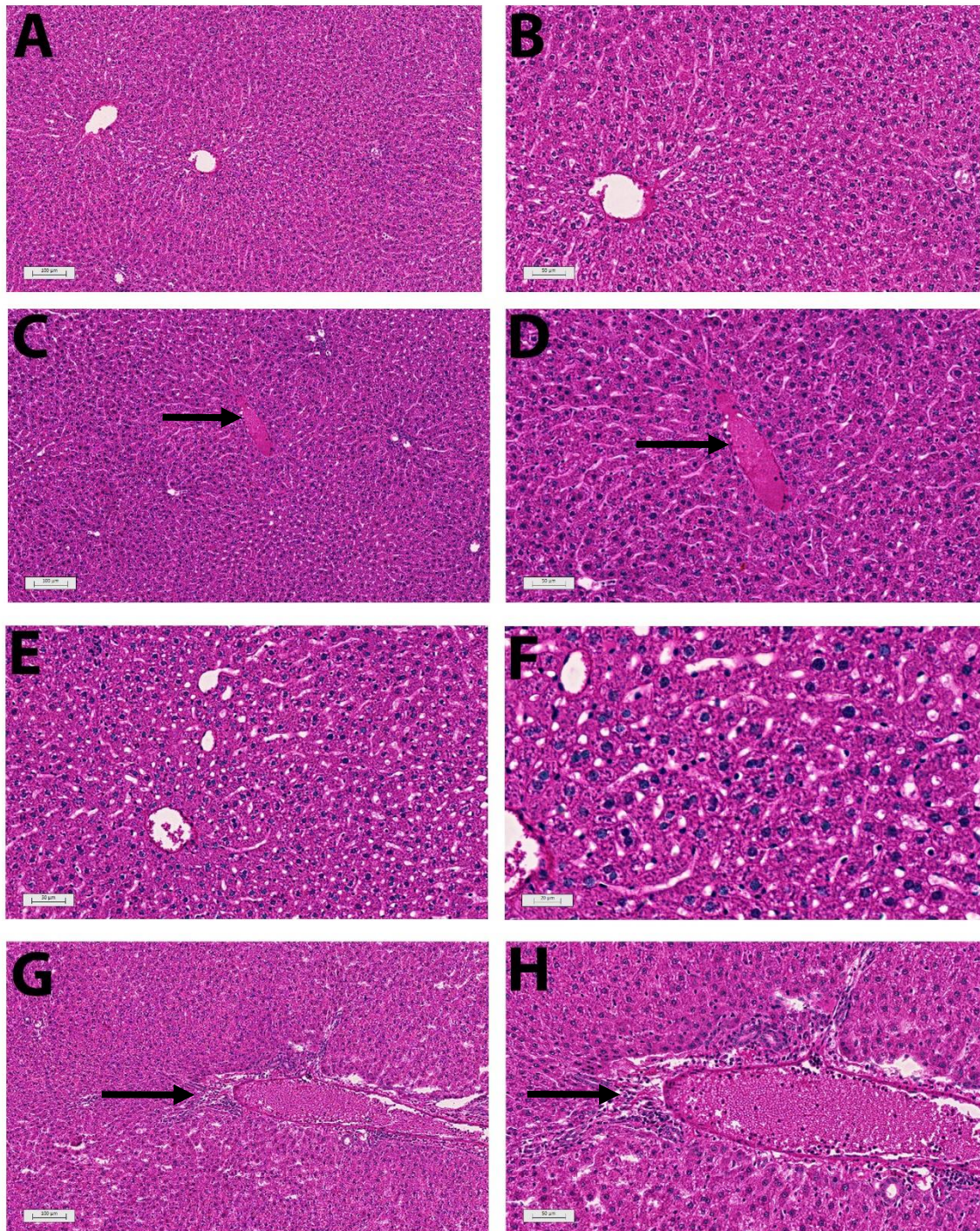
assay, liver necrosis are common in control and animals exposed to the lower dose of Sb. Others alterations observed in this experiment was vascular congestion, and hemosiderin deposition. For castrated male assay the most common alterations were necrosis in all treated groups, inflammatory responses and steatosis, predominately in Sb treated groups. Adult male showed a predominance of steatosis and granulomatosis. Some animals also showed necrosis, vascular congestion and inflammatory responses.

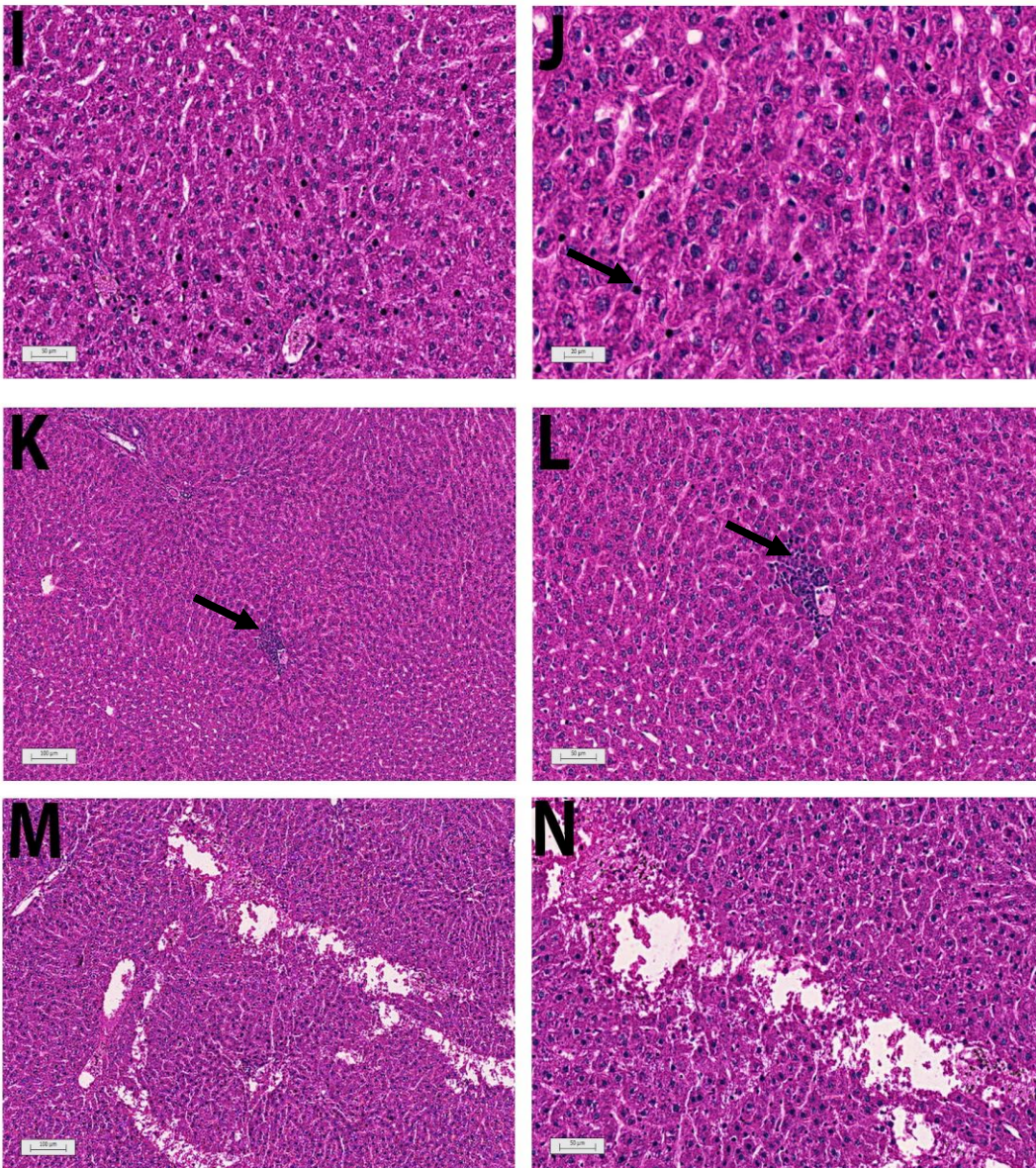
Table 2. Occurrence of liver histological findings in animals exposed to Sb.

Immature Female	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Vascular congestion	0(10)	4(10)	1(10)	2(10)	1(10)	1(10)
Necrosis	5(10)	7(10)	1(10)	2(10)	1(10)	1(10)
Inflammatory responses	0(10)	1(10)	1(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Basophily alteration	0(10)	0(10)	0(10)	1(10)	3(10)	2(10)
Granulomatosis	0(10)	2(10)	0(10)	0(10)	1(10)	0(10)
Hemossiderin	4(10)	0(10)	4(10)	1(10)	0(10)	0(10)
Castrated male	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Vascular congestion	0(10)	3(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Necrosis	0(10)	3(10)	4(10)	4(10)	6(10)	5(10)
Inflammatory responses	1(10)	4(10)	4(10)	5(10)	5(10)	2(10)
Basophily alteration	0(10)	0(10)	1(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Granulomatosis	0(10)	0(10)	0(10)	2(10)	0(10)	4(10)
Hemossiderin	1(10)	0(10)	2(10)	0(10)	0(10)	3(10)
Steatosis	0(10)	4(10)	4(10)	5(10)	10(10)	7(10)
Adult male	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Vascular congestion	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	1(10)	3(10)
Necrosis	0(10)	1(10)	1(10)	1(10)	0(10)	4(10)
Inflammatory responses	1(10)	0(10)	1(10)	1(10)	1(10)	4(10)
Basophily alteration	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Granulomatosis	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	0(10)	3(10)
Hemossiderin	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Steatosis	4(10)	9(10)	8(10)	8(10)	10(10)	10(10)

Control - canola oil (vehicle); 0.15 - 0.15 µg Sb/Kg; 1.5 - 1.5 µg Sb/kg; 15 - 15 µg Sb/kg; 150 - 150 µg Sb/kg and 1500 -1500 µg Sb/kg.

Figure 2. Liver cross section of animals exposed to Sb.





A and B: Normal liver histology. C and D: Vascular congestion. E and F: Vascular congestion. G and H: Granulomatosis. I and J: Hemossiderin deposition. K and L: Inflammatory response. M and N: Necrosis

3.3 KIDNEY

Biochemical parameters: Non-thiol protein concentration was not altered in male adult exposed to Sb but except for immature female exposed to 1.5 μg Sb/kg and castrated male exposed to 0.15 μg Sb/kg, decreased in immature female and castrated male exposed to antimony (FIG 3 A, B and C). The GST activity decreased in all immature female exposed to antimony, in castrated male exposed to 1.5 μg Sb/kg, 15 μg Sb/kg, 150 μg Sb/kg and in adult male

exposed to 0.15 $\mu\text{g Sb/kg}$ and 1500 $\mu\text{g Sb/kg}$. Lipid peroxidation concentration was not altered in all immature female and decreased in all castrated male antimony-exposed and in adult male exposed to 1.5 $\mu\text{g Sb/kg}$, 150 $\mu\text{g Sb/kg}$ and 1500 $\mu\text{g Sb/kg}$ (FIG 3 G, H and I). The protein carbonilation increased in immature female exposed to 0.15 $\mu\text{g Sb/kg}$, 1.5 $\mu\text{g Sb/kg}$ and 1500 $\mu\text{g Sb/kg}$ and in castrated male exposed to 0.15 $\mu\text{g Sb/kg}$. differently, PCO decreased in adult male exposed to 0.15 $\mu\text{g Sb/kg}$ and 1.5 $\mu\text{g Sb/kg}$.

Figure 3. Oxidative parameters and biomolecules damages in kidney.

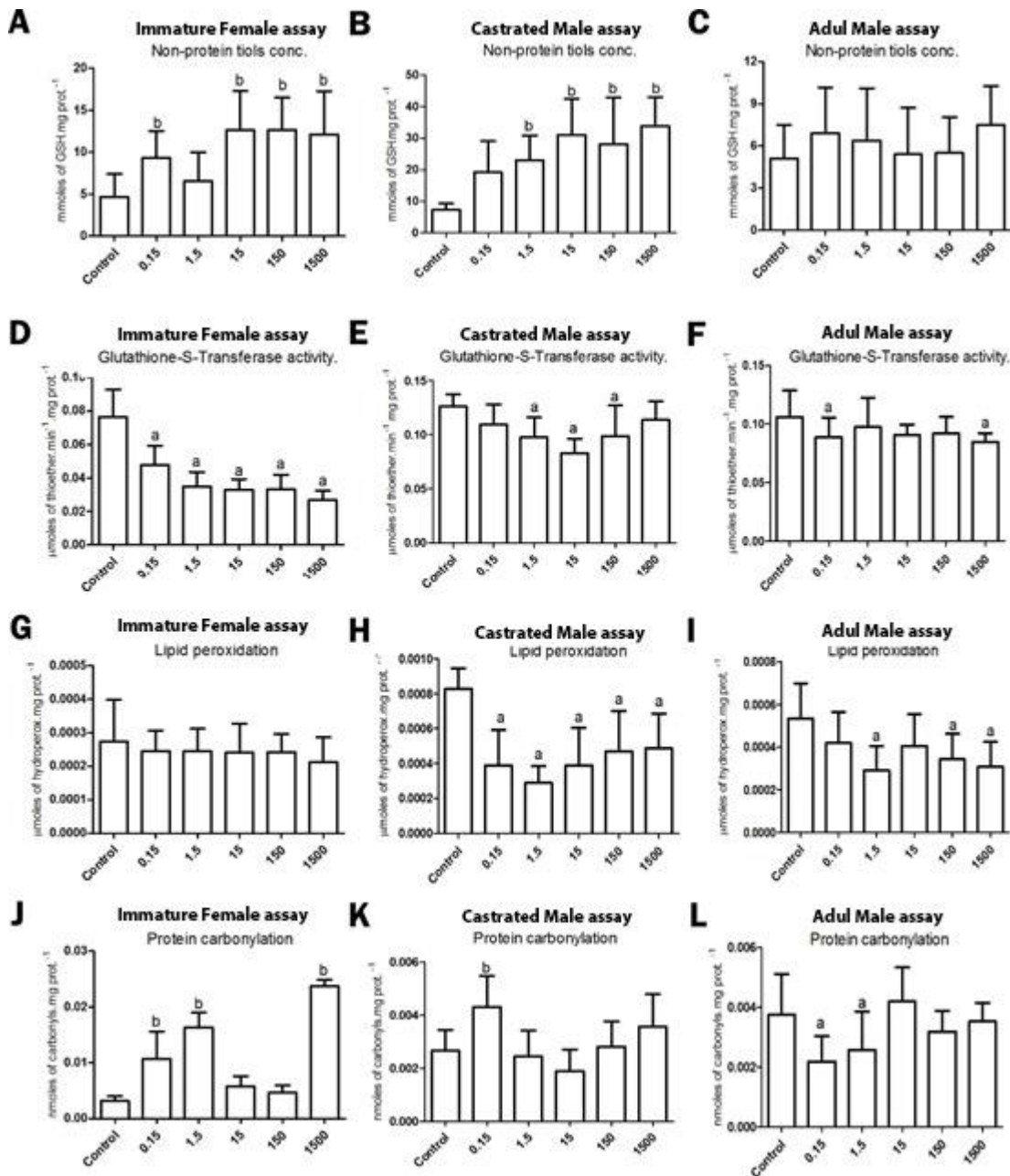


Figure 3. Biochemical parameters in kidney of animals exposed to Sb. Control - canola oil (vehicle); 0.15 µg Sb/Kg; 1.5 µg Sb/kg; 15 Sb/kg; 150 µg Sb/kg and 1500 µg Sb/kg. Letters represent $P < 0.05$ in comparison with control group and different letters represent differences between tested groups. Letter a indicate a decrease in relation to control group, while letter b indicates an increase in the evaluated parameter in comparison to control group.

Histopathological findings: Different renal alterations such as hidronephosis, lipid disease, steatosis, necrosis, glomeruloesclerosis, glomerulonephity, inflammatory response and hemosiderin deposition were observed in all

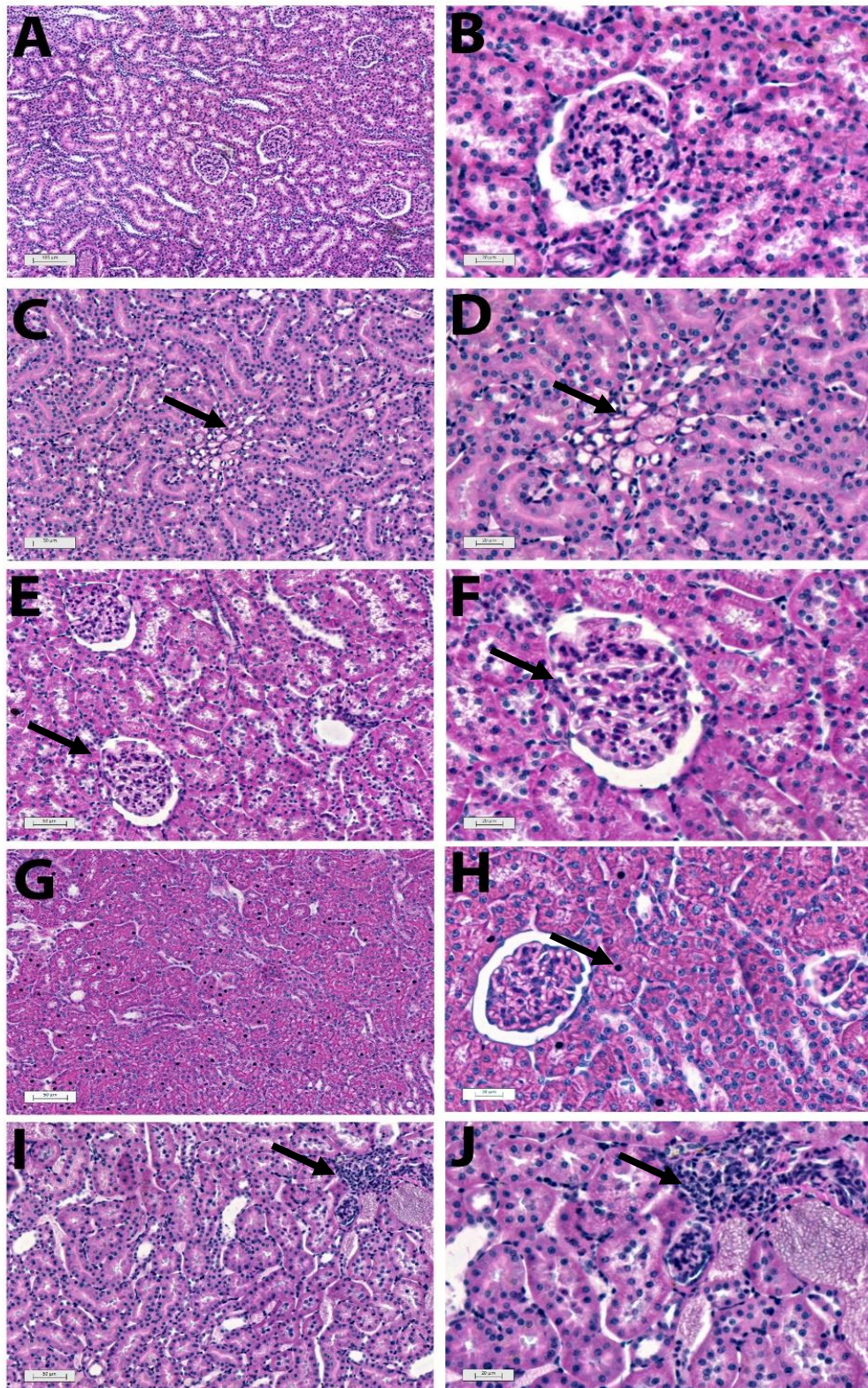
exposed groups including control groups, also demonstrated in Table 3. Lipoid disease in glomerulus were observed concomitantly with renal steatosis. The most frequent alterations were lipoid disease, steatosis and glomerulosclerosis.

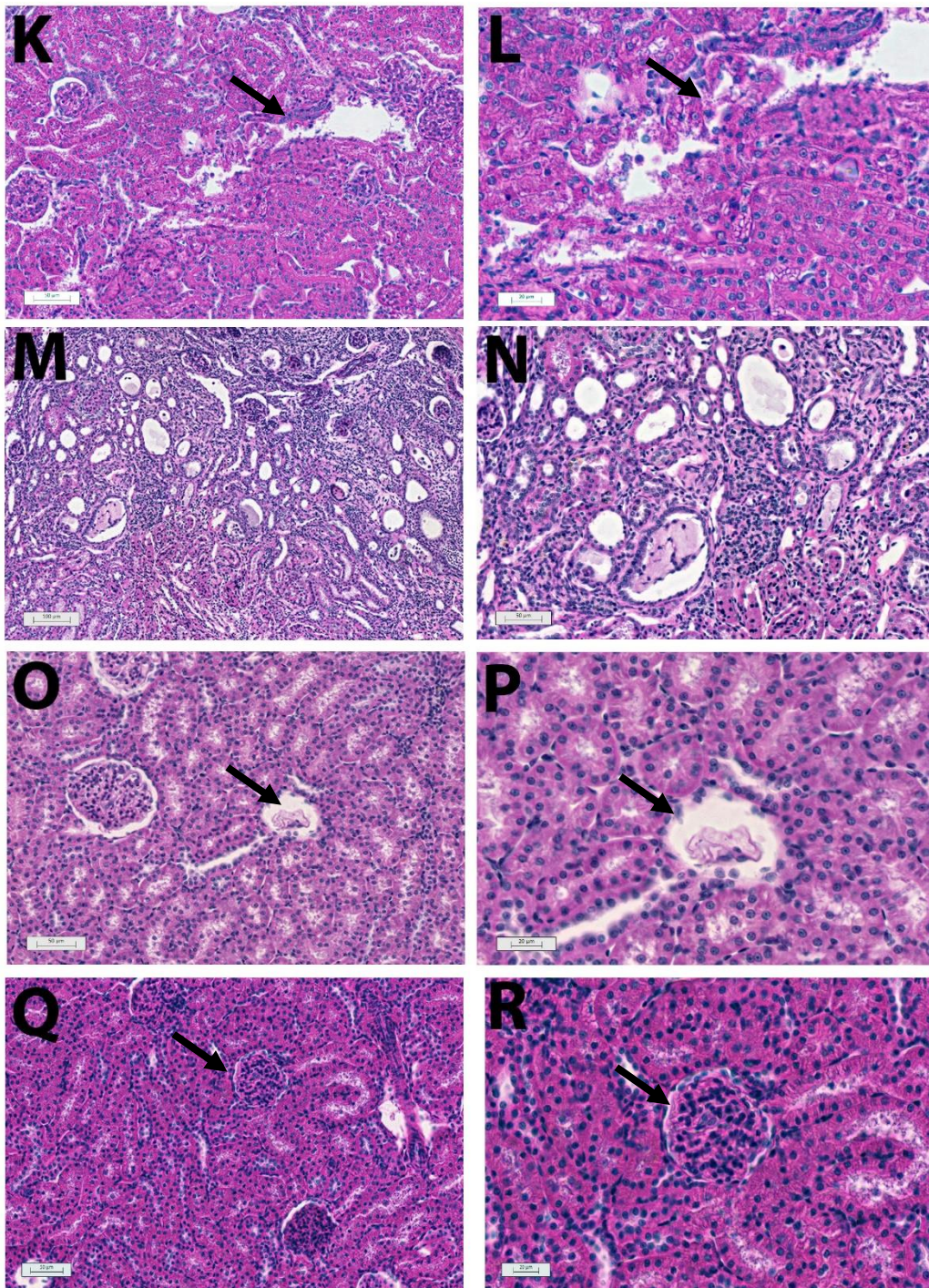
Table 3. Kidney histological findings in animals exposed to Sb.

Imature Female	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Renal hidronephrosis	6(15)	8(15)	3(15)	5(15)	3(15)	5(15)
Lipoid disease	3(10)	2(10)	1(10)	5(10)	6(10)	3(10)
Steatosis	3(10)	2(10)	1(10)	5(10)	6(10)	3(10)
Necrosis	2(10)	1(10)	0(10)	5(10)	2(10)	1(10)
Glomeruloesclorosis	0(10)	0(10)	1(10)	10(10)	7(10)	7(10)
Glomerulonephity	0(10)	1(10)	1(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Hemossiderin	4(10)	0(10)	0(10)	0(10)	5(10)	0(10)
Castrated male	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Renal hidronephrosis	1(15)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	1(15)
Lipoid disease	3(10)	6(20)	8(10)	6(10)	4(10)	2(10)
Steatosis	3(10)	6(20)	8(10)	6(10)	4(10)	2(10)
Necrosis	2(10)	4(10)	6(10)	4(10)	2(10)	3(10)
Glomeruloesclorosis	4(10)	6(10)	10(10)	8(10)	10(10)	0(10)
Glomerulonephity	0(10)	0(10)	0(10)	1(10)	0(10)	0(10)
Hemossiderin	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Inflammatory response	1(10)	4(10)	4(10)	2(10)	4(10)	1(10)
Adult male male	Control	0.15	1.5	15	150	1500
Renal hidronephrosis	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	1(15)
Lipoid disease	2(10)	4(10)	4(10)	6(10)	6(10)	4(10)
Steatosis	2(10)	4(10)	4(10)	6(10)	6(10)	4(10)
Necrosis	3(10)	4(10)	4(10)	0(10)	2(10)	1(10)
Glomeruloesclorosis	4(10)	7(10)	10(10)	7(10)	0(10)	6(10)
Glomerulonephity	1(10)	2(10)	1(10)	1(10)	0(10)	0(10)
Hemossiderin	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)
Inflammatory response	0(10)	0(10)	0(10)	4(10)	2(10)	0(10)

Control - canola oil (vehicle); 0.15 - 0.15 µg Sb/Kg; 1.5 - 1.5 µg Sb/kg; 15 - 15 µg Sb/kg; 150 - 150 µg Sb/kg and 1500 -1500 µg Sb/kg.

Figure 4. Kidney cross sections of animals exposed to Sb.





A and B: Normal kidney histology. C and D: Steatosis. E and F: Lipoid Disease. G and H: Hemosiderin deposition. I and J: Inflammatory response. K and L: Necrosis. M and N: Hydronephrosis. O and P: Glomerulosclerosis. Q and R: Glomerulonephritis.

3.4 HEART

Biochemical parameters: Non-thiol protein concentration was not changed in immature female exposed to antimony but increased in all castrated male groups, except in individuals from 0.15 μg Sb/kg group, and in adult male exposed to 150 μg Sb/kg in comparison to control group. The GST activity in heart and lung were below the level of detection by the used method. The lipid peroxidation decreased only in immature female exposed to 0.15 μg Sb/kg, 1.5 μg Sb/kg and 1500 μg Sb/kg in relation to control group. The levels of protein carbonilation increased in adult male exposed to 0.15 μg Sb/kg but decreased in adult male exposed to 15 μg Sb/kg, 150 μg Sb/kg and 1500 μg Sb/kg.

Figure 5. Oxidative parameters and biomolecules damages in heart.

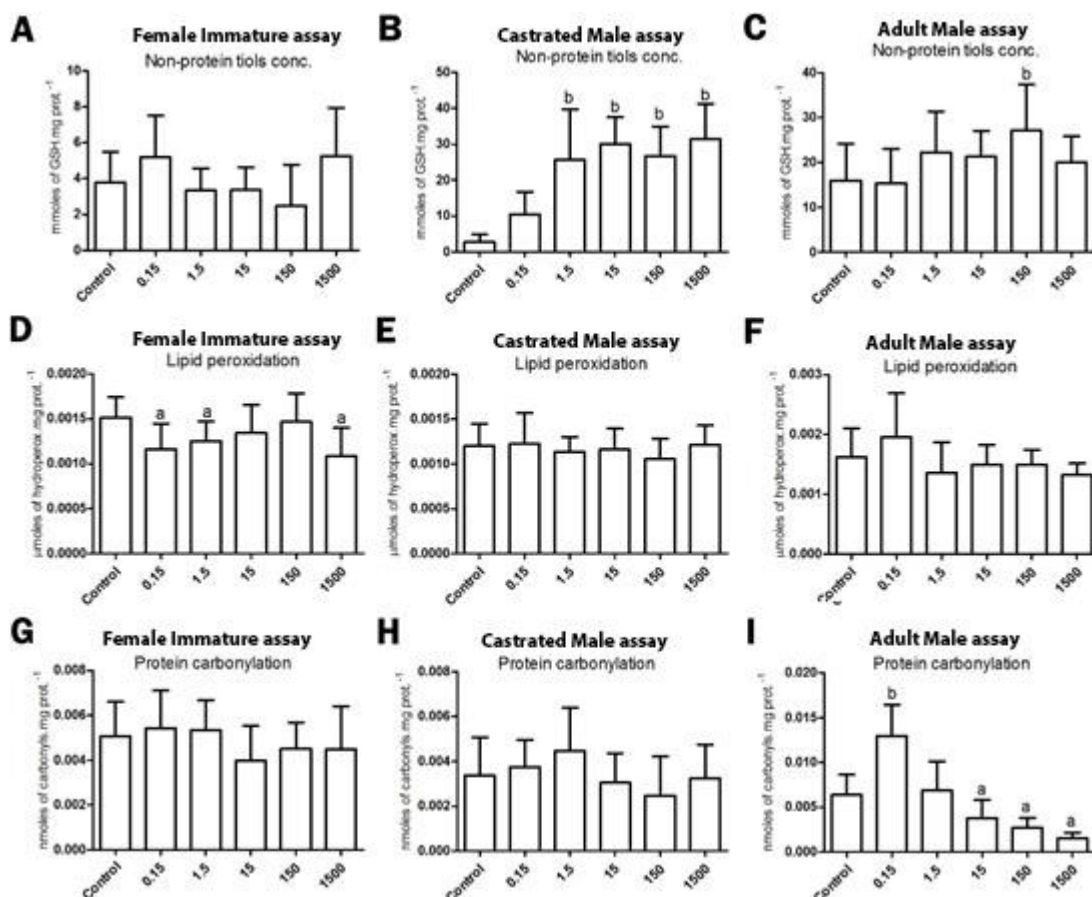


Figure 5. Biochemical parameters in heart of animals exposed to Sb. Control - canola oil (vehicle); 0.15 μg Sb/Kg; 1.5 μg Sb/kg; 15 Sb/kg; 150 μg Sb/kg and 1500 μg Sb/kg. Letters represent $P < 0.05$ in comparison with control group and different letters represent differences

between tested groups. Letter a indicate a decrease in relation to control group, while letter b indicates an increase in the evaluated parameter in comparison to control group.

3.5 LUNG

Biochemical parameters: Non-thiol protein concentration decreased in castrated males exposed to 150 μg Sb/kg and 1500 μg Sb/kg and increased in adult males exposed to 0,15 μg Sb/kg and 15 μg Sb/kg in comparison to control groups. The levels of LPO decreased only in castrated males exposed to 1500 μg Sb/kg and PCO levels increased in castrated males exposed to 150 μg Sb/kg and 1500 μg Sb/kg, and in adult males exposed to 1500 μg Sb/kg.

Figure 6. Oxidative parameters and biomolecules damages in lung.

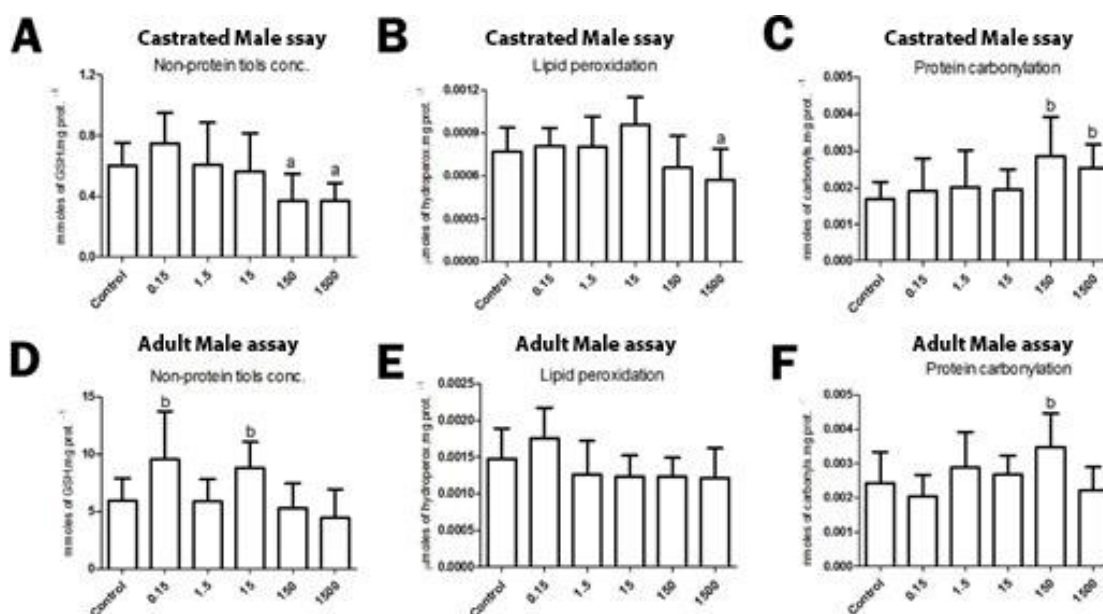


Figure 6. Biochemical parameters in lung of animals exposed to Sb. Control - canola oil (vehicle); 0.15 μg Sb/Kg; 1.5 μg Sb/kg; 15 Sb/kg; 150 μg Sb/kg and 1500 μg Sb/kg. Letters represent P<0.05 in comparison with control group and different letters represent differences between tested groups. Letter a indicate a decrease in relation to control group, while letter b indicates an increase in the evaluated parameter in comparison to control group.

3.6 BRAIN

The acetylcholinesterase activity decreased in all castrated males exposed to antimony in comparison to control, while no differences were observed between adult male exposed to antimony and control group.

Figure 7. Acetylcholinesterase activity in brain.

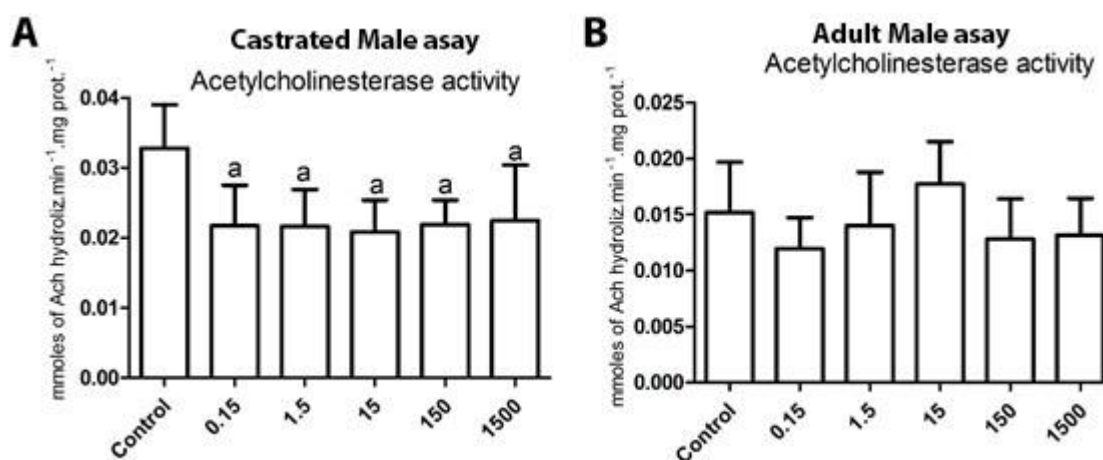


Figure 7. Brain acetylcholinesterase activity in animals exposed to Sb. Control - canola oil (vehicle); 0.15 - 0.15 µg Sb/Kg; 1.5 - 1.5 µg Sb/kg; 15 - 15 µg Sb/kg; 150 - 150 µg Sb/kg and 1500 -1500 µg Sb/kg. Letters represent P<0.05 in comparison with control group.

4 DISCUSSION

The present study comprises the most different scenarios of antimony exposure, since low levels as expected for people with healthy food habits until high levels as expected for children who consume many packed-food. The experimental procedure used herein is a well established study model for EPA and OECD and both animals and protocols showed satisfactory results for both, oxidative parameters and histological analysis.

In part the results confirm the liver, kidney and heart as important target tissues for study the antimony effects in animals after oral exposure. According to Sunagawa (1981) the accumulation of Sb in organs and tissues is not dose-related, showing a chemical preference to distinct organs, reinforcing the

current data. The absence of clinical toxicological signs or loss of weight in rats exposed to Sb were also subject of Dieter and colleagues (1991) investigation. The major difference are the higher intraperitoneal doses, where mortality and decreased body weight were found. In these sense the present results not are in accordance with that authors: herein the antimony exhibited adverse effects in rats, but not cause high mortality and loss of weght. A very important highlight in the current study is the investigation of the antimony effects after exposure to very low doses, in comparison to other studies which used very high Sb doses (GURNANI; SHARMA; TALUKDER, 1992;GURNANI; SHARMA; TALUKDER, 1993;HEXT; PINTO; RIMMEL, 1999).

Considering the macromolecule damages, such as LPO and PCO, was observed a general decrease in these parameters in animals exposed to Sb. Comparing adult male and castrated male, the first group appear to be more sensitive to damages in liver macromolecules. These findings could be explained by the metabolism of testosterone in liver of adult male (WILSON; LEBLANC, 2000). In general with the circulating hormones the hepatic tissue needs to metabolize these molecules, increasing the energy demand and decreasing the potentiality to react against oxidative stress. The low levels of PCO are in accordance with described by (BARP et al., 2002) where sex hormones inhibit the lipid peroxidation in liver, corroborating the present results. Additionally, Colantoni et al (2000) also suggests that not only the hormonal presence but also the sex affect the oxidative stress as the estradiol present protective roles.

In liver the response of GSH are more stable in intact adults males, but varied in immature females and castrated males. These data suggest the interference of hormones in maintain the redox balance in mainly in liver cells. Curiously the GST decrease the activity in liver of the same groups where a disturb of GSH was observed, but without changes to intact males individuals. This finding may strongly suggest the importance of hormones on Sb toxicity, or even the protective effect of hormonal balance on Sb toxicity, as the activity of GST is affected by the presence of the metal. GYURASICS et al., (1992) investigated a mechanism where Sb increase the biliary excretion of GSH decreasing as consequence the levels of hepatic GSH. The present results

showed the effect on GSH balance and GST activity depend of age and/or sex, or even hormones as also reported by (ZHU; CARVEY; LING, 2006). Disturbs in GSH levels are implicated also with reactive oxygen species production, rendering cells more susceptible to oxidative disturbs or damage in cellular biomolecules including nucleic acids, lipids and proteins (BOKOV; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004).

It is very consolidated that the metabolism of organic pollutants depend also on the well function of GST enzyme (FILIPAK, 2014). In this case, mainly to liver, the decrease of GST activity if related with hormonal disturbs can lead the organism to a more sensitize condition. The explanation to this hypothesis could be the increase of the residual time of some organic pollutants into the cell, increasing the potential toxicity of the substance if considering complex mixtures exposure. The damages in lipids and proteins in liver as described in the current study, confirm the protective hole of hormones supposed by antioxidant or even detoxification mechanisms (FELD 2008). Curiously in kidney the damages in protein are more accentuated differently that observed to liver, in terms of hormonal absence in immature females or disturbs as observed in castrated males. Still considering the damages in proteins, a clear protective effect of Sb exposure was observed in heart but not in lung where the results were similar to liver and kidney. The absence of effect in intact males support the thesis of hormonal protective condition and its importance of metals exposure as observe to Sb. Additionally, the non related doses and effects must be considered and could be an important highlight to investigate the toxicity of Sb in vertebrates. In this sense the use of Sb in leishmaniosis disease treatment can be an additional concerns as the clinical treatment is not related with age or sex.

Comparatively, as described above, the biochemical findings confirm the established by Sunagawa (1981) where the accumulation of Sb in different organs of rats is not dose related. Despite of all the results suggest liver as the principal target tissue to evaluate the effects of Sb followed by kidney.

Considering some progressive and regressive changes as necrosis and steatosis, respectively, the histopathological findings revealed that Sb is toxic to liver of rats in a dose related way mainly for castrated individuals. Additionally,

inflammatory response also suggest acute damages in individuals from this group. Necrosis is a strong parameter of cell or tissue injury and according to (BERNET et al., 1999) represent morphological which appears after irrevocable loss of cell function. The high incidence of regressive lesions in liver of individuals from castrated group seems to represent a consequence of biochemical disturbs as described above. Therefore, in female immature individuals exposed to Sb was observed biochemical disturbs but without the occurrence of regressive damage. The possible explanation should be other mechanism of toxicity involved with Sb exposure in males than the redox imbalance, or even other sex related events. The occurrence of necrosis reported by (MANN et al., 2006) in vitro studies, after exposure to antimony show the involvement of SEK1/JNK signaling pathways. In fact, these findings and the absence of lesions in individuals from non castrated males reinforce the thesis of protective role of hormones in Sb toxicity.

Curiously, a high incidence of steatosis was found only in males individuals exposed to Sb in a dose related way and independent of hormone balance. These alterations can be described as a non progressive one, but means an accumulation of lipids primarily caused by degeneration processes. The steatosis is also called by non-alcoholic fatty liver disease. Fatty liver is a common disease and no inflammation or damage is present, but the excess of fat can cause liver inflammation (CDC, 2008) , as observed in the current results, in which steatosis coincide with inflammatory responses. On the other hand, it represent a complex finding where it is possible that Sb may induce some physiological disturbs on the lipid metabolism which should be more investigated.

Overall, liver is the major biotransformation organ in the body and its correct working allows endogenous metabolism of hormones, nitrogenous excreted and hemoglobin degradation. Damages as described here under chronic exposure may lead to failure of the organ representing a large concern of public health.

The pharmacotoxicity of Sb in kidney is distinct when the organ is compared with liver. Both organs are affected by metal in different manner. While in liver adults females are not affected in kidney the histopathological

findings showed expressive changes as lipoid disease, steatosis, necrosis and inflammation mainly in individuals exposed to intermediate-high doses. Similar effects were found in male castrated individuals but not so evident in non-castrated males. The morphological damages in kidney are more severe than in other studied organs where progressive and regressive lesions were found. Different that observed in liver the hormonal balance means do not drive these effects. On this way, the histopathological data suggest that kidney is a more sensitive target organ to Sb exposure. These are very important findings since the Sb present organs selective toxicity that may be modulated or not by hormones, sex or age. Recently studies have confirmed the morphological sensibility of kidney to Sb in albino rats (EL-RASHEDY, 2013). (JIANG et al., 2016) also related different effects of Sb on renal cells *in vitro* considering oxidative parameters.

Considering the cardiovascular system (lung and heart), differently that observed to liver and kidney, no expressive changes were found. Additionally, the results showed that the hormone balance is not related with Sb toxicity. Summarizing, heart and lung are not important target organs to study risk of exposure to Sb. The observed tendency of increase in GSH and decrease in LPO and PCO confirm these thesis. Few studies have available the effect of Sb in these organs. TIRMENSTEIN et al., (1997), described the interaction of Sb with thiol-containing compounds and consequently increasing LPO in cardiac tissue, and also observed alterations in both protein and nonprotein thiol homeostasis in cardiac cells, but currently no *in vivo* studies have confirmed the mentioned results.

Recently more chemicals were related with neurotoxic effects including metals. The most usual biomarker to evaluate neurotoxicity in vertebrates is the activity of acetylcholinesterase (AChE inhibitors) (LARSEN et al., 2016)(YE et al., 2016). Nevertheless, very few is known about the neurotoxicity of Sb . In the current study, Sb did not present symptoms of neurotoxicity using the activity of AChE as biomarker, but, the hormone balance act as a protector against damages. This finding confirm the positive hole of hormones on integrity maintenance of tissues against Sb exposure, as described for liver and kidney. Overall, again the age and sex could be a physiological condition that could

sensitize the organism to Sb exposure increasing the risk of exposure depending on the stage of life cycle.

In conclusion the present data strongly suggest that a misbalance of hormones in Wistar rats can modulate in a positive way the toxic effects of trioxide of antimony. Kidney is more sensible to morphological damages after oral exposure to Sb trioxide while liver is presented as an important target tissue. The neurotoxicity of Sb was not observed in the current study, but clearly the hormone misbalance can modulate also this parameter in Wistar rats. Overall, more studies are necessary to investigate the open questions of this work in order to increase the understanding of antimony trioxide toxicity.

Conflict of interests statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology).

5 REFERENCES

ATSDR. **Toxicological PRofile For Antimony and Compounds**. [s.l: s.n.].

BACH, C. et al. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. **Water research**, v. 46, n. 3, p. 571–83, 1 mar. 2012.

BARP, J. et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1075–1081, 2002.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish proposal fro a protocol to assess aquatic pollution. p. 25–34, 1999.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 10-11 SPEC. ISS., p. 811–826, 2004.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUCCELLI, C. et al. Gender differences in drug abuse in the forensic toxicological approach. **Forensic Science International**, v. 265, p. 89–95, 2016.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. *Alcohol Use and Your Health*. Available at <http://www.cdc.gov/alcohol/fact-sheets/alcohol-use.htm>. Access in 12/06/2016;

COLANTONI, A., LA PAGLIA, N.,N.,, EMANUELE, M.A., EMANUELE, N.V., IDILMAN, R., HARIG, J., VAN THIEL, D. Influence of Sex Hormonal Status on Alcohol-Induced Oxidative Injury in Male and Female Rat Liver. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. V. 24 p.1467–1473, 2000.

DE BOECK, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. **Cobalt and antimony: Genotoxicity and carcinogenicity** *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003.

DIETER MP, JAMESON CW, ELWELL MR, LODGE JW, HEJTMANCIK M, GRUMBEIN SL, RYAN M, PETERS AC. Comparative toxicity and tissue distribution of antimony potassium tartrate in rats and mice dosed by drinking water or intraperitoneal injection. **J Toxicol Environ Health**. V. 34, p.51-82, 1991.

ELLIOTT, B. M. et al. An assessment of the genetic toxicology of antimony trioxide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 1998.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

EL-RASHEDY, A. H. A.-R. H. Role of Fat Feeding on the Diabetic Albino Rats. **Journal of Cytology & Histology**, v. 04, n. 03, 2013.

ETTLER, V. et al. Antimony availability in highly polluted soils and sediments - a comparison of single extractions. **Chemosphere**, v. 68, n. 3, p. 455–63, jun. 2007.

EU (2003). Technical guidance document on risk assessment. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, Luxembourg. [http://www.sttv.fi/kemo/olemassa%20olevat/TGD_Part%20I%20\(HH\).pdf](http://www.sttv.fi/kemo/olemassa%20olevat/TGD_Part%20I%20(HH).pdf); http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/publichealth/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd/tgdpart2_2ed.pdf; http://ec.europa.eu/environment/chemicals/exist_subst/pdf/tgdpart3_2ed.pdf; http://ec.europa.eu/environment/chemicals/exist_subst/pdf/tgdpart4_2ed.pdf. Accessed February 16, 2016.

EU RAR (2008). European Union risk assessment report. Diantimony trioxide. Draft. European Union. European Communities, Luxembourg. http://www.echa.europa.eu/documents/10162/13630/trd_rar_sweden_diantimony_trioxide_en.pdf. Accessed February 22, 2016.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y.-W. Antimony in the environment: a review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews Earth-Science ReÖiews**, v. 57, n. 57, p. 125–176, 2002.

Francisco Filipak Neto. **Pollutants and Oxidative Stress. Pollution and fiah health in tropical ecossistems. 2014. CRC Press.**

GURNANI, N.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparison of clastogenic effects of antimony and bismuth as trioxides on mice in vivo. **Biological Trace Element Research**, 1993.

GYURASICS, Á. et al. Increased biliary excretion of glutathione is generated by the glutathione-dependent hepatobiliary transport of antimony and bismuth. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 7, p. 1275–1281, out. 1992.

HE, M. Antimony pollution in China. **The Science of the total environment**, v. 421-422, p. 41–50, 1 abr. 2012.

HEXT, P. M.; PINTO, P. J.; RIMMEL, B. A. Subchronic Feeding Study of Antimony Trioxide in Rats. **JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY J. Appl. Toxicol**, v. 19, p. 205–209, 1999.

IYENGAR, G.V., TANNER, J. T. WOLF, W. R., ZEISLER, R. No Title No Title. **The Science of the Total Environment**, v. 1, n. 61, p. 235–252, 32435.

JIANG, X. et al. The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicol Lett**, v. 256, p. 11–18, 2016.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by

oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

LARSEN, K. E. et al. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 41–44, 2016.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LIU, F. et al. Antimony speciation and contamination of waters in the Xikuangshan antimony mining and smelting area, China. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 32, n. 5, p. 401–413, 2010.

MAHA FELD. Effects of Sex Hormones on Hepatic Gene Expression and Hepatocarcinogenesis. PhD thesis, Molecular and environmental Toxicology. University of Wisconsin. **2008**

MAHER, W. A. Antimony in the environment - The new global puzzle. **Environmental Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 93–94, 2009.

MANN, K. K. et al. Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. **Toxicology Letters**, 2006.

OECD/OCDE. Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats. n. September, p. 1–20, 2009.

RICHARDSON, S. D. Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 747–778, 2012.

ROSKILL. **Study of the antimony market.** [s.l: s.n.].

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SHTANGEEVA, I.; BALI, R.; HARRIS, A. Bioavailability and toxicity of antimony. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 110, n. 1, p. 40–45, jul. 2011.

SILVA DE ASSIS, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** Thesis. Berlin Technical University, Germany. p.99, 1998

STEMMER, K. L. Pharmacology and toxicology of heavy metals: antimony. **Pharmacology and Therapeutics, Part A: Chemotherapy, Toxicology and**, 1976.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. **Antimony toxicity***International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010.

SUNAGAWA, S..**Experimental studies on antimony poisoning.** *Igaku Kenkyu*, v.51, pp. 129–141, 1981

TIRMENSTEIN, M. A. et al. Antimony-induced alterations in thiol homeostasis and adenine nucleotide status in cultured cardiac myocytes. **Toxicology**, v. 119, n. 3, p. 203–211, maio 1997.

U.S. EPA. **TSCA Workplan Chemical Risk Assessment: Antimony Trioxide.** [s.l: s.n.].

WILSON, V. S.; LEBLANC, G. A. The contribution of hepatic inactivation of testosterone to the lowering of serum testosterone levels by ketoconazole. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 128–37, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. Antimony in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **Who**, p. 1–9, 2003.

YE, C. et al. Highly sensitive electrochemiluminescenc assay of acetylcholinesterase activity based on dual biomarkers using Pd-Au nanowires as immobilization platform. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 34–40, 2016.

ZHENG, J. A.; OHATA, M.; FURUTA, N. Antimony Speciation in Environmental Samples by Using High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 75–80, 2000.

ZHU, Y.; CARVEY, P. M.; LING, Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. **Brain Research**, v. 1090, n. 1, p. 35–44, 2006.

APÊNDICE: METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS DETALHADOS

DESENHO EXPERIMENTAL E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

O desenho experimental foi o mesmo descrito nos itens 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 do capítulo anterior. Os animais utilizados no capítulo I para avaliar disfunção endócrina, foram utilizados neste capítulo para avaliar as condições oxi-redutoras.

O experimento uterotrófico foi denominado nesta etapa do trabalho, experimento com fêmeas imaturas, visto que o objetivo do mesmo não tem correlação com o peso do útero e nem com o sistema endócrino. Para avaliação do estresse oxidativo não foram considerados os grupos expostos a estádio, estradiol associado a tamoxifeno e estradiol associado a antimônio.

Relativo ao experimento com fêmeas imaturas foram coletados fígado, rins e coração. Uma parte do fígado e o rim direito foram processados histologicamente conforme descrito no item 3.5 do capítulo anterior. O restante do tecido hepático, o rim esquerdo e o coração foram acondicionados a -80°C para posterior processamento.

Nesta etapa do trabalho o experimento de Hershberguer foi denominado Experimento com machos adultos castrados, visto que as análises correlatas ao estresse oxidativo, não tem relação com o sistema endócrino. Foram desconsiderados para estas análises os grupos expostos ao propionato de testosterona, propionato de testosterona associado à flutamida ou associado ao antimônio.

Referente ao experimento com machos adultos castrados e machos adultos, uma parte do fígado e o rim direito foram coletados e processados histologicamente. O restante do fígado, o rim esquerdo, o pulmão, coração e testículos (apenas para o ensaio com machos adultos) foram armazenados a -80°C para avaliações referentes ao estresse oxidativo. Cérebro e o músculo levantador do ânus também foram armazenados para avaliação da neurotoxicidade.

ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

As análises de estresse oxidativo foram realizadas em fígado, rim, pulmão, coração e gônadas (quando estas foram coletadas) provenientes dos animais dos ensaios anteriormente descritos.

As amostras de tecidos acondicionado em -80°C foram homogeneizadas em tampão fosfato Tris-HCl em pH 7,6, contendo 1mM de EDTA e 1mM de PMSF, e centrifugadas a 12000 g, a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para a realização dos seguintes ensaios:

- Peroxidação de lipídios: A quantidade de lipídeos peroxidados foi quantificado segundo JIANG *et al.* (1991, 1992) pelo método FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange*).

-Carbonilação de proteínas: A carbonilação protéica foi quantificado segundo LEVINE *et al.*, (1994).

-Concentração de glutathiona reduzida (GSH): A concentração de glutathiona reduzida foi quantificada segundo SEDLAK e LINDSAY, (1968). A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8,16, 24 e 32 nM GSH).

-Atividade da enzima Glutathiona S-transferase: A atividade da GST foi mensurada pelo método de KEEN (1976) onde GST catalisa a reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 340 nm.

-A atividade da acetilcolinesterase foi mensurada em músculo e cérebro dos animais referentes ao experimento com machos adultos e hershberguer, segundo o protocolo descrito por ELLMAN *et al.* (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998), no qual a acetilcolina é acoplada a enzima e clivada em acetato e tiocolina. A tiocolina reage com o DTNB, emitindo coloração amarelada, que é medida pelo espectrofotômetro a 405 nm.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

Para todos os dados foi primeiramente testada a normalidade através dos testes D'Agostinho & Pearson, Shapiro Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados apresentaram distribuição Gaussiana foi então aplicado o teste de ANOVA 1 via seguido do pós teste de Tukey. Quando os dados não apresentavam distribuição Gaussiana foi aplicado o teste de Kruska-Wallis seguido do pós-teste Dunn.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABDUL, K. S. M., SUDHEERA, S. J., EDIRIWEERA P.S., CHANNA J., MANGALA C.S. Arsenic and human health effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V. 40, p. 828-846, 2015

ATSDR. **TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ANTIMONY AND COMPOUNDS**. [S.L: S.N.].

BACH, C.; DAUCHY, X.; CHAGNON, M.-C.; ETIENNE, S. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. **Water research**, v. 46, n. 3, p. 571-83, 2012. Elsevier Ltd.

BARLAS, N., SAADET, Ö. GÖZDE, K. The estrogenic effects of apigenin, phloretin and myricetin based on uterotrophic assay in immature Wistar albino rats . **Toxicology Letters**. V. 226, p.35–42, 2014.

BARP, J. ET AL. MYOCARDIAL ANTIOXIDANT AND OXIDATIVE STRESS CHANGES DUE TO SEX HORMONES. **BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH**, V. 35, N. 9, P. 1075–1081, 2002.

BERNET, D. ET AL. HISTOPATHOLOGY IN FISH PROPOSAL FRO A PROTOCOL TO ASSESS AQUATIC POLLUTION. P. 25–34, 1999.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. THE ROLE OF OXIDATIVE DAMAGE AND STRESS IN AGING. **MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT**, V. 125, N. 10-11 SPEC. ISS., P. 811–826, 2004.

BRADFORD, M. A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, V.72, P.248-254, 1976.

BUCCELLI, C. ET AL. GENDER DIFFERENCES IN DRUG ABUSE IN THE FORENSIC OXICOLOGICAL APPROACH. **FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL**, V. 265, P. 89–95, 2016.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. *Alcohol Use and Your Health*. Available at <http://www.cdc.gov/alcohol/fact-sheets/alcohol-use.htm>. Acess in 12/06/2016;

CHOE, S.; KIM, S.; KIM, H.; HO, J.; CHOI, Y. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. **The Science of total Environmet**, v. 312, p. 15-21, 2003.

BUCCELLI, C. et al. Gender differences in drug abuse in the forensic oxicological approach. **Forensic Science International**, v. 265, p. 89–95, 2016.

COLANTONI, A., LA PAGLIA, N.,N., EMANUELE, M.A., EMANUELE, N.V., IDILMAN, R., HARIG, J., VAN THIEL, D. Influence of Sex Hormonal Status on Alcohol-Induced Oxidative Injury in Male and Female Rat Liver. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. V. 24 p.1467–1473, 2000.

DE BOECK, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. **Cobalt and antimony: Genotoxicity and carcinogenicity** *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of*

Mutagenesis, 2003.

DIETER MP, JAMESON CW, ELWELL MR, LODGE JW, HEJTMANCIK M, GRUMBEIN SL, RYAN M, PETERS AC. Comparative toxicity and tissue distribution of antimony potassium tartrate in rats and mice dosed by drinking water or intraperitoneal injection. **J Toxicol Environ Health**. V. 34, p.51-82, 1991.

DIXON, D. CASEY, E. R., ALICIA, B. M., EUGENE, A. G., ERIN, P. H., ELIZABETH, A. W., JASON, P. S., YI LUD, W. N., JEFFERSONE, R. R., NEWBOLDF, S. E. Histopathologic changes in the uterus, cervix and vagina of immature CD-1 mice exposed to low doses of perfluorooctanoic acid (PFOA) in a uterotrophic assay. **Reproductive Toxicology**, v 33, p. 506–512, 2012.

EERTMANS, F.; DHOOGHE, W.; STUYVAERT, F.; COMHAIRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in vitro**. v.17, p.515–524, 2003.

ERGENE, S.; CELIK, A.; CAVAŞ, T.; KÖLELI, N.; AYMAK, C. The evaluation of toxicity and mutagenicity of various drinking waters in the human blood lymphocytes (HULYs) in vitro. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 7, p. 2472-5, 2008.

ELLIOTT, B. M. et al. An assessment of the genetic toxicology of antimony trioxide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 1998.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

EL-RASHEDY, A. H. A.-R. H. Role of Fat Feeding on the Diabetic Albino Rats. **Journal of Cytology & Histology**, v. 04, n. 03, 2013.

ETTLER, V. et al. Antimony availability in highly polluted soils and sediments - a comparison of single extractions. **Chemosphere**, v. 68, n. 3, p. 455–63, jun. 2007.

EU (2003). Technical guidance document on risk assessment. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, Luxembourg. [http://www.sttv.fi/kemo/olemassa%20olevat/TGD_Part%20I%20\(HH\).pdf](http://www.sttv.fi/kemo/olemassa%20olevat/TGD_Part%20I%20(HH).pdf); http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/publichealth/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd/tgdpart2_2ed.pdf; http://ec.europa.eu/environment/chemicals/exist_subst/pdf/tgdpart3_2ed.pdf; http://ec.europa.eu/environment/chemicals/exist_subst/pdf/tgdpart4_2ed.pdf. Accessed February 16, 2016.

EU RAR (2008). European Union risk assessment report. DiAntimony trioxide. Draft. European Union. European Communities, Luxembourg.

http://www.echa.europa.eu/documents/10162/13630/trd_rar_sweden_diantimony_trioxide_en.pdf. Accessed February 22, 2016.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y.-W. Antimony in the environment: a review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews Earth-Science Reviews**, v. 57, n. 57, p. 125–176, 2002.

Francisco Filipak Neto. **Pollutants and Oxidative Stress. Pollution and fish health in tropical ecosystems. 2014. CRC Press.**

GIACCIO, L.; CICHELLA, D.; VIVO, B. DE; LOMBARDI, G.; ROSA, M. DE. Does heavy metals pollution affects semen quality in men? A case of study in the metropolitan area of Naples (Italy). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 112, p. 218-225, 2012

GUESMI, F., BEGHLEM, H., TYAGI, A.K., ALI, M.B., MOUHOUB, R.B., BELLAMINE, H., LANDOULSI, A. Prevention of H₂O₂ Induced Oxidative Damages of Rat Testis by Thymus algeriensis. **Biomed Environ Sci.** v29, p.275-285, 2016.

GURNANI, N.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparison of clastogenic effects of antimony and bismuth as trioxides on mice in vivo. **Biological Trace Element Research**, 1993.

GYURASICS, Á. et al. Increased biliary excretion of glutathione is generated by the glutathione-dependent hepatobiliary transport of antimony and bismuth. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 7, p. 1275–1281, out. 1992.

HE, M. Antimony pollution in China. **The Science of the total environment**, v. 421-422, p. 41–50, 1 abr. 2012.

HEXT, P. M.; PINTO, P. J.; RIMMEL, B. A. Subchronic Feeding Study of Antimony Trioxide in Rats. **JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY J. Appl. Toxicol**, v. 19, p. 205–209, 1999.

HEINZE, J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-Screen. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 127, n. 1-2, p. 136-8, 2011.

HAMPL, R., JANA, K., LUBOSLAV, S. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. V.155, p. 217-223, 2016.

IAVICOLI, I., FONTANA, L., BERGAMASCHI, A. The effects of metals as endocrine disruptors. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev.** v.12, p.206-23, 2006.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Technical report. **Pure Appl. Chem.** v.75, n.5, p. 631–681, 2003.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an

iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991
 JUGAN, M. N.; LEVI, Y.; BLONDEAU, J. P. Endocrine disruptors and hormone physiology. **Biochemical Pharmacology**.v.79, p.939–947, 2010.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D.M.; SINKS, T.; TILSON, H.A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. **EPA-sponsored workshop. Environm. Health Perspec.** v.104, p.715–740, 1996.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KERESZTES, S.; TATÁR, E.; MIHUCZ, V. G. et al. Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. **The Science of the total environment**, v. 407, n. 16, p. 4731-5, 2009. Elsevier B.V.

KIYAMA, R., YUKO, W. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. **Environment International**. V.83, p.11-40, 2015

KOKOSZKO, A., JAN D., ANDRZEJ L., MAŁGORZATA K. Protective effects of GH and IGF-I against iron-induced lipid peroxidation in vivo. **Experimental and Toxicologic Pathology**. V.60, p.453-458, 2008.

LEVAVI-SIVAN, B.; J. BOGERD; E.L. MAÑANÓS; A. GÓMEZ; J.J. LAREYRE. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **General and Comparative Endocrinology**.v.165. p.412–437. 2010.

LIU, Y., WenZhong, Z., Ling Y., XiaoHong, Z., XuDong, J.I.A., Ning, L.I. An Assessment of Androgenic/Anti-androgenic Effects of GH Transgenic Carp by **Hershberger Assay. Biomedical and Environmental Sciences**. V 24, p.445-449, 2011.

JIANG, X. et al. The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicol Lett**, v. 256, p. 11–18, 2016.

LARSEN, K. E. et al. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 41–44, 2016.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LIU, F. et al. Antimony speciation and contamination of waters in the Xikuangshan antimony mining and smelting area, China. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 32, n. 5, p. 401–413, 2010.

MARTINO-ANDRADE, A. J., MORAIS, R.N., SPERCOSKI, K.M., ROSSI, S.C., VECHI, M.F. GOLIN, M., LOMBARDI, N.F., GRECA, C.D., DALSEN, P.R. Effects of Tribulus terrestris on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. **Journal of**

Ethnopharmacology. V.127, P.165-170, 2010.

MAHA FELD. Effects of Sex Hormones on Hepatic Gene Expression and Hepatocarcinogenesis. PhD thesis, Molecular and environmental Toxicology. University of Wisconsin. **2008**

MAHER, W. A. Antimony in the environment - The new global puzzle. **Environmental Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 93–94, 2009.

MANN, K. K. et al. Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. **Toxicology Letters**, 2006.

MARTINO-ANDRADE, A.J., ARAÚJO, S., SANTANA, G.M., OHI, M., DALSENTER, P.R. Screening for in Vivo (Anti)estrogenic and (Anti)androgenic Activities of Technical and Formulated Deltamethrin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. V.35, P.379-382, 2002.

MOURA COSTA, D. D. Chapter 10: Emerging Contaminants and Endocrine System Dysfunction In: Eduardo Alves de Almeida; Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. (Org.). **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. 1ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013, v. 1, p.242-311.

OECD/OCDE. Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats. n. September, p. 1–20, 2009.

OGNJANOVIĆ, B. I., SNEŽANA D., MARKOVIĆ, N., ĐORĐEVIĆ, I., TRBOJEVIĆ, A., ŠTAJN, Z. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q₁₀ and Vitamin E. **Reproductive Toxicology**. V.29, P.191-197, 2010.

OKANA, A., NURHAYAT, B., GÖZDE, K. Investigation of effects of myricetin on thyroid-gonadal axis of male rats at prepubertal period. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V.4, p268–279, 2015.

OMURA, M.; TANAKA, A.; HIRATA, M.; INOUE, N. Testicular toxicity evaluation of two antimony compounds, antimony trioxide and antimony potassium tartrate, in rats and mice. **Environmental health and preventive medicine**, v. 7, n. 1, p. 15-8, 2002.

PINTO, B.; REALI, D. Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 212, n. 2, p. 228-32, 2009.

PLOTAN, M.; FRIZZELL, C.; ROBINSON, V.; ELLIOTT, C. T.; CONNOLLY, L. Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. **Food chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1590-6, 2013.

NJIA, M., ALI, R., MIRELA, U., MAJA, C. Histological and ultrastructural alterations of rat thyroid gland after short-term treatment with high doses of thyroid hormones. **Saudi Journal of Biological Sciences**, In Press, Corrected Proof, Available online 13 May 2015.

RICHARDSON, S. D. Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 747–778, 2012.

ROSKILL. **Study of the antimony market**. [s.l: s.n.].

RUNGCHANG, S.; NUMTHUAM, S.; QIU, X.; LI, Y.; SATAKE, T. Diffusion coefficient of antimony leaching from polyethylene terephthalate bottles into beverages. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 3, p. 322-329, 2013.

SAX, L. Polyethylene terephthalate may yield endocrine disruptors. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 4, p. 445-8, 2010.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L.R.;LAREYRE, J.J.;LEGAC, F.;CHIARINI-GARCIA, H.;NOBREGA, R.H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology** v.165. p. 390–411. 2010.

SHAMEEM, K., MOHAMMED, A., SUDHEERA, S., JAYASINGHE, E.P.S., CHANDANA, C., JAYASUMANA, P., MANGALA C.S. Arsenic and human health effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. V.40, p.828-846, 2015.

ATSDR. **Toxicological PRofile For Antimony and Compounds**. [s.l: s.n.].

BACH, C. et al. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. **Water research**, v. 46, n. 3, p. 571–83, 1 mar. 2012.

BARP, J. et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1075–1081, 2002.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish proposal fro a protocol to assess aquatic pollution. p. 25–34, 1999.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 10-11 SPEC. ISS., p. 811–826, 2004.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUCCELLI, C. et al. Gender differences in drug abuse in the forensic oxicological approach. **Forensic Science International**, v. 265, p. 89–95, 2016.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. *Alcohol Use and Your Health*. Available at <http://www.cdc.gov/alcohol/fact-sheets/alcohol-use.htm>. Access in 12/06/2016;

COLANTONI, A., LA PAGLIA, N.,N.,, EMANUELE, M.A., EMANUELE, N.V., IDILMAN, R., HARIG, J., VAN THIEL, D. Influence of Sex Hormonal Status on Alcohol-Induced Oxidative

Injury in Male and Female Rat Liver. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. V. 24 p.1467–1473, 2000.

DE BOECK, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. **Cobalt and antimony: Genotoxicity and carcinogenicity** **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2003.

DIETER MP, JAMESON CW, ELWELL MR, LODGE JW, HEJTMANCIK M, GRUMBEIN SL, RYAN M, PETERS AC. Comparative toxicity and tissue distribution of antimony potassium tartrate in rats and mice dosed by drinking water or intraperitoneal injection. **J Toxicol Environ Health**. V. 34, p.51-82, 1991.

ELLIOTT, B. M. et al. An assessment of the genetic toxicology of antimony trioxide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 1998.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

EL-RASHEDY, A. H. A.-R. H. Role of Fat Feeding on the Diabetic Albino Rats. **Journal of Cytology & Histology**, v. 04, n. 03, 2013.

ETTLER, V. et al. Antimony availability in highly polluted soils and sediments - a comparison of single extractions. **Chemosphere**, v. 68, n. 3, p. 455–63, jun. 2007.

EU (2003). Technical guidance document on risk assessment. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, Luxembourg. [http://www.sttv.fi/kemo/olemassa%20olevat/TGD_Part%20I%20\(HH\).pdf](http://www.sttv.fi/kemo/olemassa%20olevat/TGD_Part%20I%20(HH).pdf); http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/publichealth/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd/tgdpart2_2ed.pdf; http://ec.europa.eu/environment/chemicals/exist_subst/pdf/tgdpart3_2ed.pdf; http://ec.europa.eu/environment/chemicals/exist_subst/pdf/tgdpart4_2ed.pdf. Accessed February 16, 2016.

EU RAR (2008). European Union risk assessment report. DiAntimony trioxide. Draft. European Union. European Communities, Luxembourg. http://www.echa.europa.eu/documents/10162/13630/trd_rar_sweden_diantimony_trioxide_en.pdf. Accessed February 22, 2016.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y.-W. Antimony in the environment: a review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews Earth-Science ReÖiews**, v. 57, n. 57, p.

125–176, 2002.

Francisco Filipak Neto. **Pollutants and Oxidative Stress. Pollution and fish health in tropical ecosystems. 2014. CRC Press.**

GURNANI, N.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparison of clastogenic effects of antimony and bismuth as trioxides on mice in vivo. **Biological Trace Element Research**, 1993.

GYURASICS, Á. et al. Increased biliary excretion of glutathione is generated by the glutathione-dependent hepatobiliary transport of antimony and bismuth. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 7, p. 1275–1281, out. 1992.

HE, M. Antimony pollution in China. **The Science of the total environment**, v. 421-422, p. 41–50, 1 abr. 2012.

HEXT, P. M.; PINTO, P. J.; RIMMEL, B. A. Subchronic Feeding Study of Antimony Trioxide in Rats. **JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY J. Appl. Toxicol**, v. 19, p. 205–209, 1999.

IYENGAR, G.V., TANNER, J. T. WOLF, W. R., ZEISLER, R. No Title No Title. **The Science of the Total Environment**, v. 1, n. 61, p. 235–252, 32435.

JIANG, X. et al. The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicol Lett**, v. 256, p. 11–18, 2016.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

LARSEN, K. E. et al. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 41–44, 2016.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LIU, F. et al. Antimony speciation and contamination of waters in the Xikuangshan antimony mining and smelting area, China. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 32, n. 5, p.

401–413, 2010.

MAHA FELD. Effects of Sex Hormones on Hepatic Gene Expression and Hepatocarcinogenesis. PhD thesis, Molecular and environmental Toxicology. University of Wisconsin. **2008**

MAHER, W. A. Antimony in the environment - The new global puzzle. **Environmental Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 93–94, 2009.

MANN, K. K. et al. Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. **Toxicology Letters**, 2006.

OECD/OCDE. Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats. n. September, p. 1–20, 2009.

RICHARDSON, S. D. Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 747–778, 2012.

ROSKILL. **Study of the antimony market.** [s.l: s.n.].

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SHTANGEEVA, I.; BALI, R.; HARRIS, A. Bioavailability and toxicity of antimony. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 110, n. 1, p. 40–45, jul. 2011.

SILVA DE ASSIS, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** Thesis. Berlin Technical University, Germany. p.99, 1998

STEMMER, K. L. Pharmacology and toxicology of heavy metals: antimony. **Pharmacology and Therapeutics, Part A: Chemotherapy, Toxicology and**, 1976.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. **Antimony toxicity** **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2010.

SUNAGAWA, S. **Experimental studies on antimony poisoning.** *Igaku Kenkyu*, v.51, pp. 129–141, 1981

TRELOAR, A,E, BOYNTON, R.E., BEHN, B.G., BROWN, B.W. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil.* V.12, p77-126, 1967.

TYLEND, C. A.; FOWLER, B. A. C h a p t e r 18 Antimony. **Book**, p. 353-365, 2007.

TIRMENSTEIN, M. A. et al. Antimony-induced alterations in thiol homeostasis and adenine nucleotide status in cultured cardiac myocytes. **Toxicology**, v. 119, n. 3, p. 203–211, maio 1997.

U.S. EPA. **TSCA Workplan Chemical Risk Assessment: Antimony Trioxide**. [s.l: s.n.].

WANG, Y., YANG, S., WEI, F., PENG, W., PAN, Y., JIN, L., ZHEN, H., YING-JUN, C., CHONG, L., LI, S., JING, Y., LONG-JIE, G., QIANG, Z., WEN-QING, L. Association of urinary metal levels with human **semen** quality: A cross-sectional study in China. **Environment International**. V. 91, p.51-59, 2016.

WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v.36, p.118–130, 2002.

WILSON, V. S.; LEBLANC, G. A. The contribution of hepatic inactivation of testosterone to the lowering of serum testosterone levels by ketoconazole. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 128–37, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. Antimony in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **Who**, p. 1–9, 2003.

YE, C. et al. Highly sensitive electrochemiluminescence assay of acetylcholinesterase activity based on dual biomarkers using Pd-Au nanowires as immobilization platform. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 34–40, 2016.

ZHENG, J. A.; OHATA, M.; FURUTA, N. Antimony Speciation in Environmental Samples by Using High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 75–80, 2000.

ZHU, Y.; CARVEY, P. M.; LING, Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. **Brain Research**, v. 1090, n. 1, p. 35–44, 2006.

ZHAO, Y., LEIMING, C., JIE, W., YINGLIANG, W., BAOYU, Y., LE, Z. **Uterotrophic assay**, Hershberger **assay**, and repeated 28-day oral toxicity study of flumorph based on the Organization for Economic Co-operation and Development draft protocols. **Experimental and Toxicologic Pathology**. V. 63, p. 143-149, 2011.

ZHAO, Q., AIHONG, M., JIAWEI, Y., JING, S., RONG, Z., LU, G., YANG, L., HONG, Z. Fe ion irradiation induced apoptosis through Nrf2 pathway in mouse testis. **Life Sciences**. V. 157, p. 32-37, 2016.

□

ZHANG, W., Jinsong, Y., Jiali, W., Pincang, X., Youqiong, X., Haimei, J., Yongshan, C. Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of **cadmium** and p-nonylphenol. **Toxicology**. V.241, p. 84-91, 2007