

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

Esdras Barbosa Garcia

**EFEITO DA DESREGULAÇÃO TIREOIDEANA INDUZIDA POR OCTIL METOXI
CINAMATO SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS EM RATOS**

Rio de Janeiro

2015

Esdras Barbosa Garcia

**EFEITO DA DESREGULAÇÃO TIREOIDEANA INDUZIDA POR OCTIL METOXI
CINAMATO SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS EM RATOS**

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

Orientador: Dr. Fabio Coelho Amendoeira

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Garcia, Esdras Barbosa

Efeito da desregulação tireoideana induzida por octil metoxi cinamato sobre parâmetros cognitivos em ratos / Esdras Barbosa Garcia. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2014.

77 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Fábio Coelho Amendoeira

1. Protetores Solares. 2. Doenças da Glândula Tireoide. 3. Manifestações Neurocomportamentais. 4. Octanóis. 5. Vigilância Sanitária. I Título

Effect of thyroid disruptor induced by octyl methoxy cinnamate upon cognitive parameters in
rats

Esdras Barbosa Garcia

**EFEITO DA DESREGULAÇÃO TIREOIDEANA INDUZIDA POR OCTIL METOXI
CINAMATO SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS EM RATOS**

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

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Marcelo de Pádula (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Vinícius de Frias Carvalho (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

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

Dedico este trabalho à minha amada madrinha Tia Verinha que foi minha mãe ao mesmo tempo. E *in memoriam* dos meus avós Alberinda de Oliveira Barbosa e Pedro Barbosa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, aos anjos e santos por terem sido a força motriz e a bússola em minha vida.

A minha Tia Verinha guerreira e incansável na sua árdua trajetória em carregar a sua cruz e me auxiliar com o peso da minha. Obrigado por nunca desistir de mim e por patrocinar os meus sonhos a qualquer custo.

A minha família excêntrica, composta pela minha irmãzinha do coração Jacxilaine com seu amor puro e terno, minha tia Pretinha durona como o diamante, meu amado flamenguista número 1 Tio Serginho e a mulher mais importante da minha vida Tia Verinha por ser a coluna central responsável por colocar ordem em todo esse caos.

Ao Meu Pai coronel, coruja que só, por sua preocupação e excesso de zelo. A sua esposa Geni, por me oferecer tanto espaço em sua vida. Fora aquele tempero que sempre prepara para eu trazer nas viagens e colocar na minha comida. Na casa desses dois só posso sair da mesa quando estou passando mal.

Ao meu querido tio Ivan pelas intermináveis discussões políticas, filosóficas, religiosas, musicais, científicas e futebolísticas. O tempo voa ao seu lado cara e ainda tenho muito que aprender com o senhor. Espero que Deus ainda me dê muita oportunidade para esse aprendizado.

A minha amada afilhada Larah por tanto amor e carinho e a sua mãezinha querida e minha amiga Jack por nunca se esquecerem de mim. Pelas conversas, gargalhadas, bobagens, festas, carnavais, por aquele boi com fritas, pelo x peitudo, pela guaranita que estou com muita saudades de tomar, pelo caldo da Marildinha, pelo hot dog com calabresa, pelo macarrão, pela pizza disputada pedaço a pedaço na faca, pelo café das tardes, meu Deus quanta comida, kkkkkkk, mas principalmente pelo companheirismo e amizade incondicional. Tua amizade é um presente de Deus.

Ao meu eterno amigo e braço direito Celcimar, pelas ótimas trocas, pelas conversas leves e inspiradoras. Pelos enredos ricos e variados. Pelos conselhos valiosos que carrego comigo e carregarei pro resto da minha vida terrena. Velho, estou contigo pra qualquer batalha.

A minha amiga ciumenta Josi que tanto tenho apreço, por sua eterna gratidão, por me oferecer um carinho que muitas das vezes nem mereço, por sua meiguice, por sua cobrança pela minha presença, por sua força admirável.

A minha trupe eterna da Neurotox, época boa da iniciação científica, Sergio Kuriyama por abrir as portas da ciência pra mim e me enxergar quando eu era invisível, Camillinha e Leon por terem me acompanhado nessa grande trajetória de bancada e que bom que o companheirismo foi tão grande que ele não coube dentro dos muros da Fiocruz. A amizade perdura até hoje aqui fora.

A minha grande parceira de faculdade Thamyres e as Ronconis por terem praticamente me adotado como membro dessa família

Aos amigos de faculdade Sarmiento, Carol, Amelinha, Beatris Lessa, Moniquinha, Rafaela pela amizade constante e caridosa.

Ao meu querido orientador Fabio Amendoeira, por ter aceitado essa robada que é me orientar. Por comprar minhas ideias, por melhorá-las e por dar ideias melhores ainda, por suas intensas discussões, por seu gigantismo na resolução de problemas, por me motivar ao invés de me podar buscando sempre entender meus devaneios. As piadas, boas conversas e ao suporte valoroso e indispensável com os experimentos e por me ajudar a secar a sala de comportamentos quando a piscina furou. Sem falar no mais importante que é a amizade. Ah, não posso me esquecer também ao suporte nos congressos financiados pela Fundação Amendoeira. Fica tranquilo, pois a carreira acadêmica de sua filha está garantida.

Ao meu querido coorientador Tiago Savignon, o segundo desavisado que cometeu essa imprudência que é me orientar. Neuro guy, obrigado pelas calorosas discussões, enérgicas por sinal, um tanto efusivas e que

contribuíram bastante para o meu crescimento. Ao suporte na bancada, as brilhantes ideias com os testes comportamentais e pela amizade. Êêê caboclo... Só os fortes entenderão.

Ao meu querido Fausto Ferraris pelas ótimas dicas e ideias, pela amizade incondicional. Por acabar sendo não oficialmente meu coorientador por fora. Nunca vou esquecer o dia em que entramos às 7 da manhã no laboratório e saímos às 23:35 contando células. Não tinha taxi e a saída do instituto só foi possível graças a abençoada Flavinha para nos carregar em segurança da Fundação em seu possante. Agradecer também a hospitalidade em sua residência. E a sua esposa Carla por sua generosidade e hospitalidade me recebendo super bem na casa de vocês.

As amadas meninas super poderosas e engrenagens fundamentais nos meus experimentos, agradecer por todo esse estrogênio, ajuda e companheirismo:

Livia, por aquela força lá nos estudos pilotos e pelo moleque bom diário no pulmão.

Amanda pelos finais de semana me ajudando a tratar os bichos e por sua vontade diária de querer me dar um pescotapa. Adoro esse jaleco preto.

Thaís vou mandar um salve, por aquela ajuda no teste da piscina e com os vídeos e por rir bastante comigo até a barriga doer. Vamos comer uma torta de chocolate para comemorar, pode deixar.

Sibele, por sua meiguice, carinho e principalmente por ter jogado OMC no meu olho. Graças a você hoje sou um animal que é comparado frente ao grupo controle. Ah e por sempre me defender também e pela ajuda com os vídeos e tratamentos. Obrigado por rir até sair lágrimas nos olhos ao meu lado.

Flavinha, por sua ajuda na bancada, nas eutanásias, por arrancar uns cérebros bizarros, pelas caronas, pelas boas gargalhadas e bobearas no laboratório. Papa pel , I need you, ô papa pel, iê iê iê iê iê, papa pel. Piada interna.

A pequena Wil, a Wil survive por suas perguntas perspicazes, por quase quebrar minhas pernas em algumas delas e por ser o mascotinho do grupo e por me oferecer a oportunidade de ensinar o pouco do que sei.

A Taline e Renata, 1, 2... 1, 2... Pelo rapaizinho, pelo menino forte e por todas outras zueiras possíveis. Pela ajuda com o que estivesse precisando no experimento.

Dona Claudete e dona Helena por também me darem uma força com as parafernalias que eu precisava no laboratório.

Kátia Leandro, sou eternamente grato por tudo o que fez por mim, as meninas da pós-graduação por tamanha receptividade e prontidão e aos professores pelos ensinamentos.

A equipe do SAL, Reginaldo, Jussara, Marcos, e as meninas da limpeza por aqueles vários galhos quebrados. Vocês são show de bola.

Ao CECAL pelo fornecimento de animais.

A equipe da manutenção por confeccionar com maestria e precisão meus artefatos para os testes comportamentais.

Ao bloco da Imuno por ceder o freezer – 70°C e ao bloco da Química por ceder a balança e o ácido clorídrico.

A Roseli pela lâmpada incandescente cedida para o estudo piloto.

A Sonia Doria por ter cedido gentilmente filtros solares para os estudos pilotos.

Obrigado Vivi e as meninas da UERJ pelo PTU gentilmente cedido e pelos macetes da tireóide.

Ao Vinícius Carvalho pela dosagem do T4 e pelo levotiroxina gentilmente cedida, e pelas dicas na BAT5.

A todos do DFT e do INCQS.

A Fundação Oswaldo Cruz. Apoio financeiro PAPES, APQ1 e FIOCRUZ.

Muitos dos fracassos da vida ocorrem com pessoas que não perceberam o quão perto estavam do sucesso no momento em que desistiram.

Thomas Edison

RESUMO

A radiação ultravioleta pode gerar vários efeitos nocivos à saúde humana, dentre eles danos no DNA, catarata, melanoma, dentre outras malignidades. Em função desses efeitos existe a necessidade de proteger a saúde da população dos raios ultravioletas (UV) utilizando-se de cosméticos que atuem como filtros contra essa radiação. O mercado consumidor apresenta uma variedade desses filtros solares. O octil metoxi cinamato (OMC) é um deles, muito empregado em produtos cosméticos como xampus, batons, sabonetes líquidos entre outros, produtos esses que são comercializados no Brasil. Diversos estudos têm apontado a presença dele em fluidos biológicos como sangue, urina e leite materno humano, assim como sua presença na água e em tecidos de diversos animais. A literatura tem o demonstrado como potencial desregulador da tireóide. Em humanos, alterações na função tireoideana durante períodos críticos do desenvolvimento podem gerar comprometimentos como hiperatividade, problemas motores e déficit de memória e aprendizagem. Por isso, o presente trabalho visa avaliar se a exposição ao OMC no período lactacional é capaz de induzir a desregulação tireoideana e alterações neurocomportamentais em ratos. Para alcançar tal objetivo ratos de ambos os sexos foram sexados e divididos nos dois grupos de exposição no dia pós-natal 1 (PN), óleo de milho ou OMC. Os roedores receberam diariamente uma dose de OMC na concentração de 500 mg/kg/dia do PN5 ao PN22. No PN23, dia do desmame, metade dos animais foi eutanasiada, o sangue coletado para dosagem de tiroxina total (T4) e coleta do timo e baço. Aqueles que não foram eutanasiados seguiram até a vida adulta para serem submetidos a testes comportamentais. A exposição dos roedores ao OMC durante o período lactacional reduziu T4 total. Além disso, este grupo apresentou menor ganho de peso no período lactacional que foi revertido após o desmame bem como atraso na abertura de olhos. A análise do timo e baço mostrou diminuição do peso relativo, sem alterar o número de células. No labirinto em cruz elevado o número de entradas nos braços abertos foi significativamente maior. No campo vazado observamos que os animais OMC deslocaram-se significativamente mais. Não observamos alterações cognitivas no labirinto aquático de Morris. Portanto o filtro solar em questão causou várias alterações no desenvolvimento, sistema imune, comportamento e hormônio tireoideano. Tais alterações servem de alerta para o uso de OMC em infantes expostos em períodos críticos do desenvolvimento.

Palavras-chave: Protetor solar, OMC, desregulador da tireóide, neurocomportamental.

ABSTRACT

The ultraviolet radiation may induce several adverse effects for human health, as well damage in DNA, cataract, immunosuppression, melanoma and others malignancies. Because these effects is necessary to protect the population health of ultravioleta (UV) using cosmetics that act like filters against this radiation. The consumption market show a variety of these sunscreens. The octyl methoxy cinnamate (OMC) is one these, at organic sunscreens that protects against UV radiation widely used in personal care products such as sunscreens, shampoos, lipstick, liquid soap and others products that are commercialy available. The problem is that studies display the OMC presence in biologics fluids such as blood, urine and human breast milk beyond presence in water and all food chain. This have worried researchers in whole world because several works shows that OMC is a potencial disruptor the thyroid axis. It's well knew that disturbances in the thyroid axis during critical period of development may cause hyperactivity, motor disorders and déficit in memory and learning. This present work aim to evaluate if the thyroid disruptor induced by administration of OMC in rats in lactacional period cause neurobehavioral alterations. In this context, pups were separated and divided in two exposition groups in post natal day 1 (PN), corn oil or OMC. The rodents received daily one dose of OMC at 500 mg/kg/day at PN5 until PN22. In PN23, day of weaning, part of animals were euthanasied for to collect of blood for total T4 dosage and organs collets such as brain, pituitary, hypothalamo, thyroid, liver, thymus and spleen. Those that don't were euthanasied lead until adult life for submitted behavioral tests. The exposition of rodents OMC during lactacional period decreased total T4. Moreover, this group display decreasead weight gain in lactacional period that were reverted after weaning. The OMC administration delayed total open eyes of animals. Plus this were observed decreasead in relative weight of thymus and spleen without change the total number of cells this organs. And in behavioral tests, the OMC rodents visited more times the open arms in elevated plus maze, deslocated more in hole board and no exhibited cognitives changes in Morris water maze. This alterations alert for the use of OMC in infants exposure in criticals periods of neurodevelopment.

Key-words: Sunscreens, OMC, thyroid disruptor, neurobehavioral alterations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Classe de filtros solares e os sítios onde são encontrados.....	18
Figura 1	Eventos cerebrais no córtex e hipocampo.....	22
Figura 2	Eixo tireoideano.....	24
Figura 3	Vias de biossíntese e liberação dos HT's.....	25
Figura 4	Mecanismo de ação dos filtros solares.....	26
Figura 5	Desenho experimental.....	32
Figura 6	Foto do labirinto em cruz elevado.....	35
Figura 7	Foto do campo vazado.....	36
Figura 8	Foto do labirinto aquático de Morris.....	37
Tabela 1	Pontos de partida durante as duas etapas do teste.....	38
Figura 9	Piscina com plataforma.....	40
Figura 10	Piscina sem plataforma.....	40
Gráfico 1	Percentual de sobrevivência.....	42
Tabela 2	Avaliação do neurodesenvolvimento.....	43
Gráfico 2	Ganho de peso no período lactacional.....	44
Gráfico 3	Ganho de peso no pós-desmame.....	45
Gráfico 4	Dosagem sérica de T4 total.....	46
Gráfico 5	Peso relativo do timo e do baço.....	47
Gráfico 6	Número de células do timo e do baço.....	48
Gráfico 7	Avaliação de ansiedade.....	49
Gráfico 8	Atividade locomotora.....	50
Gráfico 9	Memória e aprendizado.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ASFB	Ácido sulfônico fenilbenzimidazol
BS	Benzilsalicilato
BZF2	Benzofenona 2
BZF3	Benzofenona 3
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
2,4DOHBZF	2,4 dihidroxi benzofenona
4,4DOHBZF	4,4 dihidroxi benzofenona
EHDPABA	Etilhexildimetil aminobenzoato
FS	Fenilsalicilato
F1	Primeira geração filial
HMS	Homosalato
HPT	Hipotálamo-Pituitária-Tireóide
HT's	Hormônios tireoideanos
kg	Quilograma
MBC	Metil benzilideno cânfora
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
OC	Octocrileno
OD-PABA	Dimetilamino benzoato
4OHBZF	4 hidroxi benzofenona
PBS	Tampão fosfato salinizado
PN	Pós-natal
TPO	Tireoperoxidase

TRH	Hormônio tireotrófico
TSH	Hormônio tireoestimulante
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
µg	Micrograma
µL	Microlitro
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 - FILTROS SOLARES E OMC.....	16
1.2 - HORMÔNIOS TIREOIDEANOS.....	20
2 - OBJETIVO GERAL	29
2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 - METODOLOGIA	30
3.1 - ANIMAIS.....	30
3.2 - PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	30
3.3 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	31
3.4 - AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO.....	32
3.4.1 - Abertura de Olhos.....	32
3.4.2 - Ganho de Peso.....	33
3.5 - DOSAGEM DE T4 TOTAL.....	33
3.6 - COLETA E PROCESSAMENTO DE TECIDOS.....	34
3.6.1 - Preparo do Timo e Baço.....	34
3.7 - TESTES COMPORTAMENTAIS.....	34
3.7.1 - Avaliação do estado de ansiedade.....	34
3.7.2 - Avaliação da atividade locomotora.....	35
3.7.3 - Avaliação de memória e aprendizagem.....	36
3.8 - APRESENTAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 - RESULTADOS	42
4.1 - PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA.....	42
4.2 - AVALIAÇÃO DO NEURODESENVOLVIMENTO.....	43
4.3 - GANHO DE PESO NO PERÍODO LACTACIONAL.....	44

4.4 - GANHO DE PESO NO PÓS-DESMAME.....	45
4.5 - DOSAGEM SÉRICA DE T4 TOTAL.....	46
4.6 - AVALIAÇÃO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES.....	47
4.7 - AVALIAÇÃO DE ANSIEDADE.....	49
4.8 - ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	50
4.9 - MEMÓRIA E APRENDIZADO.....	51
5 - DISCUSSÃO.....	52
6 - CONCLUSÃO.....	65
7 - PERSPECTIVAS.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 - INTRODUÇÃO

1.1 FILTROS SOLARES E OMC

A radiação ultravioleta pode desencadear vários efeitos nocivos, dentre eles danos no DNA, envelhecimento precoce, catarata, alterações químicas e histológicas na pele, imunossupressão, melanoma, dentre outras malignidades (BALOGH et al., 2011). Em função desses potenciais danos, existe a necessidade de proteger a saúde da população dos raios ultravioletas (UV) utilizando-se de produtos e cosméticos que atuem como filtros contra essa radiação. Talvez por conta desses efeitos nocivos que a utilização de protetores solares com filtros UV tem aumentado substancialmente no mundo inteiro (KRAUSE et al., 2012).

Os filtros UV são altamente lipofílicos e podem ser classificados em físicos ou inorgânicos e em químicos ou orgânicos. O primeiro tem como principais representantes o dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO), que, por serem opacos aos raios UV, agem refletindo a radiação em sua maior parte. O segundo tem como representantes as benzofenonas, os derivados dos benzilidenos cânfora, os cinamatos, salicilatos, benzimidazóis e para-aminobenzóicos que agem absorvendo a radiação UV de alta energia, nociva aos seres humanos, transformando-as em radiação de baixa energia, minimizando os potenciais danos induzidos por essa radiação (CABRAL et al., 2011). Contudo, esses filtros solares químicos têm sido apontados através de evidências experimentais *in vivo* e *in vitro* por desencadear efeitos tóxicos em estudos com roedores. Dentre eles é possível citar benzofenona 2 (BZF2), benzofenona 3 (BZF3), metilbenzilideno cânfora (MBC) e octil metoxi cinamato (OMC) (SCHMUTZLER et al., 2004a; SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2006; KLAMMER et al., 2007).

Dentre os vários produtos presentes no mercado nacional, diversos cosméticos possuem uma ou mais das 4 substâncias anteriormente mencionadas em sua composição, sendo eles protetores solares, xampus, *sprays* para cabelo, tonalizantes, batons, protetores labiais, sabonetes líquidos entre outros. Além de artigos de cuidado pessoal, os filtros solares também podem ser encontrados em aditivos plásticos, tapetes, roupas e sabão em pó, o que reflete o grau de exposição

da população a estes compostos. É importante mencionar também que os filtros UV são declarados apenas em cosméticos, mas não em outras classes de produtos tais como aqueles que foram mencionados anteriormente (SCHLUMPF et al., 2004a).

Devido à ampla gama de filtros solares presentes em produtos de consumo humano, diversos pesquisadores ao redor do mundo têm dispensado especial atenção ao estudo da contaminação ambiental e exposição humana a estas substâncias.

Estudos recentes têm demonstrado a presença de filtros UV em diversos ecossistemas aquáticos na Suíça (FENT et al., 2010a). Alguns trabalhos apontam para a presença destas substâncias em água de torneira, águas residuais e lodo de esgoto tratado (DÍAZ-CRUZ et al., 2012; GAGO-FERRERO et al., 2011). A presença de MBC e octocrileno, outros filtros solares muito usados, foi também observada em ambientes aquáticos por Buser e colaboradores (2006), que demonstraram que estes compostos estavam presentes no tecido muscular de peixes da espécie *Salmo trutta* em sete pequenos rios da Suíça em concentrações de até 1800 ng/g de MBC e 2400 ng/g de octocrileno. Um outro estudo semelhante, realizado por Fent e colaboradores (2010b), mostrou a presença de OMC em concentrações de até 337 µg/kg de lipídio em macro invertebrados como o mosquito *Chironomus riparius*, diversas espécies de peixes e quase o dobro em aves mergulhadoras da espécie *Phalacrocorax brasilianus*.

Essa ampla presença de filtros solares no ambiente como um todo despertou interesse da comunidade científica em investigar o potencial grau de exposição das populações humanas a estas substâncias. Benzofenona 3, por exemplo, foi encontrada em vários fluidos corporais humanos, tais como urina, sangue, leite materno e sêmen (CALAFAT et al., 2008; YE et al., 2008a; YE et al., 2008b; LÉON et al., 2010). Além disso, um dos filtros UV mais utilizados em produtos para uso humano, o OMC, foi encontrado em amostras de urina e sangue após ser absorvido pela pele (JANJUA et al., 2004), bem como em amostras de leite materno de mulheres que fizeram o uso de produtos que o continham em sua composição (SCHLUMPF et al., 2008b). Diversos outros relatos de contaminação ambiental e

humana com filtros UV podem ser encontrados na literatura (quadro 1), o que indica que os seres humanos estão sistemicamente expostos a estes compostos.

Quadro 1. Classes de filtros solares e os respectivos locais onde são encontrados.

FILTRO SOLAR	SÍTIO ENCONTRADO	REFERÊNCIA
ASFB	Água de tratamento de plantas na Espanha	(RICHARDSON et al., 2009)
BZF3, 4MBC, OMC , OD-PABA, OC	Água de torneira na Espanha	(DÍAZ-CRUZ et al., 2012)
BZF3, 4MBC, OMC , OC, EHDPABA, 4OHBZF, 2,4DIOHBZF e 4,4DOHBZF	Água residual e lodo de esgoto tratado na Espanha	(GAGO-FERRERO et al., 2011)
OC e MBC	Lagos na Alemanha	(CAROU et al., 2009)
BZF3, 4MBC, OMC , OD-PABA, OC	Ecossistema aquático na Suíça.	(FENT et al., 2010a)
OC e MBC	Tecido muscular de peixes <i>Salmo trutta</i> em rios da Suíça	(BUSER et al., 2006)
OMC	Peixes e aves mergulhadoras na Suíça	(FENT et al., 2010b)
OMC	Leite materno	(SCHLUMPF et al., 2008b)
BZF3	Leite materno	(YE et al., 2008b)
OC	Golfinhos no Brasil	(GAGO-FERRERO et al., 2013)
OC e OMC	Solo na Nigéria	(ARUKWE et al., 2012)
OMC	Urina e sangue humanos	(JANJUA et al., 2004)
BZF3	Urina humana	(CALAFAT et al., 2008) (MEEKER et al., 2013)
BZF3	Sangue humano	(YE et al., 2008a)
BZF3	Sêmen humano	(LEÓN et al., 2010)
BS, FS, HMS, 3,4MBC, 3MBC	Placenta humana	(JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2013)

ASFB é ácido sulfônico fenilbenzimidazol; BS é benzilsalicilato; BZF3 é benzofenona 3; 2,4DOHBZF é 2,4dihidroxi benzofenona; 4,4DOHBZF é 4,4dihidroxi benzofenona; OD-PABA é dimetilamino benzoato; EHDPABA é etilhexildimetil aminobenzoato; FS é fenilsalicilato; 4OHBZF é 4 hidroxi benzofenona; HMS é homosalato; 3MBC é 3metilbenzilideno cânfora; 3,4MBC é 3,4metilbenzilideno cânfora, 4MBC é 4metilbenzilideno cânfora; OMC é octil metoxi cinamato e OC é octocrileno.

A presença desses filtros UV em fluidos biológicos, principalmente no sangue, gera grande preocupação devido aos potenciais riscos associados à contaminação humana com esses compostos. Dentre os efeitos nocivos mais relatados, a capacidade estrogênica da BZF 3 foi demonstrada através de estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, bem como atividade antiandrogênica *in vitro*, evidenciando assim a ação dessa substância sobre o eixo reprodutivo (FENT et al., 2008c; SCHLUMPF et al., 2001c; SCHREURS et al., 2005). Além destes efeitos largamente descritos na literatura por diversos grupos de pesquisa, um recente trabalho tem associado a exposição à BZF 3 à endometriose que pode estar correlacionada as alterações que tal substância desencadeia no eixo reprodutivo (KUNISUE et al., 2012).

Em relação ao OMC, alguns estudos *in vitro* demonstraram que este pode exercer atividade estrogênica, uma vez que sua administração foi capaz de induzir aumento na proliferação de células cancerosas mamárias (SCHLUMPF et al., 2001). Já *in vivo*, em diversos estudos com ratos, a exposição ao OMC tem levado a um aumento do peso uterino, sendo que um trabalho constatou esse aumento em ratas imaturas após 4 dias de exposição a 1035 mg/kg/dia de OMC (SCHLUMPF et al., 2001).

Um estudo demonstrou que MBC, quando administrado oralmente em ratas adultas da cepa Sprague Dawley por 14 dias, foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de tiroxina (T4) e aumentar os níveis de TSH, levando a um quadro de hipotireoidismo, quando comparado ao grupo controle (SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2006). Em 2004, foi publicado um trabalho que investigou outros desfechos específicos, no qual ratos machos e fêmeas foram expostos ao MBC por pelo menos 10 semanas antes de serem submetidos ao acasalamento, sendo que as fêmeas continuaram sendo expostas no período gestacional e lactacional e a prole até a juventude. A substância foi administrada por via oral através da ração. As concentrações de MBC eram de 0,7; 7; 24 e 47 mg/kg/dia de peso corporal dos animais. Neste experimento, foram observadas alterações significativas no peso relativo do timo, tanto de machos quanto de fêmeas, que encontrava-se diminuído em animais que receberam as maiores doses. Além disso, houve diminuição no peso dos testículos, atraso na separação prepucial, peso da próstata ventral

diminuído, aumento na tireóide de machos e fêmeas, aumento no peso do útero e ovário, bem como redução no peso da próstata em adultos da geração F1 que receberam as duas maiores doses, ou seja, primeira geração filial, revelando que a ação do MBC teve impacto em vários sistemas. Os efeitos sobre a tireóide e o timo indicam que o MBC exerce um importante efeito sobre o eixo tireoideano assim como em órgãos linfoides, efeitos estes que podem estar correlacionados. Contudo, a ação de filtros UV sobre estes sistemas ainda é pouco explorada na literatura, mas tais efeitos demonstram como o filtro solar em questão impacta em parâmetros relacionados ao desenvolvimento (SCHLUMPF et al., 2004a).

1.2 – HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

Dos efeitos tóxicos desencadeados pelos filtros solares, a desregulação da tireóide merece atenção especial, já que em humanos adultos o comprometimento da função tireoidiana leva a distúrbios neurológicos reversíveis após o tratamento apropriado; enquanto que os danos causados durante períodos críticos do desenvolvimento fetal e perinatal podem ser irreversíveis, variando desde efeitos sutis, como problemas de comportamento, até retardo mental. Tais manifestações são motivos de preocupação para cientistas no mundo inteiro quando se trata da ação dos filtros UV sobre o eixo Hipotálamo-Pituitária-Tireóide (HPT) (PORTERFIELD, 1994a). Em humanos, o cretinismo endêmico, retardo mental devido ao hipotireoidismo congênito, é a manifestação mais conhecida decorrente do desequilíbrio deste sistema em períodos críticos do desenvolvimento (ZOELLER et al., 2000). Indivíduos com hipotireoidismo congênito apresentam problemas com linguagem, alterações neuromotoras, e danos cognitivos (ROVET et al., 2000a), além disso, apresentam déficit de atenção, hiperatividade, problemas com fala e interpretação de palavras ditas, deficiências na coordenação motora fina e déficit na percepção espacial (ROVET et al., 1992b). Já em animais, a indução do hipotireoidismo congênito acarreta diminuição axonal e da arborização dendrítica no córtex cerebral, redução em nervos terminais, atraso em mielinização, anormalidades no desenvolvimento coclear e danos na formação dos ossículos do ouvido médio (PORTERFIELD et al., 1993b). Os hormônios tireoideanos (HTs) têm papel chave no desenvolvimento cerebral uma vez que orquestram o momento do

início e término de eventos específicos do neurodesenvolvimento. E mesmo flutuações temporárias podem prejudicar esse controle adequado dirigido pelos HTs conduzindo a prejuízos no desenvolvimento cerebral (PORTERFIELD et al., 2000c).

No entanto, estudos divergentes na literatura apontam para melhor desempenho de roedores com hipertiroxinemia para cumprir tarefas em testes cognitivos, uma vez que estes animais cometiam menos erros e gastavam menos tempo na execução dos testes. Neste trabalho, Schwegler e colaboradores (1991) mostraram que a hipertiroxinemia pode aumentar o tamanho da fibra musgosa (fm), um grupo de axônios terminais que surgem de células granulares do giro denteado situado na região hipocampal do encéfalo (FROTSCHER et al., 2006) e que este aumento está diretamente associado a vantagem que os animais possuíam na execução do teste do labirinto radial, usado para avaliar memória e aprendizagem (SCHWEGLER et al., 1991). Segundo Madeira e Paula-Barbosa (1993) o desequilíbrio dos hormônios tireoideanos gera quebra da homeostasia que, quando persistente, desencadeia diminuição da proliferação das células granulares, atrofia dos dendritos apicais em neurônios piramidais na região CA3 do hipocampo, em outras palavras, altera a morfologia da fm, além de gerar déficits cognitivos na aprendizagem espacial e na memória que explicariam esses resultados nos testes comportamentais.

Discordante destes resultados, um estudo evidenciou que animais com hipertiroxinemia cometiam mais erros no teste do campo fechado, teste utilizado para avaliar alterações cognitivas. Neste trabalho, os animais receberam T3 por via subcutânea e foram submetidos a testes cognitivos que demonstraram que estes animais cometeram mais erros nos testes, além de exibirem abertura precoce dos olhos e diminuição do peso do cérebro em relação ao controle. Estes efeitos demonstram os impactos das alterações dos HTs em parâmetros cognitivos além de alterações neurodesenvolvimentais. (EAYRS, 1963).

Os HTs são responsáveis pela coordenação de diversos eventos fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso, tais como, aumento da proliferação neuronal no cerebelo, determinação do fim da proliferação neuronal e estímulo à diferenciação (LAUDER et al., 1977), formação e desenvolvimento de

sinapses, mielinização (NUNEZ et al., 1984), além de contribuir de forma importante para eventos de migração de neurônios do seu local de origem até os destinos finais (HAMBURGH et al., 1971)(Figura 1). Os estágios do neurodesenvolvimento sensíveis aos hormônios tireoideanos, podem ser divididos em três. O primeiro ocorre antes do início da síntese do hormônio tireoideano fetal, aproximadamente entre 16^a e 20^a semana. Durante este período o suprimento hormonal materno é fundamental e influencia a proliferação e migração dos neurônios no córtex cerebral, hipocampo e iminência ganglionar média. O segundo estágio se dá durante o início da função da

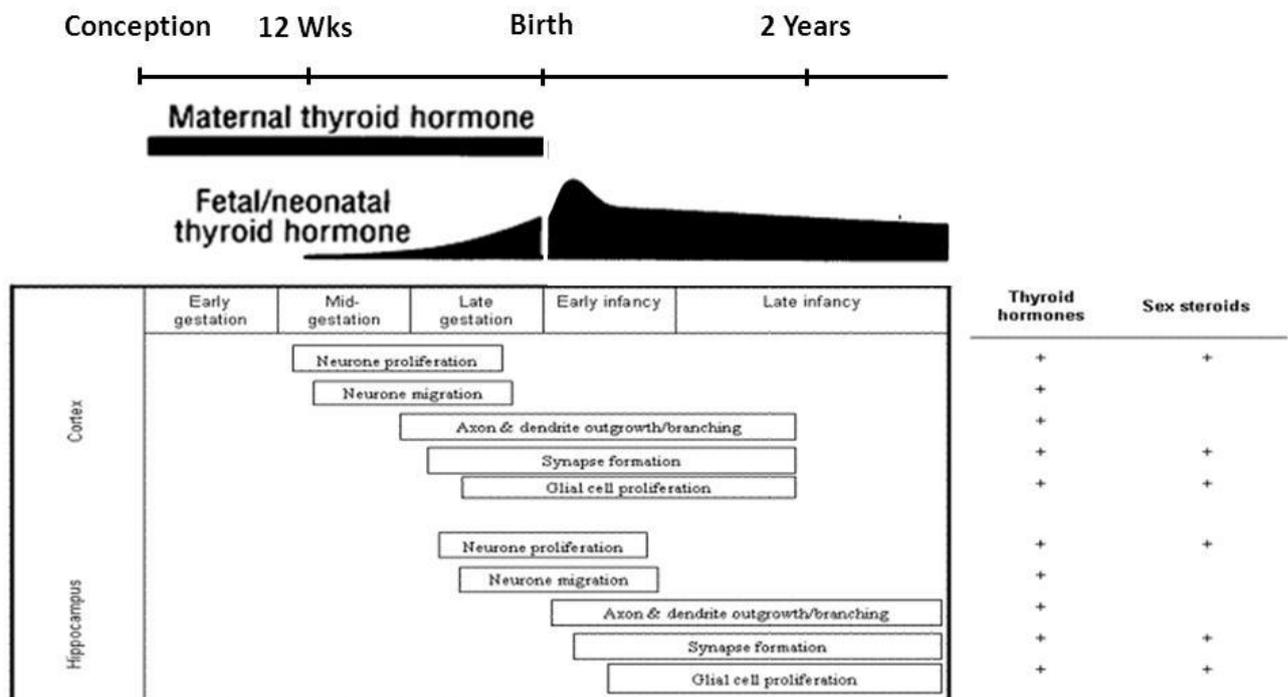


Figura 1. Funcionamento da tireóide materno e fetal e eventos cerebrais dependentes dos hormônios tireoideanos e sexuais desde a concepção do embrião humano até o segundo ano de vida. (Adaptado de PORTERFIELD et al., 1994; WILLIANS et al., 2008)

glândula tireóide fetal e neste momento o neurodesenvolvimento é mediado por hormônios fetais e maternos. Durante este período, os processos neurológicos dependentes de hormônios tireoideanos incluem a neurogênese, migração neuronal, crescimento axonal, ramificação dendrítica e sinaptogênese, juntamente com o início da diferenciação de células gliais e sua migração até o aparecimento de mielinização. O terceiro estágio se inicia no período pós-natal, quando o suprimento hormonal para o cérebro é crítico para continuação da maturação e a glândula do feto já é funcionante (WILLIANS, 2008).

A tireóide, a pituitária e o hipotálamo começam seu desenvolvimento no início da gestação enquanto a síntese dos hormônios tireoideanos se inicia por volta de 10-12 semanas de gestação sendo que os níveis séricos destes hormônios aumentam progressivamente durante todo o restante do período gestacional. Com isso, o eixo HPT começa a ser funcional a partir da segunda metade da gestação (FUSE et al., 1996; PORTERFIELD et al., 1993b; KLEIN et al., 1982) (Figura 1).

Além da formação da glândula tireóide e o início do seu funcionamento é importante entender como os hormônios tireoideanos são produzidos e secretados para buscar compreender como o OMC interfere com os mesmos. Primeiramente é preciso conhecer o eixo tireoideano que é basicamente composto pelo hipotálamo, pituitária e tireóide. Eles compõem essencialmente uma cascata de sinalização que pode ser entendida da seguinte forma: O hipotálamo produz e secreta um hormônio conhecido como hormônio de liberação da tireotropina (TRH), este por sua vez age na hipófise que produz o hormônio tireoestimulante (TSH) que é produzido e liberado agindo sobre a glândula tireóide que por fim acaba por fabricar e secretar os hormônios tireoideanos triiodotironina e tiroxina (T3 e T4). Quando por algum motivo existem concentrações adicionais de hormônios tireoideanos, estes através de um mecanismo de retroalimentação negativa sinalizam para a pituitária interromper a secreção de TSH. Além da pituitária os hormônios tireoideanos sinalizam para o hipotálamo inibir a síntese e secreção de TRH bem como evidentemente inibir a transcrição do gene do TRH que acaba por suprimir a secreção de TSH. Além disso, ocorre uma diminuição da expressão de receptores de TRH na hipófise que culmina com a diminuição de produção dos hormônios tireoideanos. (GOODMAN & GILMAN, 2006). O princípio de funcionamento do eixo tireoideano pode ser melhor entendido através da figura 2.

Contudo, a biossíntese e liberação dos hormônios tireoideanos é ainda mais complexa do que a simples descrição da cascata de sinalização do eixo HPT. Primeiramente nos tireócitos, células da tireóide, existe a captação do íon iodeto na região do líquido extra celular. Esta captação ocorre através de uma proteína expressa na membrana conhecida como simportador de sódio-iodo. O iodeto então

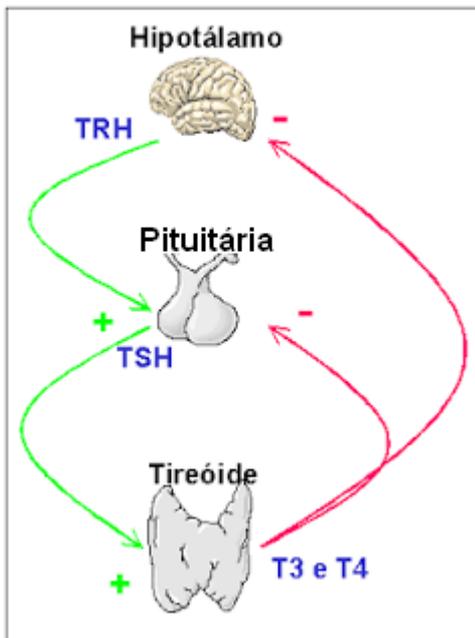


Figura 2. Eixo tireoideano
Fonte: anatomiaendocrino.com

é levado ativamente para o interior da célula e carregado na mesma da membrana basal até sair da célula pela membrana apical. Em seguida o iodeto na luz da célula é oxidado a iodo por uma enzima chamada tireoperoxidase. O iodeto oxidado se torna iodo, precursor para a confecção dos hormônios tireoideanos. Este iodo é incorporado aos resíduos de diiodotirosil e monoiodotirosil que se encontram numa glicoproteína chamada tireoglobulina. Por conseguinte a tireoperoxidase catalisa a etapa de fusão das subunidades formadas dando origem a tiroxina. Esta juntamente com as outras subunidades migram pela membrana apical do tirócito onde podem ser desiodadas. O T4 através de uma enzima conhecida como Desiodinase do tipo I é convertido a triiodotironina que é liberado no líquido extracelular. O T4 que não é degradado a T3 é liberado diretamente por meio de hidrólise. (GOODMAN & GILMAN, 2006). A figura 3 ilustra as etapas metabólicas dos hormônios tireoideanos.

Portanto conhecendo-se a ação bem como as etapas de biossíntese dos HT's e levando-se em consideração esse amplo controle que os mesmos exercem em vários sistemas e seu papel fundamental para o desenvolvimento cerebral como um todo, o estudo de substâncias que desequilibram a homeostasia desses hormônios é de grande relevância uma vez que eles orquestram importantes eventos para o desenvolvimento de diversos sistemas.

Fonte: studyblue.comthyroid-gland

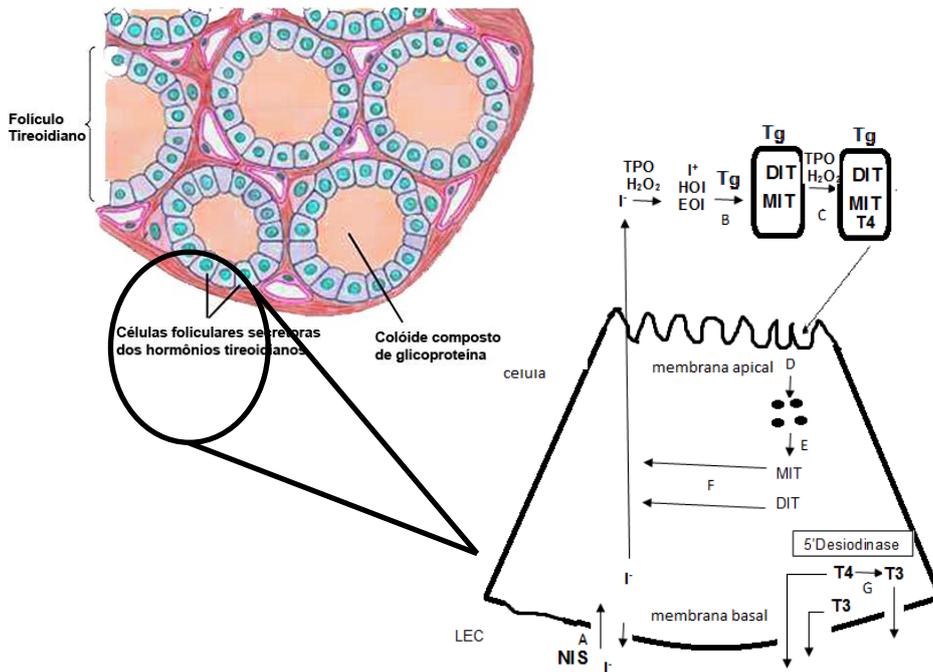
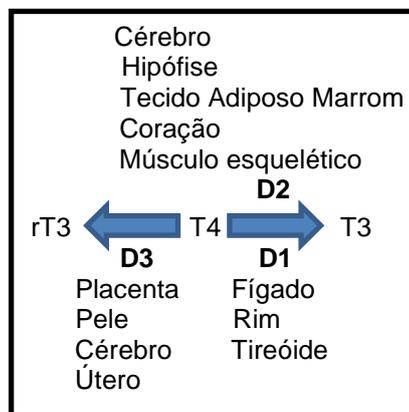


Figura 3 - Principais vias de biossíntese e liberação dos hormônios tireoidianos. Nota: Tg, tireoglobulina; DIT, diiodotirosina; MIT, monoiodotirosina; TPO, tireoperoxidase; HOI, ácido hipoiódico; EOI, espécie ligada à enzima. Adaptado de Goodman

Etapa Metabólica

- A Transporte do iodeto
- B Iodação
- C Acoplamento
- D Reabsorção do colóide
- E Proteólise
- F Desiodação da DIT + MIT
- G Desiodação da T4



- D1 – Desiodinase do tipo I;
- D2 – Desiodinase do tipo II;
- D3 – Desiodinase do tipo III.

Apesar de diversos trabalhos na literatura descreverem fenômenos ligados a desregulação tireoidiana provocados por filtros UV, ainda são poucos os dados referentes ao mecanismo de ação destas substâncias, no entanto mesmo diante da escassez de dados, existem alguns alvos que já foram hipotetizados. A figura 4 apresenta potenciais alvos para a ação de diferentes substâncias sobre o eixo tireoideano, incluindo filtros solares, retardantes de chamas, pesticidas, plastificantes, agrotóxicos dentre outros.

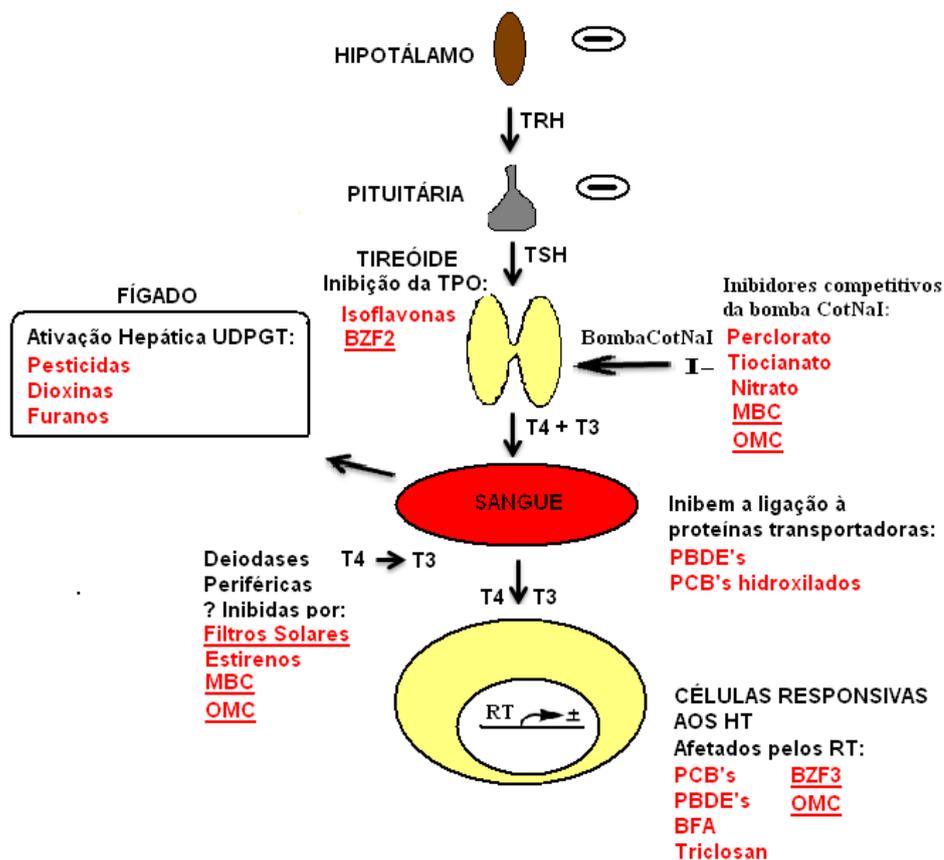


Figura 4 – Mecanismo de ação de desreguladores endócrinos - TRH é o hormônio liberador de tireotropina. TSH é o hormônio tireoestimulante. T4 é tiroxina. T3 é triiodotironina. I⁻ é o íon iodeto. UDPGT é uridina difosfato glicoroniltransferase. RT é o receptor do hormônio tireoideano. HT é o hormônio tireoideano. CotNaI é a bomba cotransportadora de sódio e iodeto e TPO é a tireoperoxidase (adaptado de PEARCE et al., 2009).

Schmutzler e seus colaboradores, em 2007, hipotetizaram que Benzofenona 2 age inibindo a atividade da tireoperoxidase, enquanto Benzofenona 3 possui capacidade de agir como um agonista nos receptores dos hormônios tireoideanos,

responsáveis pelo reconhecimento desses hormônios em seu sítio de ligação (SCHMUTZLER, 2007b). O mesmo grupo ainda propôs que o Metilbenzilideno cânfora age primeiramente inibindo a bomba de cotransporte de sódio e iodeto, levando a parada da produção hormonal uma vez que uma das matérias primas necessárias para isso (iodeto) não está sendo recaptada, enquanto Klammer e seus colaboradores propuseram que além deste mecanismo, esta substância poderia atuar reduzindo a atividade da enzima hepática Deiodase I, incumbida na metabolização dos hormônios tireoideanos (KLAMMER, 2007; SCHMUTZLER, 2007b). Por fim, a literatura aponta o OMC como envolvido em múltiplos alvos, o que torna seu mecanismo de ação mais complexo. Assim como o MBC, o OMC inibe a recaptção de iodeto pela bomba de cotransporte de sódio, bem como diminui a atividade da deiodase do tipo I (KLAMMER, 2007; SCHMUTZLER, 2007b), além de atuar como um agonista dos receptores dos hormônios tireoideanos. Ou seja, os diversos alvos de ação do OMC reafirmam a necessidade de mais estudos deste composto (SCHMUTZLER, 2007b).

A grande questão é que o estudo da exposição aos filtros solares durante o período lactacional não é explorada na literatura e os modelos animais utilizados comumente utilizam ratas ovariectomizadas bilateralmente e com isso não representam uma parcela muito significativa da população, pois além de se focarem num só gênero, levam em consideração apenas indivíduos que sofreram intervenção cirúrgica na tentativa de mimetizar o período da menopausa. Portanto, devido a escassez de dados nesta janela do neurodesenvolvimento, é preciso fomentar mais estudos que foquem nessa análise temporal, fornecendo assim mais informações que venham a responder questões importantes no que diz respeito a avaliação de risco bem como preencher várias outras lacunas do conhecimento.

Por isso, com base nos diversos efeitos causados pelos filtros UV pautados em evidências científicas já descritas anteriormente, torna-se necessário rever a relação risco benefício do uso destes cosméticos comercializados no mundo. O Comitê Científico de Produtos Cosméticos e Produtos Não-Alimentares (SCCNFP), uma autoridade regulatória da União Europeia lançou uma declaração de

preocupação a respeito do uso de OMC em produtos cosméticos devido ao seu potencial risco a saúde humana (GELBKE et al., 2004).

É fato que os filtros UV presentes nos cosméticos, em especial o OMC tem contribuído muito para minimizar os efeitos nocivos das radiações ultravioletas como o câncer de pele, em particular melanomas malignos (WANG et al., 2001). No entanto, estes compostos têm sido descritos como moduladores negativos dos níveis de tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e hormônio tireoestimulante (TSH) (KLAMMER et al., 2007).

Agregado a isso, a problemática reside no fato de que crianças representam um dos grupos de risco, uma vez que são expostas a estes compostos diretamente pelo uso tópico do produto, pela possível ingestão acidental do mesmo ou pelo simples fato de levarem constantemente a mão até a boca e também através da amamentação, haja visto a presença dessas substâncias no leite materno de mulheres que utilizaram filtros solares como o OMC (SCHLUMPF et al., 2008) bem como água e alimentos contaminados com estes filtros UV (DÍAZ-CRUZ et al., 2012; BUSER et al., 2006). Além do mais, os infantes representam um grupo extremamente vulnerável uma vez que processos cerebrais importantes ocorrem nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Portanto, devido aos possíveis danos à saúde humana, é de suma importância elucidar os efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao OMC, uma vez que este filtro UV está presente na composição de muitos produtos consumidos pela população. Uma vez estabelecidos os riscos à que a população está exposta e desvendando-se o fator ou os fatores causais responsáveis pela toxicidade desta substância, será possível, no âmbito da saúde pública, estabelecer medidas de intervenção quanto ao uso de cosméticos contendo este composto bem como requerer um esforço organizado por parte da sociedade para promoção, proteção e restauração da saúde da população afetada.

Contudo, antes é necessário conhecer melhor os mecanismos envolvidos na toxicidade do OMC e investigar se os efeitos exercidos por esta substância sobre os hormônios tireoidianos podem ocorrer também em etapas críticas do desenvolvimento, como o período lactacional e se estas potenciais alterações hormonais de fato impactam sobre o neurodesenvolvimento.

2 - OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição ao octil metoxi cinamato no período lactacional é capaz de induzir desregulação tireoideana e alterações neurocomportamentais na vida adulta

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se OMC administrado em ratos no período lactacional induz alterações nos níveis de T4 total;
- Avaliar a interferência da exposição ao OMC durante o período lactacional sobre o peso corporal dos ratos;
- Avaliar alterações no neurodesenvolvimento induzidas pelo OMC durante o período lactacional através do paradigma da abertura de olhos;
- Avaliar os efeitos da administração de OMC em ratos durante o período lactacional sobre os órgãos timo e baço do sistema imune.
- Investigar potenciais comportamentos relacionados à ansiedade, alterações de atividade locomotora e cognitivas em ratos que foram expostos ao OMC durante a lactação.

3 - METODOLOGIA

3.1 - ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar recém-nascidos, de ambos os sexos, provenientes de fêmeas pesando entre 150 e 300 g, no dia gestacional 15, fornecidas pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL). Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em condições controladas de temperatura (22°C +/-1), umidade (55%) e ciclo alternado claro/escuro de 12 horas. No dia pós-natal 1 (PN1) os filhotes foram sexados e divididos nos grupos experimentais. As ninhadas foram mantidas com suas respectivas mães acondicionadas em caixas individuais.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) e licenciado pelo número 16/14-2.

A prole foi dividida aleatoriamente intraninhada entre os quatro grupos experimentais destinando um casal para cada grupo. Logo cada ninhada foi composta por 8 animais.

Os grupos experimentais foram:

Grupo 1- Veículo (óleo de milho) – 5ml/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo;

Grupo 2 - OMC (500 mg/kg/dia) - 5ml/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo;

Grupo 3 - OMC (1000 mg/kg/dia) - 5ml/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo;

Grupo 4 - OMC (1500 mg/kg/dia) - 5ml/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo.

Essas foram as doses utilizadas no estudo piloto. Neste estudo foi observado que a dose de 500 mg/kg/dia não era capaz de desencadear sinais clínicos claros de toxicidade como perda de peso, prostração, hipoatividade, além de letalidade e etc.

3.2 - PREPARO DAS SOLUÇÕES.

O octil metoxi cinamato (OMC), de nomenclatura 2-etilhexil-4-metoxicinamato segundo a IUPAC, CAS: 5466773 com 98% de pureza (Sigma Aldrich) foi preparado na dose de 500 mg/kg/dia , 1000 mg/kg/dia e 1500 mg/kg/dia de peso corpóreo do animal utilizando óleo de milho como veículo. O OMC foi homogeneizado em vortex

durante aproximadamente 5 minutos. A solução foi preparada de modo a utilizar um volume de administração de 5ml/kg/dia de peso corpóreo do animal.

O óleo de milho foi incorporado como veículo na solução do grupo OMC. Além disso foi o controle negativo do experimento e seu volume de administração foi de 5ml/kg/dia de peso corpóreo do animal.

3.3 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram expostos às substâncias durante o período lactacional, do pós-natal 5 ao pós-natal 22 uma vez por dia a partir das 10 horas da manhã, por via oral com sonda gástrica apropriada (gavage).

As substâncias foram administradas diretamente nos filhotes. Os animais foram expostos por via oral (v.o.) com o auxílio de uma sonda gástrica apropriada para animais nesta idade, calibre 30 mm x 0,76 mm da boca ao estômago (Watanabe et al., 2003). A exposição foi realizada do dia 5 ao 22 pós-natal uma vez por dia a partir das 10 horas da manhã. Os animais foram pesados diariamente a fim de se ajustar o volume de administração das substâncias. Além disso, o registro de peso diário oferece um panorama da toxicidade da substância bem como o acompanhamento do desenvolvimento da prole. Como a dose de 500 mg/kg/dia não demonstrou sinais clínicos de toxicidade no estudo piloto foi definida como dose teste no estudo experimental que foi realizado. E neste estudo foram realizados os mesmos procedimentos anteriormente descritos.

A prole foi dividida aleatoriamente nos dois grupos experimentais destinando um casal por grupo experimental para cada mãe, constituindo assim uma ninhada. Portanto cada ninhada tinha 4 animais (1 casal óleo de milho e 1 casal OMC).

Os grupos experimentais foram:

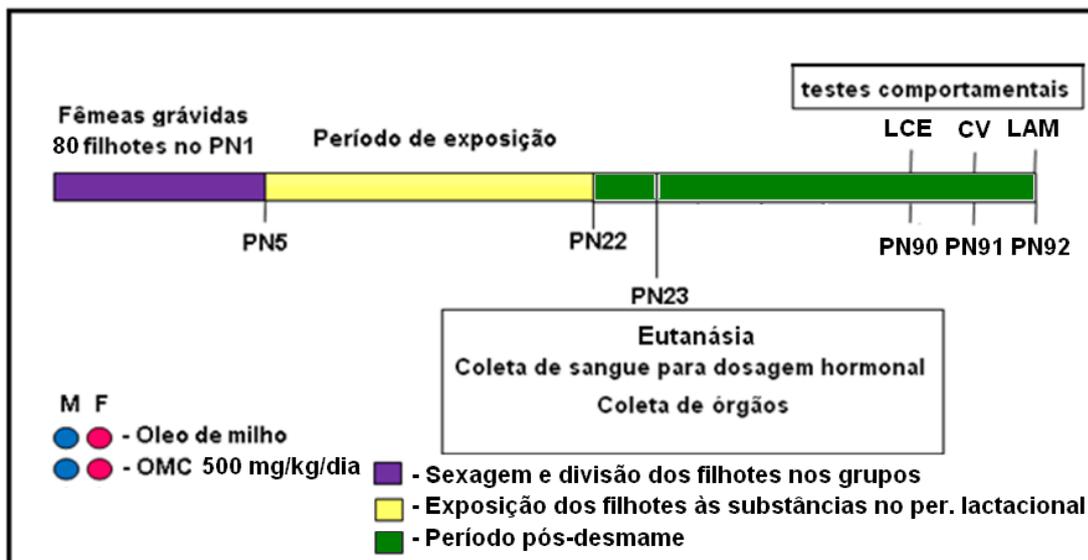
Grupo 1- Veículo (óleo de milho) – 5ml/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo;

Grupo 2 - OMC (500 mg/kg/dia) - 5ml/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo;

Um dia após o final do tratamento (PN23), metade dos filhotes foram anestesiados para coleta de sangue para dosagem hormonal de T4 total, através de uma injeção intramuscular, no músculo posterior da coxa (agulha 13 x 0,45 mm, volume 0,2 mL) de uma solução anestésica (0,2mL) contendo quetamina (60 mg/kg)

e xilazina (15 mg/kg). O plano anestésico foi verificado através da alteração do padrão respiratório e da constatação de ausência de reflexo palpebral, ausência de resposta à estimulação por pressão interdigital e do ápice caudal. Em seguida a caixa torácica do animal foi exposta e o sangue foi coletado por punção cardíaca no ventrículo esquerdo com auxílio de uma agulha 13 x 0,45mm até a exsangüinação. Além da coleta de sangue, foi realizada a remoção de timo e baço para registro de peso e contagem de células totais. Os animais que não foram eutanasiados foram acompanhados até a vida adulta para serem submetidos a testes comportamentais (labirinto em cruz elevado, campo vazado e labirinto aquático de Morris) a partir do PN90. Esses animais continuaram a ser pesados após o desmame uma vez por semana até a véspera de realizarem os testes comportamentais (PN89). A Figura 5 ilustra o desenho experimental do trabalho.

Figura 5. Desenho experimental



LCE – Labirinto em cruz elevado; CV – Campo vazado; LAM – Labirinto aquático de Morris.

3.4 - AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO

3.4.1 - Abertura de Olhos

Os animais foram observados do PN11 ao PN16 para avaliar o dia exato em que houve a abertura total de ambos os olhos. Após verificação, o dia da abertura foi registrado.

3.4.2 - Ganho de Peso

O ganho de peso foi registrado diariamente para avaliação da toxicidade da substância teste e avaliação do desenvolvimento dos animais.

3.5 - DOSAGEM DE T4 TOTAL

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

A determinação da concentração de tiroxina total (T4 total) em soro de ratos foi realizada através de kits RIA (Radio Immune Assay) de acordo com os protocolos descritos nos próprios kits. A leitura foi realizada no contador de partículas gama da marca ISOMEDIC-ICN e modelo 4/600. O radioimunoensaio consiste basicamente na ligação competitiva empregando marcação com isótopos que podem ser utilizados para a determinação de várias substâncias, dentre elas os hormônios tireoideanos. Durante o processo o anticorpo usado pode ter igual afinidade pelos padrões e pelos analitos dos soros dos roedores (amostras). Os analitos não marcados competem com os marcados por um número limitado de sítios que se ligam ao anticorpo reduzindo assim a quantidade de analito marcado que se liga ao anticorpo. O nível de radioatividade ligada é inversamente proporcional à concentração de analito presente nas amostras e nos padrões. Após um período adequado de incubação, as frações livres são separada das que se ligaram e a radioatividade é quantificada. O kit usado da MP Biomedicals utiliza Radioimunoensaio em fase sólida com tiroxina marcada com iodo radioativo [¹²⁵I] e usa tubos com anticorpos monoclonais de T4.

3.6 - COLETA E PROCESSAMENTO DE TECIDOS

. Baço e timo foram coletados e acondicionados em microplaca com solução de PBS a 1X em banho de gelo para posterior pesagem e processamento para contagem total de células. Estes órgãos foram removidos por inteiro. (FERRARIS et al., 2012)

3.6.1 - Preparo do Timo e Baço

Baço e timo foram individualmente colocados em papel absorvente e logo em seguida pesados em balança analítica de 6 casas decimais da Marca SHIMADZU e modelo AUY 220. Após o registro de peso, os órgãos foram triturados individualmente removendo-se o sobrenadante no final do processo. Em seguida alíquotas de 10 µL foram coletadas dos órgãos e misturadas com solução de azul de Tripan a 0,2 % na diluição 1:100. Por fim, foram coletados 10 uL dessa solução e aplicados numa câmara de Neubauer com lamínula para leitura ao microscópio óptico da marca OLYMPUS modelo PH-2 para a contagem de células totais do órgão (FERRARIS et al., 2012; DA SILVA et al., 2013).

3.7 - TESTES COMPORTAMENTAIS

3.7.1 - Avaliação do estado de ansiedade

Inventado há mais de 50 anos, foi validado na década de 80. Muito empregado na descoberta de novos fármacos ansiolíticos além de ser usado para investigar o processo de ansiedade (PINTO et al., 2012).

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



Figura 6. Labirinto em Cruz Elevado

Fonte: www.ccb.ufsc.br

No labirinto em cruz elevado (LCE), ocorre o evento de “conflito de aproximação-esquiva” do animal diante de um ambiente desconhecido aliado a tendência natural de esquiva em relação aos braços abertos, potencialmente vistos como perigosos e conflituosos (PINTO et al., 2012).

No dia pós-natal 90, ratos Wistar de ambos os sexos foram avaliados em um único dia no teste do labirinto em cruz elevado. Nele, os roedores são colocados individualmente no centro do aparelho, na interseção dos braços abertos com os fechados com o focinho voltado para um dos braços abertos. Cada animal teve 5 minutos para explorar livremente o aparelho, sendo testados nele apenas uma vez. Os parâmetros observados no teste são: *rearings* (levantamento vertical), *grooming* (autolimpeza do corpo), *stretching* (esticamento horizontal), número de pellets fecais, nº de entradas nos braços abertos, nº de entradas nos braços fechados, tempo de permanência nos braços fechados, tempo de permanência nos braços abertos e tempo de permanência no centro do aparelho. Ao final do teste o artefato era sempre higienizado com álcool 30% para remoção dos rastros de urina deixados pelos roedores previamente testados. A limpeza foi realizada de maneira bastante cuidadosa para evitar interferências de roedores anteriores naqueles que estavam sendo testados no momento (PELLOW et al., 1985).

3.7.2 - Avaliação da atividade locomotora

Introduzido na década de 70, o aparelho consiste de uma arena fechada, medindo 80 x 60 x 50 cm, com orifícios de 3 cm de diâmetro espaçados

regularmente. O aparelho fica a 10 cm do chão. O animal é exposto a este ambiente por um período de 5 minutos, podendo explorá-lo livremente. Este teste avalia essencialmente a atividade locomotora do animal. Além disso, avalia a tendência natural do roedor à neofilia que nada mais é que a busca por novidades (NOLAN et al., 1973). No dia pós-natal 91, os animais foram avaliados em um único dia no teste do campo vazado. Os animais foram colocados individualmente em um dos cantos do aparelho com o focinho voltado para a parede e tiveram 5 minutos para explorar livremente o artefato. Neste teste os parâmetros avaliados são números de *rearings* (levantamento vertical), *grooming* (autolimpeza do corpo), *stretching* (esticamento horizontal), número de pellets fecais, número de vezes em que o animal coloca o focinho nos orifícios situados no centro e nas bordas e número de quadrantes percorridos. No final do teste, o artefato foi higienizado com álcool 30% para remoção dos rastros de urina deixado pelos roedores previamente testados. A limpeza foi realizada de maneira bastante cuidadosa para evitar interferências de roedores anteriores naqueles que estavam sendo testados no momento (BOSSIER & SIMON, 1962).



Figura 7. Campo Vazado

Fonte: access.stoeltingeo.com

3.7.3 - Avaliação de Memória e aprendizagem

Introduzido por Richard Morris (1984) para avaliar memória e aprendizado, o labirinto aquático de Morris é uma arena aberta aquática onde roedores guiados por pistas (referências visuais), buscam encontrar uma plataforma de escape que se encontra submersa na água.

A arena possui 210 cm de diâmetro, lateral com 51 cm de altura e superfície interior de preferência não reflexiva. A plataforma situada no interior da arena

apresenta de 10 - 12 cm de diâmetro e é submersa 1- 2 cm abaixo da superfície da água durante a etapa de aquisição de memória.

A temperatura da água estava dentro da faixa preconizada para a realização do teste (19 a 22°C).



Figura 8. Labirinto Aquático de Morris

Fonte: scac-irib.univ-rouen.fr

A sala de teste apresentava diversas referências visuais, tanto as endógenas (portas, estantes, pia, avaliador), como aquelas que foram colocadas intencionalmente em torno do artefato como figuras geométricas (triângulo, retângulo, etc). As referências permaneceram no mesmo lugar durante todos os dias de teste para que nenhum fator de confusão fosse gerado no animal.

O avaliador permaneceu dentro da sala de teste, mas numa posição fixa durante todos os dias de avaliação.

Etapa1 - Aquisição de memória:

Nesta etapa os animais foram testados a partir do PN92 durante 4 dias para aquisição de memória. Nesses quatro dias a plataforma de escape se situa sempre no quadrante sudeste (figura 9) no interior da piscina submersa a 1 cm da superfície da água.

Foi jogado previamente guache não-tóxico de cor branca na água a fim de camuflar a plataforma para que o animal não pudesse enxergá-la.

Cada animal foi testado individualmente, realizando 4 sessões consecutivas. Cada sessão representa um ponto de partida diferente do animal (tabela 1). Esses

pontos de partida são permutados durante todos os dias do teste. Cada roedor teve 1 minuto por sessão para encontrar a plataforma de escape. Ao encontrar a plataforma, o tempo no cronômetro era parado, registrado e a partir daí o animal só era removido da mesma após 15 segundos. Em seguida, o rato era secado com toalha limpa e colocado numa caixa com lâmpada incandescente para auxiliar na secagem. O animal era deixado na caixa por 1 minuto e após esse intervalo era levado novamente para execução da sessão seguinte. O roedor em cada sessão é sempre colocado com o focinho voltado para a borda da piscina e no término das 4 sessões, os pellets fecais deixados por ele são recolhidos para o ensaio do animal seguinte. Quando o animal não encontra a plataforma no intervalo de 60 segundos, este é guiado pelo avaliador até a mesma e fica nela por um tempo de permanência de 15 segundos. Se mesmo guiado pelo avaliador, o animal se recusar a chegar até a plataforma, ele é forçado a ficar nela (MORRIS, 1984).

Tabela 1. Pontos de partida (seções) durante as duas etapas do teste.

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

Etapa 2 – Teste:

Esta etapa é realizada em apenas 1 dia, representa o quinto dia de ensaio, um após o último dia da etapa de aquisição de memória. Nesta etapa a plataforma é retirada da piscina (figura 10) e o animal realiza apenas uma única sessão, ou seja, é solto a partir de 1 ponto de partida, sendo definido o lado norte para todos os animais. Nesta etapa o animal continua tendo 1 minuto para realização do teste, no entanto é avaliado o tempo em que o roedor se situa no quadrante onde estava a plataforma. Essa avaliação é feita posteriormente através da gravação do teste que foi filmado na íntegra. Na avaliação a piscina é dividida em quatro quadrantes e foi observado quanto tempo cada roedor ficou no quadrante sudeste, ou seja, quadrante onde se situava a plataforma durante os 4 dias de aquisição de memória. Após a realização do teste o animal é removido da piscina, secado com toalha limpa e colocado na caixa. Os pellets fecais deixados pelo roedor em teste são removidos para o animal subsequente ser submetido ao mesmo (MORRIS, 1984).

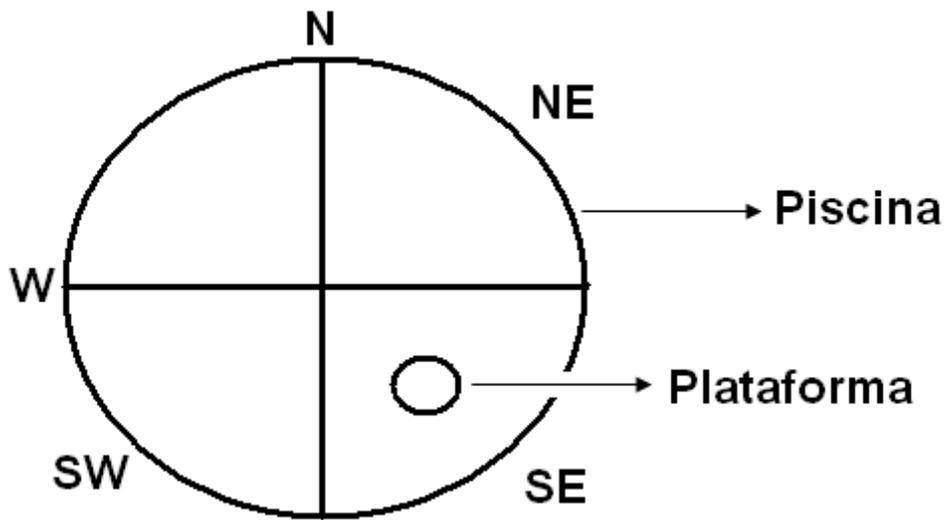


Figura 9. Desenho da piscina com plataforma e os respectivos pontos de partida dos ratos durante a primeira etapa.

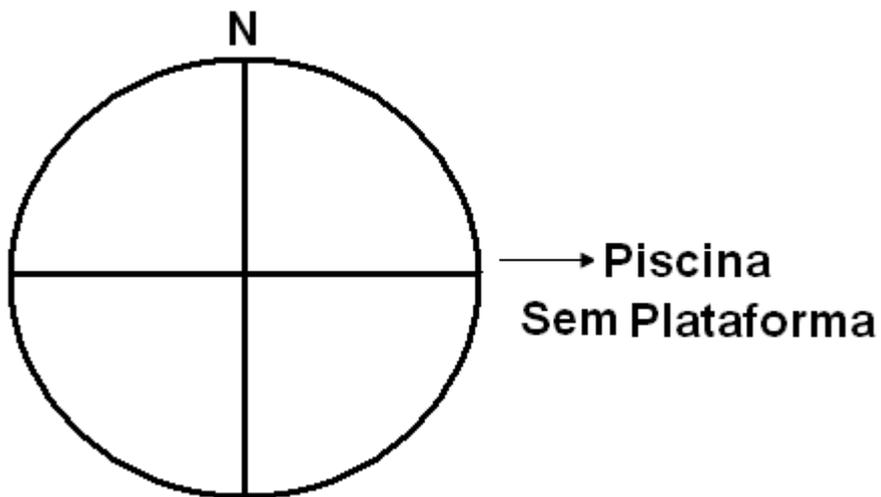


Figura 10. Desenho da piscina sem plataforma com o único ponto de partida dos ratos durante a segunda etapa.

3.8 - APRESENTAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as distribuições de dados foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnof. Para essa avaliação, um valor de p maior que 0,1 indica que os dados se distribuem normalmente. Para dados com distribuição normal, foram calculadas médias e erro padrão da média. Os grupos foram comparados pelos testes t student para amostras independentes e Mann-Whitney. Para a avaliação do ganho de peso, foi realizada ANOVA de medidas repetidas, com Sexo e Grupo como between-subjects factors. Para dados com distribuição livre, foram realizadas análises estatísticas apropriadas para cada tipo de dado. A variável abertura de olhos foi analisada por meio do teste do Qui-quadrado. Para todos os testes, valores de p menores que 0,05 foram considerados como tendo significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas por meio dos programas Graph Pad Prism3 versão 2.01 e SPSS versão 15.0 para Windows.

4 - RESULTADOS

4.1 - PERCENTUAL DE SOBREVIDA

Com o objetivo de se definir a dose do filtro solar OMC a ser administrado nos roedores, um estudo piloto foi realizado. Nele foram testadas as seguintes doses: 500, 1000 e 1500 mg/kg/dia. O volume de administração foi de 5mL/kg/dia. Neste ensaio foi observado que a dose de 1500 mg/kg/dia resultou na mortalidade de 100% dos ratos a partir do segundo dia de exposição. Já a dose de 1000 mg/kg/dia foi responsável pela morte da metade dos roedores deste grupo a partir do terceiro dia de exposição enquanto que a dose de 500 mg/kg/dia neste estudo não acarretou qualquer morte como mostra o gráfico 1. A partir desse estudo piloto a dose de 500 mg/kg/dia foi adotada como única na execução do protocolo experimental propriamente dito.

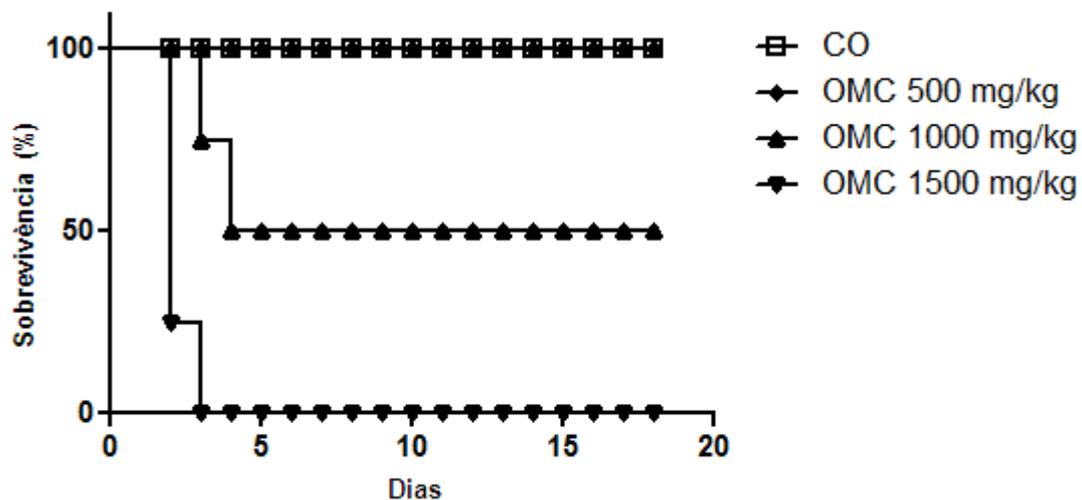


Gráfico 1. Porcentagem de sobrevivência de ratos de ambos os sexos expostos ao OMC em diferentes concentrações, 500, 1000, ou 1500 mg/kg/dia, administrado oralmente durante o período lactacional. N mínimo = 7.

4.2 - AVALIAÇÃO DO NEURODESENVOLVIMENTO

A abertura de olhos é um parâmetro específico muito usado na literatura para a avaliação do neurodesenvolvimento e foi observado neste experimento do PN11 ao PN16. A análise estatística através do teste do quiquadrado mostrou que 48,30% dos animais do grupo óleo de milho tendem a abrir os olhos de maneira equitativa entre os dias 14 e 15 de vida pós-natal, enquanto que 69,10% dos animais OMC abrem os olhos mais tardiamente (tabela 2), após o 15° dia de vida, sugerindo atraso neste importante indicador do neurodesenvolvimento.

Tabela 2. Efeito da exposição ao OMC sobre a frequência da abertura de olhos de ratos recém-nascidos de ambos os sexos. Dados são mostrados como porcentagem do número de animais por grupo. N mínimo = 29 por grupo por sexo. (Pearson Quiquadrado 120,69; df = 4; p < 0,001). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p < 0,05 (*).

Grupo		Antes do PN14	Depois do PN15
CO	Quantidade	29	31
	% dentro do Grupo	48,30%	51,70%
OMC	Quantidade	17	38
	% dentro do Grupo	30,90%	*69,10%

4.3 - GANHO DE PESO NO PERÍODO LACTACIONAL

Com o propósito de avaliar a toxicidade da substância, os animais foram pesados diariamente para verificar os efeitos da exposição ao OMC sobre o ganho de peso no período lactacional. O registro de peso diário dos filhotes revelou que o ganho de peso dos animais do grupo OMC de ambos os sexos foi significativamente menor quando comparado aos animais do grupo óleo de milho (gráfico 2). Essa diferença começou a ser estatisticamente significativa logo a partir do terceiro dia de exposição. As fêmeas do grupo OMC obtiveram o peso corporal aproximadamente 13% inferior que o grupo óleo de milho ao término da exposição (PN22). Enquanto os machos do grupo OMC chegaram a apresentar peso corporal de aproximadamente 13,5% inferior que o grupo óleo de milho no 13º dia de exposição. No entanto os machos OMC nos últimos três dias de exposição recuperaram o peso equiparando-se aos roedores do grupo óleo de milho. Já o mesmo fenômeno não foi observado nas fêmeas do grupo OMC.

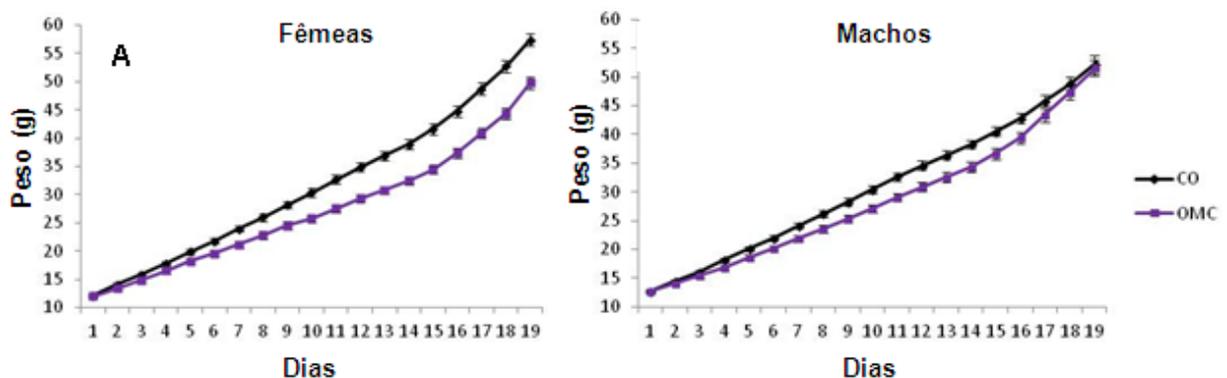


Gráfico 2. Ganho de peso durante o período lactacional de ratos de ambos os sexos durante 18 dias de exposição ao OMC. A representa o ganho de peso das fêmeas e B o ganho de peso dos machos. Dados são mostrados como média \pm EPM do peso. Animais foram pesados diariamente. N mínimo = 29 por grupo por sexo. ANOVA mostrou que os animais do grupo OMC de ambos os sexos apresentaram uma diminuição no ganho de peso estatisticamente significativo com relação ao grupo óleo de milho durante os 18 dias de administração. ($F = 23,828$; $df = 1$; $p < 0,001$). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.4 - GANHO DE PESO NO PÓS-DESMAME

O registro de peso dos animais continuou sendo realizado mesmo após o término da exposição dos roedores no período lactacional para verificar se a diminuição no ganho de peso seria revertida ou se os efeitos seriam permanentes até a fase adulta.

O registro semanal do ganho de peso de roedores de ambos os sexos revelou que o peso dos animais do grupo OMC é equivalente aos dos animais do grupo óleo de milho. Ou seja, os animais conseguiram recuperar o baixo ganho de peso no período lactacional como pode ser observado no gráfico 3.

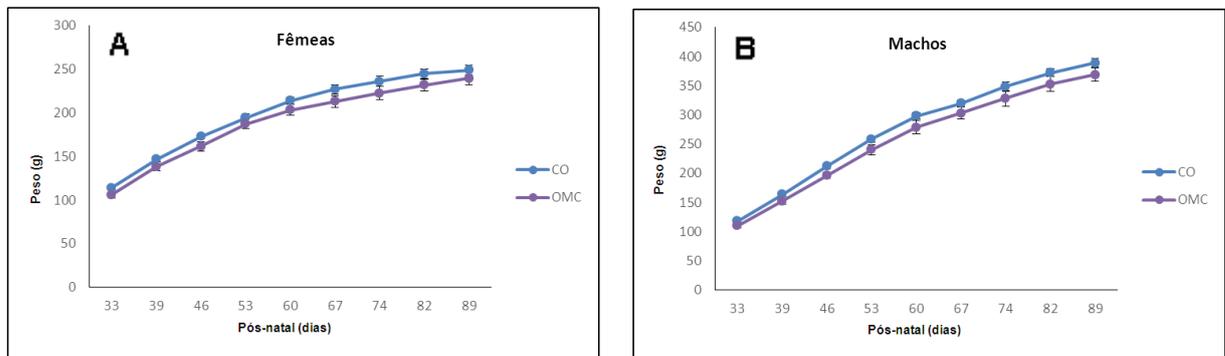


Gráfico 3. Ganho de peso durante o pós desmame de ratos de ambos os sexos a partir do PN33 e término no PN89. A representa o ganho de peso das fêmeas e B o ganho de peso dos machos. Dados são mostrados como média \pm EPM. Após o final da exposição no período lactacional, os animais continuaram tendo seu peso registrado do PN33 até PN89 uma vez por semana. N mínimo = 7 por grupo por sexo.

4.5 - DOSAGEM SÉRICA DE T4 TOTAL

Com a finalidade de comprovar os dados da literatura que apontam o OMC como potencial desregulador tireoideano, a dosagem sérica de T4 total foi realizada no PN23. Nela foi observada que a exposição dos roedores no período lactacional ao OMC desencadeou uma redução nos níveis séricos de tiroxina total significativamente menor que a dos animais do grupo óleo de milho o que é indicativo que os animais do grupo filtro solar exibiram um perfil de hipotiroxinemia como mostra o gráfico 4. Os níveis de T4 total dos roedores do grupo OMC foram aproximadamente 5 µg/dL enquanto que dos animais do grupo óleo de milho cerca de 6,25 µg/dl. Uma redução de 20% nos níveis do hormônio tireoideano

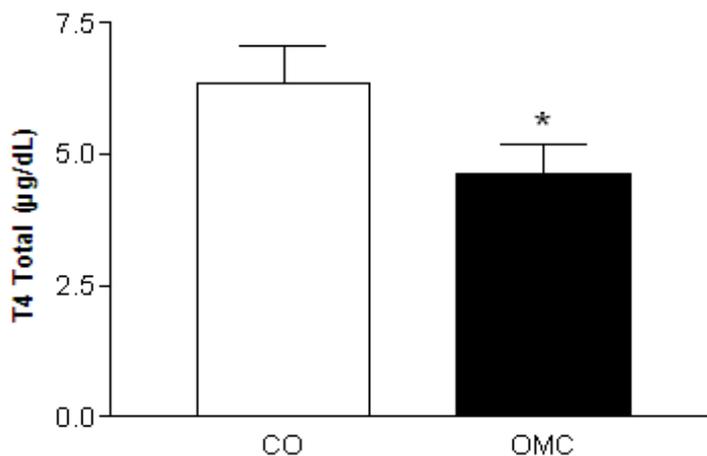


Gráfico 4. Dosagem hormonal de tiroxina (T4 total) de roedores de ambos os sexos através de Kit RIA. Dados são mostrados como média \pm EPM de T4 total (ug/dL). N mínimo = 7 por grupo por sexo. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

4.6 - AVALIAÇÃO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES

Alguns estudos correlacionam as alterações no eixo tireoideano com os órgãos linfoides demonstrando que estes sistemas estão intimamente ligados. Com a proposta de se observar a possível participação da desregulação tireoideana induzida pelo OMC sobre o sistema imune, o registro de peso e a celularidade do baço e timo foram realizados neste trabalho. O registro de peso de órgãos do sistema imune como baço e timo revelou que o peso relativo (peso do órgão ajustado pelo peso corporal) do grupo OMC foi significativamente menor que os do grupo óleo de milho (gráfico 5). Houve redução de aproximadamente 15% do grupo OMC frente ao controle em relação ao peso relativo do timo enquanto que a redução do baço foi de aproximadamente 12% para ambos os sexos. No entanto, não foram observadas diferenças significativas com relação ao número de células totais do timo e do baço do grupo OMC quando comparado ao controle negativo (gráfico 6).

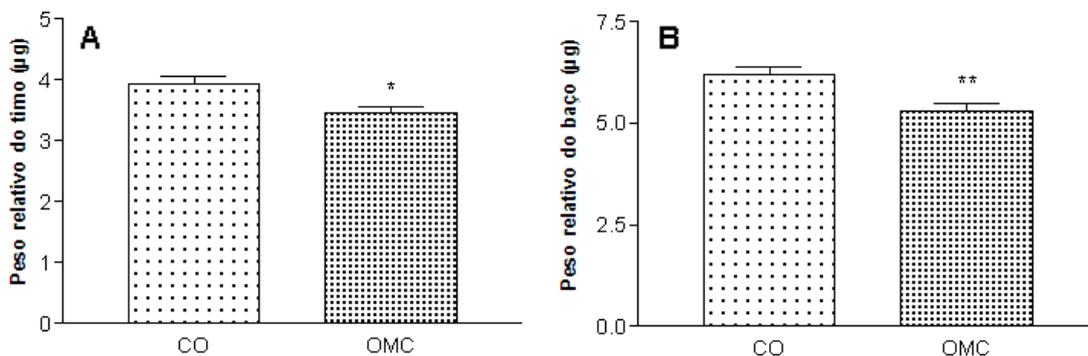


Gráfico 5. A representa o peso relativo do timo e B o peso relativo do baço de ratos de ambos os sexos no PN23. Dados são mostrados como média ± EPM. N mínimo = 20 por grupo. Análise estatística utilizada foi o teste t student ($p < 0,0052$) para o timo e ($p < 0,0031$) para o baço. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*) para o timo e $p < 0,05$; $p < 0,005$ (**) para o baço.

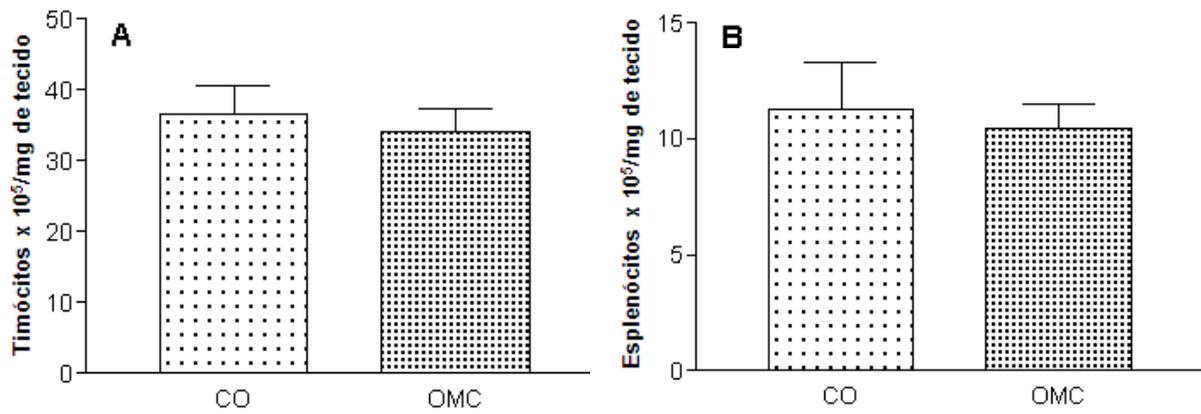


Gráfico 6. A representa a contagem de células do timo e B a contagem de células do baço de ratos de ambos os sexos no PN23. Dados são mostrados como média \pm EPM. N mínimo = 16 por grupo para timócitos e 19 por grupo para esplenócitos. Análise estatística utilizada foi o teste t student (timócitos $p < 0,5949$; esplenócitos $p < 0,3758$). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

4.7 - AVALIAÇÃO DE ANSIEDADE

O teste do labirinto em cruz elevado visa investigar alterações comportamentais de ansiedade ocasionadas pela exposição ao OMC durante a amamentação. Neste teste foi observado que os animais de ambos os sexos do grupo OMC tendem a ficar mais tempo no braço aberto como pode ser observado no gráfico 7. Essa diferença foi estatisticamente significativa com relação aos animais do grupo óleo de milho. A diferença foi de 166,7% aproximadamente e o resultado é um indicativo que o OMC diminuiu a ansiedade dos roedores.

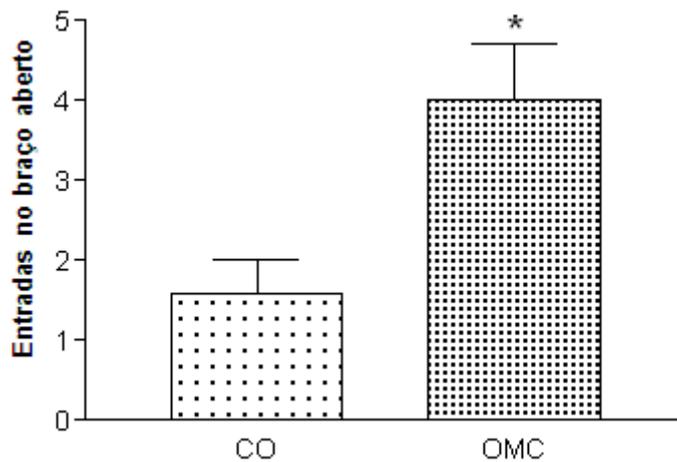


Gráfico 7. Teste do labirinto em cruz elevado. Dados são mostrados como média \pm EPM. N mínimo = 5 por grupo por sexo. Análise estatística utilizada foi o teste t student ($p < 0,008$). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

4.8 - ATIVIDADE LOCOMOTORA

O teste do campo vazado foi utilizado com o objetivo de investigar a atividade locomotora. Neste teste observamos que animais do grupo OMC de ambos os sexos apresentaram maior atividade locomotora que os do grupo óleo de milho. Essa diferença foi estatisticamente significativa. As fêmeas do grupo OMC deslocaram-se 30% mais que o grupo óleo de milho enquanto que os machos 57,14% aproximadamente. Podemos observar, pelo gráfico 8 que este efeito foi mais pronunciado em machos do que em fêmeas, pela diferença no número de quadrantes percorridos. O fato dos animais do grupo OMC terem se deslocado mais que o grupo controle revela um perfil de hiperatividade.

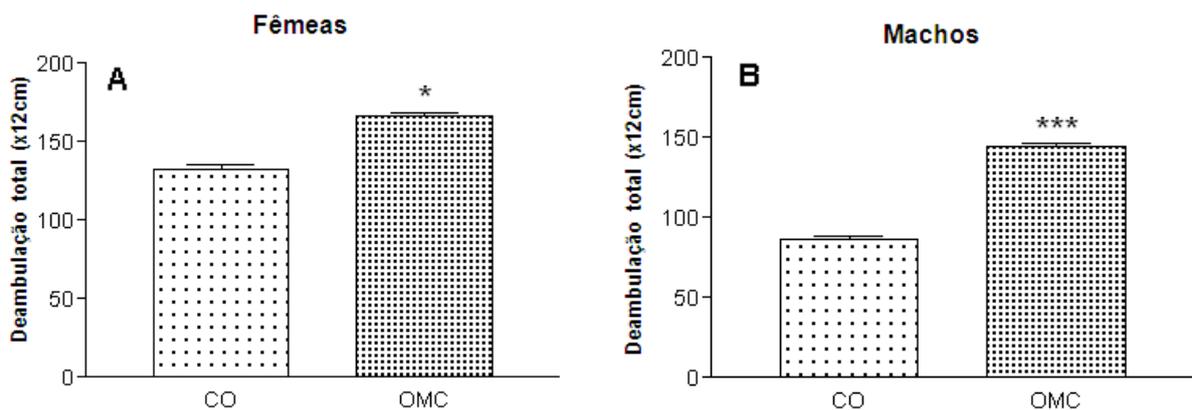
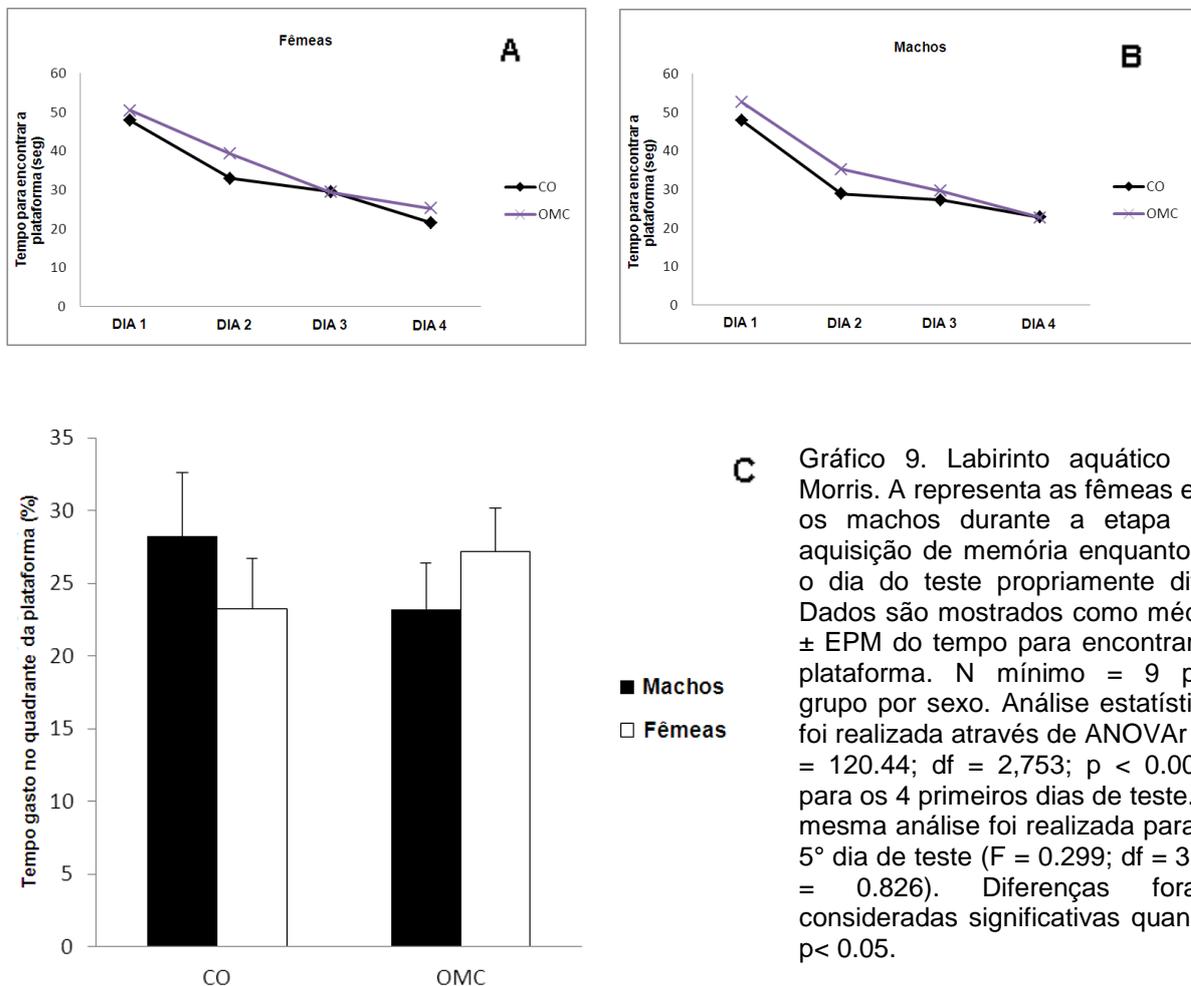


Gráfico 8. Teste do campo vazado. A representa a deambulação das fêmeas e B a deambulação dos machos. Dados são mostrados como média \pm EPM. N mínimo = 5 por grupo por sexo. Análise estatística utilizada foi o teste t student (machos $p < 0,001$; fêmeas $p = 0,023$). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (***)

4.9 - MEMÓRIA E APRENDIZADO

O teste do labirinto aquático tem como propósito avaliar alterações cognitivas, ou seja, memória e aprendizado. Nos 4 primeiros dias de teste, foi observado que não existem diferenças entre os animais do grupo OMC de ambos os sexos frente ao controle evidenciando assim que os roedores dos dois grupos adquiriram memória durante esta etapa do teste (gráfico 9: A e B). No 5° e último dia de avaliação, com a realização do teste propriamente dito, foi observado que não existiram diferenças significativas entre os roedores de ambos os sexos do grupo OMC versus o grupo óleo de milho como é mostrado no gráfico 9: C. Quanto mais tempo o animal fica no quadrante onde se situava a plataforma que foi removida, mais memória o animal apresenta. As fêmeas do grupo óleo de milho



C Gráfico 9. Labirinto aquático de Morris. A representa as fêmeas e B os machos durante a etapa de aquisição de memória enquanto C o dia do teste propriamente dito. Dados são mostrados como média \pm EPM do tempo para encontrar a plataforma. N mínimo = 9 por grupo por sexo. Análise estatística foi realizada através de ANOVA ($F = 120.44$; $df = 2,753$; $p < 0.001$) para os 4 primeiros dias de teste. A mesma análise foi realizada para o 5° dia de teste ($F = 0.299$; $df = 3$; $p = 0.826$). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

permaneceram 22,5% do tempo no quadrante onde situava a plataforma contra 27,5% do grupo OMC. Enquanto que nos machos esses valores foram invertidos, 27,5% do grupo óleo de milho contra 22,5% do grupo OMC.

5 - DISCUSSÃO

Atualmente os estudos sobre os mecanismos de ação do filtro solar octil metoxicinamato são muito escassos na literatura. Além disso, o número de trabalhos que o associa a desregulação tireoideana é muito limitado. Agregado a esse fato, os estudos realizados pela comunidade científica usam comumente ratas ovariectomizadas como modelo de hipotireoidismo, e este modelo não contempla outras importantes populações que devem ser estudadas. Os filhotes em fase de amamentação representam um grupo potencialmente vulnerável à toxicidade dessa substância. Nossos achados indicam que o OMC é capaz de reduzir T4 total e atraso no neurodesenvolvimento no período lactacional, sem, contudo promover alterações de memória e aprendizagem na vida adulta. Além disso, o OMC foi capaz de induzir alterações em órgãos linfoides e mudanças comportamentais como hiperatividade e redução da ansiedade nos animais.

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

Nossos dados demonstram que doses superiores a 500 mg/kg/dia são letais para os roedores, mas tal fato é evidente apenas para animais recém nascidos, pois alguns trabalhos usando tais doses em ratos adultos, não apresentaram a letalidade como desfecho. Schneider e colaboradores (2005) não observaram morte dos roedores com a administração de 1000 mg/kg/dia de OMC assim como Klammer e colaboradores (2007) usando a mesma dose e Axelstad e colaboradores (2011) com as doses de 750 e 1000 mg/kg/dia. Isto sugere que os lactentes são mais vulneráveis ao OMC em doses superiores a 500 mg/kg/dia uma vez que a letalidade é um indicativo de maior toxicidade para os roedores nesta idade. No entanto, não se sabe ao certo o motivo pelo qual os animais morrem. Distúrbios na tireóide no

período pós-natal poderiam explicar o percentual de sobrevivência, pois se a mortalidade estiver correlacionada com a carência dos hormônios tireoideanos, a suplementação dos mesmos evitaria a morte da prole, ou seja, T4 exerceria um efeito protetor. No entanto para confirmar tal hipótese é preciso realizar um estudo complementar suplementando com T4 total roedores expostos ao OMC para verificar se o mesmo é capaz de impedir a morte da prole.

Uma vez estabelecida a dose, e com o intuito de avaliar se a exposição ao OMC, administrado durante a lactação, causaria danos no desenvolvimento, o registro de peso corporal da prole foi obtido diariamente uma vez que a avaliação do ganho poderia ser uma importante ferramenta para observar se a dose adotada no estudo foi adequada. Ou seja, caso os animais do grupo filtro solar não ganhassem peso durante o desenvolvimento, isso seria um indicativo da elevada toxicidade da substância teste.

Foi observado em nossos experimentos que a exposição da prole no período lactacional ao filtro solar OMC na dose escolhida, foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso com relação aos animais do grupo controle negativo. Este efeito provavelmente ocorreu em função da redução do T4 total, já que os hormônios tireoideanos têm papel chave para o crescimento e desenvolvimento ósseo. A redução do crescimento é uma consequência da hipotiroxinemia desenvolvimental já demonstrada na literatura (AKAIKE et al., 1991; KOBAYASHI et al., 2005; GILBERT e SUI., 2006 e NODA et al., 2005). Nossos dados estão de acordo com Axelstad e colaboradores (2011) que observaram que a administração de 500 mg/kg/dia de OMC por via oral em ratas Wistar do dia gestacional 6 ao pós-natal 17 gerou uma diminuição estatisticamente significativa no ganho de peso da prole em períodos específicos como no PN7 e no PN14. Embora a administração do OMC não tenha sido realizada diretamente na prole, e sim indiretamente através do leite materno, a interferência materna na transferência da substância para os filhotes pode ter sido um atenuante, uma vez que parte do filtro solar provavelmente foi metabolizada e/ou distribuída para outros tecidos da mãe e consequentemente minimizou os efeitos no ganho de peso dos filhotes o que torna os efeitos do nosso ensaio sobre a prole, mais severos, já que os mesmos

receberam a substância diretamente sem a interferência maternal no processo. Por outro lado, a exposição fetal pode também ter ocorrido, uma vez que a mãe começou a ser exposta a partir do GD7, levando a uma exposição mais prolongada da prole.

Além disso, é importante ressaltar também que o efeito gerado nas fêmeas em nosso estudo foi mais severo do que nos machos uma vez que estes recobram o peso nos 3 últimos dias de exposição, fato que também foi observado por Axelstad e colaboradores (2011), que observaram que o peso das fêmeas foi afetado desde o nascimento até o PN50, fato este que provavelmente ocorreu devido a exposição pré-natal ao OMC.

Após o registro diário de peso corporal dos animais durante o período lactacional, continuamos a registrar o ganho de peso no período pós-desmame uma vez por semana até que os roedores chegassem à vida adulta as vésperas de serem submetidos aos testes comportamentais. A importância desta observação contínua no ganho de peso corporal sinaliza se as alterações ocorridas sobre o peso no período lactacional induzidas pela administração de OMC seriam persistentes ao longo do desenvolvimento até chegar à vida adulta, fato este que não foi observado em nossos experimentos, uma vez que a interrupção da exposição dos roedores ao filtro solar no período pós-desmame fez com que a redução do ganho de peso fosse revertida e conseqüentemente os roedores que foram expostos ao OMC durante o período lactacional conseguissem se equiparar aos do grupo óleo de milho.

Se o ganho de peso estiver correlacionado a queda dos hormônios tireoideanos, provavelmente a interrupção da exposição restabeleceu a função da glândula tireóide e conseqüentemente o ganho de peso corporal desses animais. No entanto para confirmar tal hipótese é preciso realizar a dosagem de T4 total no período pós-desmame para verificar se o déficit desse hormônio foi persistente ou revertido com a interrupção da exposição ao OMC. Se a redução for persistente provavelmente o ganho de peso corporal é independente dos hormônios tireoideanos, já que, mesmo com a carência destes os animais recuperaram o peso. Com isso existe a possibilidade de outro mecanismo, que não envolva os hormônios tireoideanos envolvido no ganho de peso corporal destes animais e caso a redução

dos hormônios tireoideanos seja revertida no período pós-desmame reforça a hipótese de que o fator causal para o menor ganho de peso corporal dos ratos do grupo OMC frente ao controle seja dependente dos hormônios tireoideanos. A dosagem de T4 total após o desmame no período em que houve a recuperação do peso dos animais será imprescindível para verificar o papel do hormônio tireoideano sobre o ganho de peso pós-desmame. Contudo podem existir múltiplos mecanismos envolvidos neste processo e por conta disso não poderá ser atribuída com certeza, única e exclusivamente responsabilidade à glândula tireóide por tais efeitos.

Essa reversão que observamos no ganho de peso pós desmame diverge de Axelstad e colaboradores (2011), que demonstraram que ratas gestantes adultas expostas ao OMC na dose de 500 mg/kg/dia do GD7 ao PN17 interferem significativamente no ganho de peso da prole nos dias pós-natal 63, 119, 154, 175 e 245. Provavelmente isto ocorreu devido ao período de exposição ter sido maior, ou ainda pelo fato da exposição ter sido via placenta e leite materno. Além disso, pode ter havido interferência da mãe sobre a prole. Seidlová-Wuttke e colaboradores (2006) ao administrarem 50 ou 250 mg de OMC a cada 20 g de ração diariamente, em ratas adultas ovariectomizadas bilateralmente, por 14 dias observaram que, as duas doses diminuíram significativamente o ganho de peso frente ao grupo controle. Contudo, é preciso ressaltar que os dois trabalhos apresentam modelos diferentes dos nossos, bem como janelas do desenvolvimento divergentes das que observamos.

Uma vez que a literatura aponta o OMC como um potencial desregulador tireoideano e que os fenômenos observados sobre o ganho de peso dos animais poderiam em parte ser explicados por uma redução destes hormônios, a dosagem sérica de T4 total foi realizada, no dia do desmame, após 18 dias de exposição dos animais lactentes ao OMC. Além do fato da hipotiroxinemia ser nosso objeto de estudo, avaliar a exposição ao OMC numa janela do desenvolvimento não explorada na literatura revela se realmente o filtro solar em questão perturba o eixo tireoideano e se essa alteração é similar à observada nos achados de outros grupos de pesquisa usando outros modelos animais.

Nossos resultados demonstraram que a administração de OMC no período lactacional foi capaz de depletar significativamente os níveis séricos de T4 total, demonstrando assim que nossos dados estão de acordo com a literatura que tem apontado o OMC como um desregulador tireoideano. Foi o que observaram Klammer e colaboradores (2007) ao administrar 333 ou 1000 mg/kg/dia de OMC durante 5 dias em ratas adultas ovariectomizadas bilateralmente. Seidlová-Wuttke e colaboradores (2006) observaram também redução de T4 total no mesmo modelo animal, porém administrando 50 mg a cada 20 g de ração ingerida pelas ratas durante 14 dias de exposição. Schmutzler e colaboradores (2004a) administrando a mesma dose de OMC só que por um período mais longo, 12 semanas, observaram o mesmo desfecho, pois os índices de T4 total foram significativamente menores frente aos animais do grupo controle negativo. Além desses, Axelstad e colaboradores (2011), usando um modelo mais semelhante com o que usamos em nosso experimento, ou seja, roedores que não sofreram intervenção cirúrgica (ovariectomização), no qual as mães foram gavadas do GD7 ao PN17 com OMC nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg/dia. Todas as doses foram capazes de diminuir significativamente os níveis séricos de T4 total tanto nas mães quanto na prole. Nossos dados em concordância com a literatura revelam o OMC como potencial desregulador endócrino, e usando a quantificação de T4 total como *endpoint*, um potencial desregulador do eixo tireoideano.

É sabido segundo Porterfield e colaboradores (1994) que os hormônios tireoideanos participam de etapas cruciais do neurodesenvolvimento e com a finalidade de observar se a hipotiroxinemia induzida pelo OMC poderia levar a tais alterações, usamos um parâmetro conhecido como abertura de olhos, muito empregado na literatura para investigar atraso ou aceleração nos processos de neurodesenvolvimento com base no dia pós-natal em que os animais abrem completamente ambos os olhos.

A administração do filtro solar foi capaz de atrasar significativamente o dia em que a maioria dos animais que compõem esse grupo abrem totalmente os dois olhos. Esse parâmetro é um marcador do neurodesenvolvimento muito empregado na literatura (GOTTESFELD & SILVERMAN., 1990). E, portanto ele é um indicativo

de que alterações cerebrais podem ter ocorrido nestes roedores. O atraso no dia da abertura dos olhos provavelmente se deu em função do quadro de hipotiroxinemia induzido pela administração oral de OMC durante o período lactacional. No entanto para confirmar tal hipótese é necessário suplementar com T4 os roedores que receberam OMC a fim de verificar se a reposição hormonal é capaz de atenuar ou extirpar o atraso desencadeado pela administração do filtro solar. Eayrs e colaboradores (1963) observaram que ao induzir um quadro de hipertiroxinemia em ratos com injeções de T3, era capaz de antecipar o dia em que esses roedores abriam os olhos, uma vez que os animais expostos ao hormônio tireoideano abriam os olhos precocemente quando comparados aos animais do grupo controle. Em contrapartida é esperado que animais com hipotiroxinemia abram os olhos mais tardiamente. É o que foi observado por Gottesfeld & Silverman (1990) com quem nossos resultados estão de acordo. Este grupo de pesquisa induziu o hipotireoidismo perinatal em filhotes através da administração de álcool em ratas grávidas e puderam observar que a prole apresentou atraso na abertura de olhos. Para confirmar esta hipótese os filhotes receberam precocemente suplementação com triiodotironina que reverteu o atraso na abertura de olhos induzido pelo quadro de hipotireoidismo.

Os hormônios e neurotransmissores exercem papel chave na regulação homeostática da imunidade. Contudo, a correlação entre o sistema imune e a glândula tireóide não é muito explorada na literatura em indivíduos saudáveis. Os achados focam-se essencialmente no estudo de populações clinicamente afetadas por distúrbios na glândula tireóide (PALMBLAD et al., 1981; NAKANISHI et al., 1991; COVAS et al., 1992; MARIOTTI et al., 1992; KRETOWSKI et al., 1999; BOSSOWSKI et al., 2003). No entanto Fabris e colaboradores (1995) já observaram que os HT's participam na linfopoiese primária e secundária. Portanto observamos os efeitos desencadeados pela desregulação tireoideana induzida pelo OMC sobre o sistema imune, visando confrontar nossos resultados com estudos que demonstram essa relação dos HT's sobre os órgãos linfoides. Para isso após o fim da exposição dos animais ao OMC no PN23, os animais foram eutanasiados e procedemos com a avaliação do peso relativo do timo dos animais, obtendo com isso a informação de que a exposição ao OMC diminuiu significativamente o peso relativo do timo desses

roedores quando comparados aos animais do grupo óleo de milho. Nossos resultados estão de acordo aos de Johnson e colaboradores (2012) que observaram que ratos adultos tireoidectomizados apresentavam redução significativa do peso relativo do timo 60 dias após o procedimento. A hipótese para tal alteração, é que a redução dos HT's interfere com os níveis dos corticoides, que são capazes de promover ações no timo, através dos receptores de glicocorticoides, que estão expressos neste órgão. Estudos mostram que o tratamento de roedores com corticosterona ou elevados níveis de glicocorticoides resultam na atrofia do timo por estimularem a apoptose (KARATSOREOS et al., 2010).

Portanto seria necessário realizar um estudo complementar para avaliar se a exposição dos roedores ao OMC em nosso trabalho altera os níveis de glicocorticoides bem como possível indução da morte celular por apoptose que justificariam a redução significativa do peso relativo do timo. Para investigar tal hipótese será necessário analisar mais profundamente os potenciais processos apoptóticos envolvidos no timo pela administração de OMC no período lactacional bem como os níveis de corticoides dos roedores.

Seguindo a mesma linha, a observação de órgãos linfoides secundários, revelou que a exposição ao OMC diminuiu significativamente o peso relativo do baço desses roedores quando comparados aos animais do grupo óleo de milho. Nossos resultados estão de acordo com Cano-Europa e colaboradores (2011) que observaram que ratos com hipotireoidismo induzido por Metimazol apresentaram uma redução significativa no peso relativo do baço. Uma possível explicação para tal fato é que foi observado que os animais com hipotireoidismo apresentaram aumento no índice apoptótico e na expressão da caspase 3, enzima também envolvida no processo de apoptose. Portanto o aumento do processo de morte celular por apoptose poderia justificar a diminuição do peso relativo do baço.

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

Além da avaliação do peso dos órgãos, realizamos a contagem total de células para verificar se o OMC interfere na quantidade de células presentes no órgão. Nossos resultados não apresentaram alterações significativas no número de células do timo dos animais do grupo OMC quando comparados aos do grupo óleo de milho. Estudos demonstram que o aumento nas concentrações dos hormônios sexuais acarretam alterações na celularidade do timo justamente por indução da morte celular por apoptose dos timócitos (MCMURRAY et al., 2000). E é sabido que o filtro solar OMC apresenta atividade estrogênica demonstrada por Schlumpf e colaboradores (2004), que embora não tenha sido o foco do nosso trabalho, explicaria alterações na contagem de células do timo que não encontramos no nosso estudo.

O número de animais usados em nosso experimento talvez não tenha sido substancial para que uma possível alteração na contagem de células ficasse evidente. Aumentar o valor amostral pode evidenciar alteração na contagem celular. Além disso, é preciso investigar o possível processo apoptótico induzido pela administração de OMC sobre as células do timo.

Assim como o observado em relação ao timo, não observamos alterações significativas no número de células do baço dos animais do grupo OMC quando comparados aos do grupo óleo de milho. Esses dados são conflitantes aos de Windhill e colaboradores (1998) que observaram que roedores castrados e consequentemente mais susceptíveis a danos na tireóide apresentaram um aumento no número de linfócitos B justificado por um provável aumento na linfopoese B na medula óssea. Para confirmar tal hipótese precisaríamos realizar um estudo complementar para verificar se a exposição ao OMC no período lactacional desencadeia alguma alteração em populações celulares específicas do baço, embora não observamos alterações no número de células totais deste órgão. A estratificação na contagem das células do órgão linfóide secundário ofereceria um panorama mais confiável sobre alterações em populações celulares específicas. Além disso, assim como no timo talvez fosse necessário aumentar nosso valor amostral para observar alguma mudança na contagem celular e consequentemente diminuir nosso erro e fatores de incerteza.

Por fim os animais foram acompanhados até a vida adulta para serem submetidos a testes comportamentais. Dentre eles, os roedores foram avaliados em testes de ansiedade. Estudos correlacionam distúrbios na glândula tireóide com estado comportamental de ansiedade e depressão (DEMET et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2009). Na tentativa de investigar alterações nesse processo, realizamos o teste comportamental do labirinto em cruz elevado em ratos na vida adulta para verificar se os danos gerados na amamentação se refletem na vida adulta dos roedores expostos ao filtro solar OMC.

Nossos resultados demonstraram que a exposição dos roedores de ambos os sexos no período lactacional ao OMC desencadeou um efeito ansiolítico na vida adulta uma vez que os animais do grupo filtro solar visitaram significativamente mais vezes os braços abertos no labirinto em cruz elevado quando comparados aos animais do grupo óleo de milho. Os animais naturalmente tendem a querer ficar mais tempo nos braços fechados, local onde estão menos vulneráveis e se sentem mais seguros (PELLOW, et al., 1985). O teste em si revela um paradigma de esquiva e aproximação dos braços abertos potencialmente vistos como perigosos, no entanto os roedores que receberam o filtro solar entravam mais vezes nesses braços o que sugere que o OMC diminuiu a ansiedade dos ratos deste grupo. É preciso confirmar se tal comportamento observado do grupo OMC no teste de ansiedade ocorreu em função do quadro de hipotiroxinemia induzido na amamentação ou se por outro mecanismo. Para confirmar tal hipótese será necessário suplementar os animais do grupo OMC com T4 total e observar se os resultados persistem.

Esses dados são conflitantes aos de Dias e colaboradores (2012) que observaram que a exposição oral por 3 meses de ratas adultas ao metimazol, uma droga capaz de induzir o hipotireoidismo, aumentava significativamente o número de entradas nos braços fechados já no primeiro mês de administração das substância. Ou seja, o metimazol apesar de também desencadear um quadro de hipotiroxinemia, ao contrário do OMC se mostrou ansiogênico. É importante salientar que o efeito do hipotireoidismo induzido nos roedores submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado pode ser diferente dependendo da substância usada bem

como a faixa etária em que o teste foi executado (SALA-ROCA et al., 2002; REIS-LUNARDELLI et al., 2007).

Alguns trabalhos associam comprometimentos na glândula tireóide com hiperatividade (AXELSTAD et al., 2008). Com o intuito de checar alterações nesse processo, realizamos o teste comportamental do campo vazado em ratos na vida adulta para verificar se os danos gerados no período lactacional se refletiam na vida adulta dos roedores expostos ao filtro solar OMC.

Pudemos observar em nossos experimentos que os animais expostos ao OMC no período lactacional, locomoviam-se mais do que os animais do grupo óleo de milho no teste do campo vazado. Isso ocorreu tanto nos machos quanto nas fêmeas. As fêmeas geralmente são mais ativas que os machos, locomovendo-se mais no ambiente disponível. O maior deslocamento de ambos os sexos de roedores do grupo OMC sugere então um perfil de hiperatividade que pode ter sido condicionado pela carência dos hormônios tireoideanos desencadeada durante a amamentação. No entanto, para confirmar tal hipótese é preciso verificar através de um estudo complementar se a reposição com T4 total é capaz de reverter ou atenuar a hiperatividade dos roedores supostamente desencadeada pelo quadro de hipotiroxinemia induzido no período lactacional. Nossos resultados são conflitantes aos de Axelstad e colaboradores (2011) que observaram que ratos expostos ao OMC do dia GD7 ao PN17 nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg/dia não exibiram um perfil de hiperatividade ao realizarem um teste de atividade locomotora em caixas com fotocélulas que registravam o deslocamento. O teste foi realizado em duas idades diferentes, PN63 e PN119. No pós-natal mais recente foi observado que os machos do grupo OMC não apresentavam diferenças significativas com relação aos controles enquanto que as fêmeas da dose de 750 e 1000 mg/kg/dia eram mais hipoativas que as fêmeas do grupo controle. Já no PN119 foi observado que os machos OMC da dose de 750 mg/kg/dia locomoviam-se significativamente mais que os controles enquanto que as fêmeas apenas da dose de 1000 mg/kg/dia eram mais hipoativas que as do grupo controle. Então nossos resultados estiveram de acordo apenas no PN119 na dose de 750 mg/kg/dia nos machos que apresentaram hiperatividade. No entanto é preciso levar em consideração que a dose administrada

é maior que a que foi usada em nossos experimentos. A divergência entre nossos resultados pode ser explicada por outras variáveis como o tempo de execução do teste já que nossos ensaios foram realizados em 5 minutos por animal enquanto de Axelstad foi de 30 minutos. Além disso, o tempo de exposição e a forma de exposição, podem ter influenciado nos resultados, já que em nossos estudos a prole foi exposta diretamente ao OMC enquanto que no outro trabalho os filhotes foram expostos via materna. Outra variável importante a ser considerada é a idade dos animais ao serem submetidos ao teste. Em nossos ensaios os roedores foram submetidos ao teste do campo vazado no PN91 e nos de Axelstad e colaboradores (2011) no PN63 e 119. Talvez tenhamos observado a hiperatividade por ter testado os animais num período pós-natal que fica justamente compreendido entre os pós-natais adotados pelo outro grupo de pesquisa, podendo o efeito da hiperatividade ter sido mascarado. O que foi convergente com relação nossos resultados é que os machos tanto do grupo OMC quanto do grupo controle se locomovem menos do que as fêmeas.

Vários estudos tem direcionado o papel das desordens tireoideanas sobre aspectos cognitivos indicando principalmente que o hipotireoidismo desencadeia comprometimentos neurocomportamentais (ZOELLER & CROFTON, 2005). A fim de estudar esse processo, submetemos nossos ratos ao teste comportamental do labirinto aquático de Morris, usado para avaliar memória e aprendizagem. Neste modelo, pudemos observar que durante a etapa de aquisição de memória, ou seja, nos quatro primeiros dias de teste, não existiu diferenças significativas entre os roedores do grupo controle e OMC de ambos os sexos. É importante salientar que ambos os grupos de exposição vieram diminuindo o tempo para encontrar a plataforma de escape ao longo dos dias de teste o que reforça ainda mais que o filtro solar em questão não desencadeou alterações na aquisição memória espacial.

No quinto e último dia de teste também não foram observadas diferenças significativas entre os animais do grupo OMC versus óleo de milho de ambos os sexos. Nesta etapa mesmo sem a plataforma foi possível observar que os roedores tanto do grupo OMC quanto do grupo óleo de milho nadavam no quadrante onde a plataforma de escape se situava nos quatro primeiros dias de teste. A etapa de

aquisição de memória se mostrou eficaz uma vez que no dia do teste propriamente dito, os roedores tendiam a nadar em círculos no quadrante onde a plataforma se encontrava, buscando insistentemente a mesma. Ao que tudo indica o quadro de hipotiroxinemia induzido pelo OMC no período lactacional não foi severo o bastante para desencadear alterações cognitivas na vida adulta. O que não quer dizer que essas alterações não existiram. Talvez se os testes comportamentais fossem realizados logo após o desmame, alterações em memória e aprendizado poderiam se manifestar. Outra hipótese é que os 5 dias de teste não foram suficientes para captar alterações neurocomportamentais. Portanto, a hipotiroxinemia sutil induzida pelo OMC, a idade dos roedores em que os teste foi realizado, bem como o tempo de avaliação podem justificar o porquê de não termos observado alterações cognitivas no teste do labirinto aquático de Morris.

Uma análise importante a se fazer é a dosagem dos níveis séricos de T4 total dos roedores na vida adulta após a exposição no período lactacional ao OMC. Essa avaliação revelará se a redução de T4 total observada no período lactacional foi revertida ou permaneceu na vida adulta e se essa possível normalização dos níveis de T4 na vida adulta poderiam estar correlacionados com os resultados nos testes comportamentais. Essa informação é relevante, pois o resultado observado no teste do labirinto aquático de Morris pode ter ocorrido pelo fato de os animais terem se recuperado e conseqüentemente restabelecido a glândula tireóide. Se não, se a redução for persistente é possível sugerir que a hipotiroxinemia induzida pelo filtro solar não foi severa a ponto de gerar alterações cognitivas.

Esses achados divergem dos de Axelstad e colaboradores (2011) que observaram que a administração de OMC do GD7 ao PN17 foi capaz de melhorar a memória apenas dos machos das doses de 500 e 1000 mg/kg/dia. O teste usado foi o labirinto radial por 21 dias na vida adulta e nele foi observado que os machos do grupo OMC nas doses informadas realizavam menos erros que os animais do grupo controle negativo para cumprir a tarefa. Talvez a sensibilidade e o tempo de avaliação dos animais foram determinantes para observar o favorecimento dos animais do grupo OMC no teste comportamental em questão. Contudo, outros trabalhos como os de Akaike e colaboradores (1991), Axelstad e colaboradores

(2008) e Noda e colaboradores (2005) observaram que o hipotireoidismo induzido por uma droga anti-tireoideana conhecida como propiltiouracil era capaz de comprometer significativamente esses roedores em testes de memória e aprendizagem.

Nossos resultados também foram conflitantes aos de Dias e colaboradores (2012) que submeteram ratas fêmeas adultas por via oral ao metimazol por três meses. O metimazol assim como o propiltiouracil é uma droga antitireoideana e como tal é um controle positivo para o hipotireoidismo. Foi observado que no 3º mês de realização do teste do labirinto aquático de Morris, as ratas com hipotireoidismo ficavam menos tempo no quadrante onde a plataforma de escape se encontrava durante a etapa de aquisição. Já na etapa de aquisição de memória não houve diferenças significativas entre os grupos de exposição. Esses resultados são concordantes com diferentes modelos animais que correlacionam o hipotireoidismo com disfunções cognitivas (TONG et al., 2007; WILCOXON et al., 2007; REIS-LUNARDELLI et al., 2007). Contudo como já discutido anteriormente, todos estes trabalhos avaliaram os animais imediatamente após o fim da exposição ao OMC, não avaliando, como no nosso caso, a provável existência de dano persistente a esta exposição, além de avaliarem diferentes janelas do desenvolvimento e diferentes formas de exposição ao OMC.

6 - CONCLUSÃO

Foi evidenciado que a administração de OMC no período lactacional reduziu os níveis de T4 total e que essa alteração pode estar relacionada à parâmetros desenvolvimentais como abertura de olhos e ganho de peso corporal bem como a alteração no peso relativo do timo e do baço. Além disso, a exposição dos lactentes no período lactacional gerou alterações neurocomportamentais na vida adulta como redução da ansiedade, aumento da atividade locomotora, mas sem alterar memória e aprendizagem.

Estes dados apontam para uma necessidade de maiores estudos acerca das ações desencadeadas pelo OMC durante a infância e servem de alerta para o uso dos filtros UV químicos em indivíduos pertencentes a grupos vulneráveis a esta exposição, como é o caso das crianças.

Além disso, nossos dados servem de ferramenta no tocante à vigilância sanitária para que as autoridades regulatórias revejam a cerca da segurança de produtos que contenham filtros solares como octil metoxi cinamato.

7 - PERSPECTIVAS

Investigar melhor o papel dos hormônios tireoideanos nos diversos parâmetros observados através de um estudo complementar utilizando um grupo exposto ao OMC que receba reposição de T4.

Realizar os testes comportamentais imediatamente após o desmame a fim de observar se alterações cognitivas que não apareceram na vida adulta podem se manifestar logo após o desmame.

Realizar a histologia do cérebro dos roedores expostos ao OMC para investigar alterações morfofuncionais.

Avaliar marcadores de apoptose e morte celular em timócitos e esplenócitos para investigar se são os responsáveis pelas alterações nos órgãos do sistema imune.

Quantificar o TSH na hipófise e o TRH no hipotálamo para estudar melhor as ações do OMC sobre o eixo tireoideano.

Quantificar a expressão de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo dos hormônios tireoideanos.

REFERÊNCIAS

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

ARUKWE, A., EGGEN T., and MÖDER, M. Solid waste deposits as a significant source of contaminants of emerging concern to the aquatic and terrestrial environments – A developing country case study from Owerri, Nigeria. **Science of the Total Environment**, v. 438, p.94-102, 2012.

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

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

BALOGH, T. S., VELASCO, M. V. R., PEDRIALI, C. A., KANEKO, T. M. and BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An Bras Dermatol.**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

BOSSIER, J. R. and SIMON, P. La reaction d'exploration chez la Souris. **Therapie**, v. 17, p. 1225-1232, 1962.

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

BUSER, H. R., BALMER, M. E., SCHMID, P. and KOHLER, M. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, p. 1427-1431, 2006.

CABRAL, L. D. S., PEREIRA, S. O. and PARTATA, A. K. Filtros solares e Fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Revista Científica do ITPAC**, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2011.

CALAFAT, A. M., WONG, L. Y., YE, X., REIDY, J. A. and NEEDHAM, L. L. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. **Environ Health Perspect.**, v. 116, p. 893-897, 2008.

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

CAROU, M. E., DEGUIZ, M. L., REYNOSO, R., SZWARCFARB, B., CARBONE, S., MOGUILEVSKY, J. A., SCACCHI, P. and PONZO, O. J. Impact of the uv-b filter 4-(methylbenzylidene)-camphor (4-MBC) during prenatal development in the neuroendocrine regulation of gonadal axis in male and female adult rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 410-414, 2009.

COVAS, M. I., ESQUERDA, A., GARCIA-RICO, A. and MAHY, N. Peripheral blood T-lymphocyte subsets in autoimmune thyroid disease. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 2, p. 131-135, 1992.

DA SILVA, S. V., SALAMA, C., RENOVATO-MARTINS, M., HELAL-NETO, E., CITELLI, M., SAVINO, W. and BARJA-FIDALGO, C. Increased leptin response and inhibition of apoptosis in thymocytes of Young rats offspring from protein deprived dams during lactation. **PLOS One**, v. 8, n. 5, p. 1-10, 2013.

DEMET, M. M., OZMEN, B. and DEVICE, A. Depression and anxiety in hyperthyroidism. **Arch. Med. Res.**, v. 33, p. 552-556, 2002.

DIAS, G. R. M., VIEIRA, F. A., DOBRACHINSKI, F., BRIDI, J. C., BALK, R. S., SOARES, F. A., NOGUEIRA, C. W. and BARBOSA, N. B. V. Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. **Int. J. Devl Neuroscience**, v. 30, p. 83-89, 2012.

DÍAZ-CRUZ, M. S., GAGO-FERRERO, P., LIORCA, M. and BARCELÓ D. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. **Anal Bioanal Chem.**, v. 402, p. 2325-2333, 2012.

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

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

FENT, K., ZENKER, A. and RAPP, M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. **Environ. Pollut.**, v. 158, p. 1817-1824, 2010a.

FENT, K., KUNZ, P. Y., ZENKER, A. and RAPP, M. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzyliden-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. **Mar. Environ. Res.**, v. 69, p. 54-56, 2010b.

FENT, K., KUNZ, P. Y. and GOMEZ, E. UV filters in the aquatic environment induce hormonal effects and affect fertility and reproduction in fish. **Chimia**, v. 62, p. 368-375, 2008c.

FERRARIS, F. K., MORET, K. H., FIGUEIREDO, A. B. C., PENIDO, C and HENRIQUES, M. G. M. O. Gedunin, a natural tetranortriterpenoid, modulates T lymphocyte responses and ameliorates allergic inflammation. **International Immunopharmacology**, v.14, p. 82-93, 2012.

FROTSCHER, M., JONAS, P. and SLOVITER, R. S. Synapses formed by normal and abnormal hippocampal mossy fibers. **Cell Tissue Res.**, v. 326, p. 361-367, 2006.

FUSE, Y. Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in humans. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 1-21, 1996.

GAGO-FERRERO, P., DIAZ-CRUZ, M. S. and BARCELÓ D. Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants. **Chemosphere**, v. 84, p. 1158-1165, 2011.

GAGO-FERRERO, P., ALONSO M. B., BERTOZZI, C. P., MARIGO, J., BARBOSA, L., CREMER, M., SECCHI, E. R., DOMIT C., AZEVEDO A., LAILSON-BRITO JR, J., TORRES, J. P. M., MALM, O., ELJARRAT E., DÍAZ-CRUZ, M. S. and BARCELÓ, D. Correction to First Determination of UV Filters in Marina Mammals. Octocrylene levels in Franciscana Dolphins. **Environ. Sci. Technol.**, v. 47, n. 11, p. 5619-5625, 2013.

GELBKE, H. P., KAYSER, M. and POOLE, A. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. **Toxicology**, v. 205, p. 17-25, 2004.

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

GOODMAN, L. S. and GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11.Ed. Mc Graw Hill, 2006.

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

GUIMARÃES, J. M. N., LOPES, C. S., and BAIMA, J. Depression symptoms and hypothyroidism in a population-based study of middle-aged Brazilian women. **J. Affect. Disord.**, v. 117, p. 120-123, 2009.

HAMBURGH, M., MENDOZA, L. A., BURKART, J. F. and WEIL, F. The thyroid as a time clock in the developing nervous system. In: Cellular Aspects of Neural Growth and Differentiation. **Pease DC**, v. 1, p. 321-328, 1971.

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

JANJUA, N. R., MOGENSEN, B., ANDERSSON, A. M., PETERSEN, J. H., HENRIKSEN, M., SKAKKEBAEK, N. E. and WULF, H. C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methylbenzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 57-61, 2004.

JIMÉNEZ-DÍAZ, I., MOLINA-MOLINA, J. M., ZAFRA-GÓMEZ, A., BALLESTEROS, O., NAVALÓN, A., REAL, M., SÁENZ, J. M., FERNÁNDEZ, M. F., and OLEA, N. Simultaneous determination of the uv-filters benzyl salicylate, phenyl salicylate, octyl salicylate, homosalate, 3-(4-methylbenzylidene) camphor and 3-benzylidene camphor in human placental tissue by LC-MS/MS. Assessment of their in vitro endocrine activity. **Journal of Chromatography B**, v. 936, p. 80-87, 2013.

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

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

KLAMMER, H., SCHLECHT, C., WUTTKE, W., SCHMUTZLER, C., GOTTHARDT, I., KÖHRLE, J. and JARRY, H. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. **Toxicology**, v. 238, p. 192-199, 2007.

KLEIN, A. H., ODDIE, T. H., PARSLow, M., FOLEY, T. P Jr. and FISHER, D. A. Developmental changes in pituitary-thyroid function in the human fetus and newborn. **Early Hum. Dev.**, v. 6, p. 321-330, 1982.

- KOBAYASHI, K., TSUJI, R., YOSHIOKA, T., KUSHIDA, M., YABUSHITA, S., SASAKI, M., MINO, T. and SEKI, T. Effects of hypothyroidism induced by perinatal exposure to PTU on rat behavior and synaptic gene expression. **Toxicology**, v. 212, p. 135-147, 2005.
- KRAUSE, M., KLIT, A., BLOMBERG JENSEN, M., SOEBORG, T., FREDERIKSEN, H., SCHLUMPF, M., LICHTENSTEIGER, W., SKAKKEBAEK, N. E. and DRZEWIECKI, K. T. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 424-436, 2012.
- KRETOWSKI, A., MYSLIWIEC, J., TUROSWKI, D., WYSOCKA, J. and KINALSKA, I. Analysis of recently activated, memory and naive lymphocyte T subsets in the peripheral blood of patients with Graves' disease and insulin-dependent diabetes mellitus. **Roczniki Akademii Medycznej Białymstoku**, v. 44, p. 226-234, 1999.
- KUNISUE, T. CHEN, Z., BUCK LOUIS, G. M., SUNDARAM, R., HEDIGER, M. L. and SUN, L. Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in US women and their association with endometriosis. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 4624-4632, 2012.
- LAUDER, J. M. Effects of thyroid state on development of rat cerebellar cortex. In: *Thyroid Hormone and Brain Development*. **Raven Press**, v. 1, p. 235-254, 1977.
- LÉON, Z., CHISVERT, A., TARAZONA, I. and SALVADOR, A. Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. **Anal. Bional. Chem.** v. 398, p. 831-843, 2010.
- MADEIRA, M. D. and PAULA-BARBOSA, M. M. Reorganization of Mossy Fiber Synapses in Male and Female Hypothyroid Rats: A Stereological Study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 337, p. 334-352, 1993.
- MARIOTTI, S., CATUREGLI, P., BARBESINO, G., MARINO, M., DEL PRETE, G. F., CHIOVATO, palmL., TONACCHERA, M., DECARLI, M. and PINCHERA, A. Thyroid function and thyroid autoimmunity independently modulate serum concentration of soluble interleukin 2 (IL-2) receptor (sIL-2R) in thyroid diseases. **Clinical Endocrinology**, v. 37, p. 415-422, 1992.
- MCMURRAY, R. W., WILSON, J. G., BIGLER, L., XIANG, L. and LAGOO, A. Progesterone inhibits glucocorticoid-induced murine thymocyte apoptosis. **Int. Immunophar.**, v. 22, p. 955-965, 2000.

MEEKER, J. D., CANTONWINE, D. E., RIVERA-GONZÁLEZ, L. O., FERGUSON, K. K., MUKHERJEE, B., CALAFAT, A.M., YE, X., ANZALOTA DEL TORO, L. V., CRESPO-HERNÁNDEZ, N., JIMÉNEZ-VÉLEZ, B., ALSHAWABKEH, A. N. and CORDERO, J. F. Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 3439-3447, 2013.

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

NAKANISHI, K., TANIGUCHI, Y. and OHTA, Y. Increased soluble interleukin 2 receptor levels in autoimmune thyroid disease. **Acta Endocrinologica**, v. 125, p. 253-258, 1991.

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

NOLAN, N. A. and PARKES, M. W. The effects of benzodiazepines on the behaviour of mice on a hole-board. **Psychopharmacology**, v. 29, p. 277-286, 1973.

NUNEZ, J. Effects of thyroid hormones during brain differentiation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 37, p. 125-132, 1984.

PAGANA, K. D. and PAGANA, T. J. **Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference**, 3^a. Ed. St Louis, Mosby-Year Book Inc., 1997.

PALMBLAD, J., ADAMSON, U., ROSEENQVIST, U., UDEN, A. M. and VENIZELOS, N. Neutrophil function in hypothyroid patients. **Acta Medica Scandinavica**, v. 210, p. 287-291, 1981.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E. and BRILEY, M. Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PINTO, W. B. V. R., GUI MI KO, VALERO-LAPCHIK, V. B., ARIZA, C. B. and PORCIONATTO, M. Test Elevated Plus Maze: applications and contributions to the study of animal disease models in neurology and psychiatry disorders. **Resbcal**, v. 1, p. 102-120, 2012.

PORTERFIELD, S.P. Vulnerability of the developing brain to thyroid abnormalities: environmental insults to the thyroid system. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, n. 2, p. 125-130, 1994a.

PORTERFIELD, S.P. and HENDRICH, C. E. (1993b). The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development – current perspectives. **Endocr. Rev.**, v. 14, p. 94-106, 1993b.

PORTERFIELD, S.P. Thyroidal Dysfunction and Environmental Chemicals – Potential Impact on Brain Development. **Environ. Health Perspect.** v. 108, p. 433-438, 2000c.

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

ROVET, J., EHRLICH, R. and ALTMANN, D. Psychoeducational outcome in children with early-treated congenital hypothyroidism. **Pediatrics**, v. 105, p. 515-522, 2000a.

ROVET, J., EHRLICH, R. and SORBARA, D. Neurodevelopment in infants and preschool children with congenital hypothyroidism: etiological and treatment factors affecting outcome. **J. Pediatr. Psychol.**, v. 2, p. 187-213, 1992b.

SALA-ROCA, J., MARTÍ-CARBONELL, M. A. and GARAU, A. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 72, p. 643-650, 2002.

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

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

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

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

SCHMUTZLER, C., BACINSKI, A., GOTTHARDT, I., HUHNE, K., AMBRUGGER, P., KLAMMER, H., SCHLECHT, C., HOANG-VU, C., GRÜTERS, A., WUTTKE, W., HUBERTUS, J., and KÖHRLE, J. The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent *in vitro* inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. **Endocrinology**, v. 148, n.6, p. 2835-2844, 2007b.

- SCHNEIDER, S., DECKARDT, K., HELLWIG, J., KÜTTLER, K., MELLERT, W., SCHULTE, S. and VANRAVENZWAAY, B. Octyl methoxycinnamate: two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1083-1092, 2005.
- SCHREURS, R. H., SONNEVELD, E., JANSEN, J. H., SEINEN, W. and VAN DER BURG, B. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. **Toxicol. Sci.**, v. 83, p. 264-272, 2005.
- SCHWEGLER, H., CRUSIO W. E., LIPP H. P., BRUST I. and MUELLER G. G. Early Postnatal Hyperthyroidism Alters Hippocampal Circuitry and Improves Radial-Maze Learning in Adult Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 2102-2106, 1991.
- SEIDLOVÁ-WUTTKE, D., CHRISTOFFEL, J., RIMOLDI, G., JARRY, H. and WUTTKE, W. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 214, p. 1-7, 2006.
- TONG, H., CHEN, G. H. and LIU, R. Y. Age-related learning and memory impairments in adult-onset hypothyroidism in kunming mice. **Physiol. Behav.**, v. 91, p. 290-298, 2007.
- WANG, S. Q., SETLOW, R., BERWICK, M., POLSKY, D., MARGHOOB, A. A., KOPF, A. W. and BART, R. S. Ultraviolet A and melanoma: A review. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 44, p. 837-846, 2001.
- WATANABE, C., KUWAGATA, M., YOSHIMURA, S., AZEGAMI, J., KOJIMA, K., ONO, H. and NAGAO, T. An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. **Congenit. Anom.**, v. 43, p. 117-179, 2003.
- WILCOXON, J. S., NADOLSKI, G. J. and SAMARUT, J. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor α . **Behav. Brain Res.**, v. 177, p. 109-116, 2007.
- WILLIAMS, G. R. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of Thyroid Hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, p. 784-794, 2008.
- WINDINILL, K. F. and LEE, V. W. K. Effects of castration on lymphocytes of thymus, spleen and lymph nodes. **Tissue Cell.**, v. 30, p. 104-111, 1998.
- YE, X., KUKLENYIK, Z., NEEDHAM, L. L. and CALAFAT, A. M. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzofenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 383, p. 638-644, 2008a.

YE, X., KUKLENYIK, Z., NEEDHAM, L. L. and CALAFAT, A. M. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 5407-5413, 2008b.

ZOELLER T. R., DOWLING A.L. and VAS A.A. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. **Endocrinology**, v. 141, p. 181-189, 2000.

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