

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TIANE FERREIRA DE CASTRO

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CONTAMINANTE TRIFENILESTANHO (TPT)
SOBRE A ATIVIDADE ESPERMÁTICA NAS FASES PRÉ-PÚBERE E
ADULTA DA ESPÉCIE *Calomys laucha*

Rio Grande – Rio Grande do Sul – Brasil

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO CONTAMINANTE TRIFENILESTANHO (TPT)
SOBRE A ATIVIDADE ESPERMÁTICA NAS FASES PRÉ-PÚBERE E
ADULTA DA ESPÉCIE *Calomys laucha*

Autor: Tiane Ferreira de Castro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elton Pinto Colares
Coorientadora: Prof^a. Dr^a.Carine Dahl Corcini

Mai de 2017

Rio Grande – Rio Grande do Sul – Brasil

“Mas é preciso ter manha,

É preciso ter graça

É preciso ter sonho sempre

Quem traz na pele essa marca

Possui a estranha mania de ter fé na vida.”

Milton Nascimento

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as bênçãos que me concedeu nesta vida, por ter me protegido e me amparado nos momentos difíceis de suportar. Teu amor e benevolência colocaram em meu caminho protetores espirituais que sempre me protegeram, e uma família maravilhosa que me apoiou e ajudou a superar as adversidades.

Ao Prof. Dr. Elton Pinho Colares, pela orientação, confiança, amizade e paciência. Sou muito grata por todas as oportunidades que o senhor me concedeu. Seguirei meu caminho sempre tendo muita gratidão e respeito ao senhor.

Aos meus queridos pais que sempre me apoiaram, me ajudaram mesmo quando não sabiam nem por onde começar. Sempre foram fortes e suportaram todos os desafios que surgiram no caminho. Obrigada por me acompanhar nas idas para Rio Grande. Amo muito vocês!

A minha irmã Fran que me apoiou quando precisei, sempre me auxiliando pessoal e profissionalmente. Gracias!!!

A Caia, querida irmã, meu cunhado Marcio e sobrinhos Frederico, Enrico e Leonardo, o carinho, amor e todos os auxílios que sempre me ofereceram foram muito importantes para superar os desafios e seguir em frente.

A Bata pelo carinho, paciência e todo apoio que sempre me dedicou. Gracias por ter ficado ao meu lado quando mais precisei e ter me apoiado nos momentos difíceis e me auxiliado nas conquistas.

Ao Eliezer, meu marido, que sempre se mostrou um companheiro para todas as horas, sempre me apoiando nos momentos bons e principalmente nos difíceis. Sempre

dedicando carinho, atenção e palavras de apoio; meu companheiro de muitas viagens para Rio Grande. Obrigada meu amor!

A querida Graciela Saalfeld que sempre oi amiga e companheira em todas as etapas deste trabalho. Obrigada pela paciência, apoio e parceria.

A minha Coorientadora Prof. Dr^a.Carine Dahl Corcini, pela confiança e apoio.

Ao Prof. Dr. Antonio Sergio Varella Jr, pelo apoio técnico imprescindível para a conclusão deste trabalho.

A equipe do ReproLab – UFPel, o apoio técnico de vocês foi muito importante nessa caminhada. Sou muito grata a vocês.

Aos colegas Gilson, Tati, Roberta e Robson, que me auxiliaram na realização deste trabalho, e sempre se mostraram dispostos e amigos. O apoio de vocês foi muito importante.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, cuja convivência sempre foi agradável o que suaviza os momentos difíceis.

Aos membros da banca que aceitaram meu convite de forma tão cordial.

A FURG pela acolhida amigável e ensinamentos que pude desfrutar junto à instituição.

A FAPERGS pela bolsa de estudos, fundamental para realização deste trabalho.

Que Deus abençoe a todos vocês!!!

RESUMO

Os compostos organoestânicos (OTs) apresentam uma variedade de químicos amplamente empregados na agricultura e na indústria em geral, sendo amplamente usados. Estudos vêm demonstrando que os OTs causam sério impacto ambiental, como o caso do hidróxido de trifenilestanho (TPT), de modo que se torna importante a realização de estudos que avaliem as alterações fisiológicas causadas por estes compostos, principalmente no que se refere as espécies nativas de regiões portuárias e de atividade agrícola. Do ponto de vista toxicológico, um aspecto importante diz respeito aos possíveis efeitos do TPT sobre o sistema reprodutivo. O presente estudo objetiva avaliar a influência da exposição ao TPT sobre a fisiologia reprodutiva de machos da espécie *Calomys laucha*, verificando os efeitos sobre a atividade espermática nas fases pré-púbere e adulta. Para tanto, este estudo foi dividido em dois experimentos visando verificar: **Exp.1:** Efeitos do TPT sobre a atividade espermática em indivíduos expostos via amamentação, onde as fêmeas lactantes foram organizadas em 5 grupos (n =5), sendo um controle água e um controle do veículo (carboximetilcelulose 1%) e três grupos com diferentes concentrações de exposição ao contaminante 0,5; 2,5 e 5,0 mg TPT/kg. As fêmeas parturientes foram expostas por gavagem ao TPT durante 20 dias, do 1º dia pós-parto até o 21º dia pós-natal (PND). Após este período os filhotes foram alojados separadamente e aos 100 (\pm 5) PND foram eutanasiados e realizada a avaliação da atividade espermática. Na avaliação da cinética espermática foi constatada uma redução na motilidade total nos grupos de 0,5 e 5,0 mg TPT/kg; na motilidade progressiva houve uma diminuição em todos os grupos tratados; constatou-se ainda a diminuição nas distâncias e velocidades média percorrida, retilínea e curvilínea, principalmente nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg, bem como na retilinearidade, linearidade e

oscilação. Nos resultados obtidos na citometria de fluxo, foi evidenciada uma redução na integridade de membrana, conforme o aumento das doses; a funcionalidade de mitocôndria apresentou redução nos grupos de 0,5 e 5,0 mg TPT/kg; foi constatado um aumento na ruptura de membrana nos grupos de maior dose 2,5 e 5,0 mg TPT/kg; a reação de acrossoma apresentou níveis mais elevados de acrossomas não íntegros nas doses de 0,5 e 5,0 mg TPT/kg. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o TPT causa comprometimento da atividade espermática em indivíduos expostos na fase de amamentação, principalmente no que se refere as motilidades total e progressiva, integridade de membrana e a funcionalidade de mitocôndria os quais apresentam danos persistentes observados quando avaliados na fase adulta, aos 100 (± 5) dias de vida.

Exp.2: Efeitos do TPT sobre a atividade espermática em indivíduos expostos na fase adulta. Os animais foram divididos em 6 grupos ($n = 7$), sendo um controle água e um controle do veículo (carboximetilcelulose 1%) e quatro grupos com diferentes concentrações de exposição ao contaminante 0,5; 2,5; 5,0 e 10,0 mg TPT/kg. Os animais foram expostos por gavagem ao TPT durante 21 dias, do 50° (± 3) ao 71° (± 3) dia de vida. Os animais expostos a maior dose (10 mg/kg) apresentaram sinais de intoxicação grave em apenas 7 (sete) dias de exposição. Os dados referentes a esta dose foram analisados separadamente por se tratar de uma exposição a curto prazo e os resultados obtidos sugerem que a exposição nesta dose foi severamente prejudicial à atividade espermática, principalmente no que se refere a motilidade espermática, funcionalidade mitocôndria, integridade e fluidez de membrana. Nas outras dosagens, a principal alteração constatada na avaliação da cinética espermática, foi a redução nas motilidades total e progressiva a partir do grupo 0,5 mg TPT/kg. Nos dados obtidos na avaliação por citometria de fluxo, foi observada uma diminuição na funcionalidade de

mitocôndria, conforme o aumento das doses, bem como um aumento na fluidez de membrana a partir da dose de 5,0 mg TPT/kg, a reação de acrossoma apresentou maiores valores de acrossomas não íntegros nas doses de 0,5 e 5,0 mg TPT/kg. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o TPT causa comprometimento da atividade espermática em indivíduos expostos na fase adulta, principalmente no que se refere as motilidades total e progressiva e a funcionalidade de mitocôndria. Deste modo, concluímos que o TPT pode ser excretado através do leite materno em fêmeas expostas por via oral, e que em machos expostos nas fases pré-pubere e adulta, por via oral, promove prejuízos na atividade espermática.

Palavras-chave: trifenilestanho, TPT, amamentação, atividade espermática, cinética espermática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS.....	13
1.2. TRIFENILESTANHO.....	18
1.2.1. TOXICIDADE REPRODUTIVA DO TRIFENILESTANHO.....	23
2. HIPÓTESES.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. OBJETIVO GERAL.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. ESCOLHA DOS ANIMAIS.....	29
4.2. EXPERIMENTOS.....	29
4.2.1 EXPERIMENTO 1 – Análise da exposição via a amamentação.....	29
4.2.2 EXPERIMENTO 2 – Análise da exposição na fase adulta.....	30
4.3. TRATAMENTO E DOSES.....	30
4.4. AVALIAÇÃO DE SINAIS DE TOXICIDADE.....	31
4.5. COLETA DE MATERIAL.....	31
4.6. ANÁLISE ESPERMÁTICA.....	32
4.6.1. ANÁLISE DA CINÉTICA ESPERMÁTICA.....	32
4.6.2. ANÁLISE DA ESTRUTURA CELULAR ESPERMÁTICA.....	32
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5. CAPÍTULO 1 - EFFECTS OF EXPOSURE TO TRIPHENYLTIN (TPT) CONTAMINANT ON SPERM ACTIVITY IN ADULTHOOD OF <i>Calomys laucha</i> EXPOSED THROUGH BREASTFEEDING.....	37
ABSTRACT.....	38

1. INTRODUCTION.....	40
2. MATERIALS AND METHODS.....	41
2.1 ANIMALS.....	41
2.2. MATING, GESTATION AND DEVELOPMENT.....	42
2.3. TREATMENT AND DOSES.....	42
2.4. COLLECTION OF MATERIAL.....	43
2.5. SPERM ANALYSIS - <i>Evaluations of sperm quality</i>	43
2.5.1. ANALYSIS OF SPERMATIC KINETICS.....	43
2.5.2. ANALYSIS OF SPERM CELL STRUCTURE.....	44
2.6. STATISTICAL ANALYSIS.....	46
3. RESULTS.....	47
3.1. EFFECT OF TPT EXPOSURE ON SPERMATIC KINETICS.....	47
3.2. EFFECT OF EXPOSURE TO TPT ON THE STRUCTURAL EVALUATION OF SPERMATOZOA.....	48
4. DISCUSSION.....	48
5. REFERENCES.....	56
6. CAPÍTULO 2 - TRIPHENYLTIN (TPT) ALTERS SPERMATIC PARAMETERS OF <i>Calomys laucha</i>	67
ABSTRACT.....	68
1. INTRODUCTION.....	69
2. MATERIALS AND METHODS.....	71
2.1. ANIMALS.....	71
2.2. TREATMENT AND DOSES.....	72
2.3. ASSESSMENT OF SIGNS OF TOXICITY.....	72
2.4. COLLECTION OF MATERIAL.....	73
2.5. SPERM ANALYSIS - <i>Evaluations of sperm quality</i>	73
2.5.1. ANALYSIS OF SPERMATIC KINETICS.....	73

2.5.2. ANALYSIS OF SPERM CELL STRUCTURE.....	73
2.6. STATISTICAL ANALYSIS.....	76
3. RESULTS.....	76
3.1. EFFECTS OF TOXICITY ON EXPOSURE TO TPT.....	76
3.2. EFFECT OF TPT EXPOSURE ON SPERMATIC KINETICS.....	77
3.3. EFFECT OF EXPOSURE TO TPT ON THE STRUCTURAL EVALUATION OF SPERMATOZOA.....	78
4. DISCUSSION.....	79
5. REFERENCES.....	85
7. DISCUSSÃO GERAL.....	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXO 1.....	129

1. INTRODUÇÃO

Nos países de forte economia agrícola a utilização de pesticidas na agricultura tem crescido rapidamente. Desde 1960, a intensificação da exploração agrícola conduziu ao aumento na produção e utilização de pesticidas no combate a pragas da lavoura (ECOBICHON, 1996). Apesar da sua importância na agricultura, os resíduos de pesticidas encontrados nos alimentos, água e solo podem oferecer riscos à saúde do homem e de outros organismos não alvo. Com isso, os efeitos fisiológicos da exposição a pesticidas têm se tornado foco de estudos (DELGADO & PAUMGARTTEN 2004; FORGET, 1989; SARPA, 2007).

Alguns pesticidas têm o potencial de produzir alterações no sistema endócrino devido a sua capacidade de ligação a receptores específicos de hormônios, promovendo efeitos antagônicos ou estimulatórios no sistema endócrino (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; GAIDO *et al.*, 1998; KAVLOCK *et al.*, 1996). Deste modo, essas substâncias exógenas com capacidade de alterar a função endócrina são conhecidas como desreguladores endócrinos, e podem causar efeitos adversos no indivíduo, sua progênie e/ou (sub) populações de organismos (GOLDMAN *et al.*, 2000). Dentre estas substâncias podemos destacar os compostos organoestânicos (OT), visto que a maioria destes possui a capacidade de alterar o mecanismo endócrino e, portanto, podem ser considerados como desreguladores endócrinos.

1.1. COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS

Os compostos organoestânicos (OTs) são organometálicos caracterizados por um átomo de estanho (Sn) ligado covalentemente a um ou mais substituintes orgânicos (por

exemplo: metilo, etilo, butilo, propilo, fenilo, octilo) (HOCH, 2001). Quimicamente, estes compostos são representados pela fórmula geral $R\text{SnX}$, na qual R é um grupo alquilo ou arilo orgânico e X é um ligante inorgânico ou orgânico como, por exemplo, cloreto, fluoreto, óxido, hidróxido, carboxilato ou tiolato (HOCH 2001; SEKIZAWA et al., 2003, WHO 1990). De acordo com o número de grupos orgânicos, os organoestânicos podem ter quatro classes distintas: monoorganoestânico ($R\text{SnX}_3$), diorganoestânico ($R_2\text{SnX}_2$), triorganoestânico ($R_3\text{SnX}$) e tetraorganoestânico ($R_4\text{Sn}$). Os compostos mono, di e tri organoestânicos contêm também vários grupos químicos, os quais podem ser inorgânicos ou orgânicos. Os compostos tetraorganoestânicos são utilizados principalmente como matéria-prima para a fabricação de outros compostos orgânicos de estanho e não ocorrem em produtos químicos (HOCH, 2001; SEKIZAWA et al., 2003; WHO, 1999).

As propriedades químicas e físicas dos compostos organoestânicos variam significativamente, dependendo principalmente do número e natureza dos grupos R, mas também do tipo de ligando (X). A solubilidade de organoestânicos em água, por exemplo, tende a diminuir tanto com o aumento no número e comprimento dos substituintes orgânicos. Contudo, a natureza do ligando também pode desempenhar um papel importante (HOCH, 2001, WHO, 1990). A toxicidade dos organoestânicos também varia muito, sendo fortemente influenciada pelo número e natureza dos grupos orgânicos. Em geral, o estanho inorgânico é não tóxico, enquanto que os compostos triorganoestânicos, como o trifenilestanho (TPT), têm atividade toxicológica máxima (HOCH, 2001; SEKIZAWA, et al., 2003).

Com uma produção anual estimada de cerca de 60.000 toneladas, os OTs pertencem à família dos compostos organometálicos mais utilizados (MALA, 2008).

São amplamente usados como pesticidas agrícolas; estabilizadores de PVC; agentes preservativos da madeira, algodão, papel; e aditivos de tintas para uso náutico, atuando como antiincrustante (SEKIZAWA, 1999; ANVISA, 2004). A grande maioria destes compostos tem origem antropogênica, com exceção do metilestanho que pode ser produzido por biometilação ambiental por bactérias (FENT, 1996; GUARD *ET AL.*, 1981; HALLAS *et al.*, 1982). Os compostos organoestânicos são utilizados como aditivos no processo de fabricação de PVC para evitar a sua descoloração e fragilização sob a influência da luz e do calor (HOCH, 2001). Além da estabilização do PVC, os organoestânicos também são usados como catalisadores na produção de espumas de poliuretano e silicones. Os compostos triorganoestânicos funcionam como agentes biocidas e são utilizados em conservantes de madeira e tintas antiincrustantes, bem como outros conservantes. Seu uso é muito restrito por terem propriedades perigosas para a saúde e o ambiente. Já os compostos mono e diorganoestânicos são utilizados como estabilizadores na fabricação de plásticos. Podem também ocorrer em selantes, adesivos, compostos de junção e revestimentos, onde funcionam como catalisadores no aglutinante (BLUNDEN & EVANS, 1990; GODOI *et al.*, 2003).

Sabe-se há mais de duas décadas que estes compostos geram fortes impactos ambientais. Contudo, os processos de regulamentação da produção e utilização destes compostos são extremamente lentos (SARPA, 2007). A contaminação ambiental por OTs pode ocorrer através do descarte de produtos que os contenham em aterros sanitários, bem como o desgaste de produtos à base de PVC e outros inúmeros produtos industriais revestidos e/ou protegidos por estes compostos que contaminam os esgotos municipais e conseqüentemente o lençol freático e outros corpos d'água (Figura 1). A contaminação de campos, dunas e corpos d'água também pode ocorrer pela utilização

agrícola de compostos triorganoestânicos, que são transportados pelo ar ou penetram no solo podendo atingir lençóis freáticos (FENT, 1996; SARPA, 2007).

Como resultado de suas aplicações industriais ou agrícolas comuns, vários ecossistemas foram expostos a OTs, onde podem interagir com os organismos presentes. Estudos sobre a distribuição e os efeitos dos OTs no ambiente marinho têm sido conduzidos desde o final da década de 1980 (GIBBS *et al.*, 1987, Horiguchi *et al.*, 1994, Gomez-Ariza *et al.*, 1998, Leung *et al.*, 2001). Devido ao seu uso generalizado, os OTs podem ser encontrados em quase toda parte: solos, sedimentos, água, biota e atmosfera. Em termos gerais, as menores concentrações são detectadas na coluna de água, enquanto que as mais altas são detectadas nos sedimentos e biota, particularmente nos predadores de topo da coluna (KANNAN & TANABE, 2009).

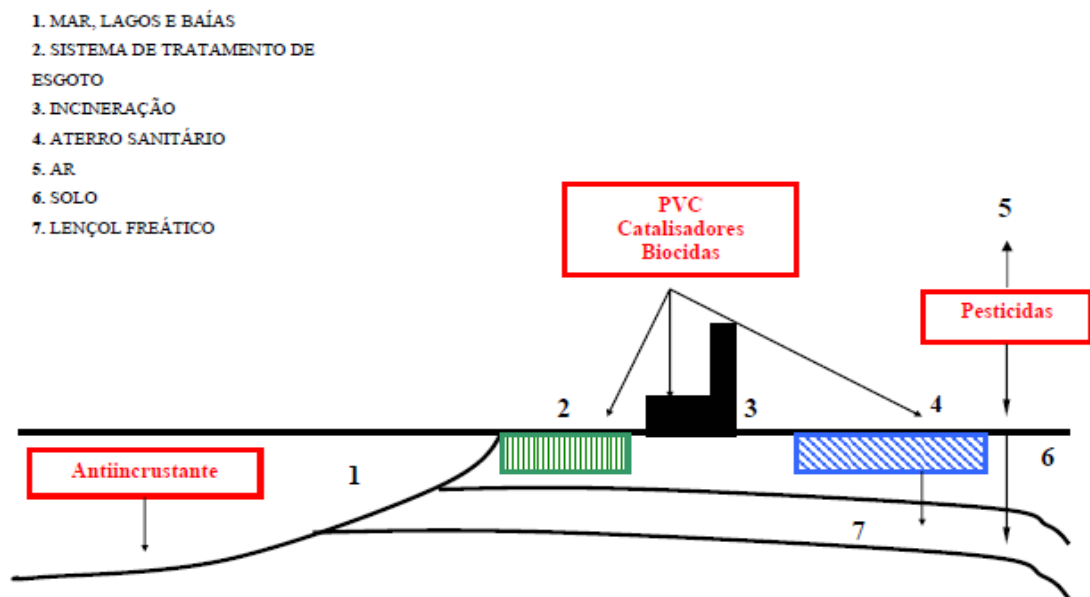


Figura 1: Vias de contaminação do ambiente por compostos organoestânicos.

Dentre os diferentes grupos de OTs, os triorganoestânicos são os mais estudados, visto que sob o ponto de vista toxicológico são os mais tóxicos para os organismos aquáticos (FENT, 1996a, GUARD *et al.*, 1981). A restrição da utilização de triorganoestânicos em tintas antiincrustantes tem sido adotada em muitos países devido aos seus efeitos catastróficos na indústria de ostras e efeitos mais gerais no ecossistema aquático (CAO *et al.*, 2009; CE, 2003; SONAK *et al.*, 2009; WHO, 1999). Foi constatado que os OTs causam efeitos negativos bem conhecidos sobre os organismos aquáticos, como por exemplo o imposex nos gastrópodes. Este fenômeno é considerado o melhor exemplo de perturbação endócrina na vida selvagem e tem recebido muita atenção da comunidade científica durante um longo período de tempo (DELGADO FILHO *et al.*, 2011; MATTHIESSEN, 2013).

Diante da extensa contaminação do ambiente marinho por OTs como o tribulestano (TBT) e TPT e seus metabólitos, em virtude dos efeitos deletérios para organismos não-alvo, foram estabelecidas restrições ao seu uso que culminaram com uma proibição global em 2008 (SONAK *et al.*, 2009). A Organização Marítima Internacional (IMO), na Convenção sobre o Controle de Sistemas Antiincrustantes Nocivos em Navios (Convenção AFS), realizada em 2001, estabeleceu a proibição do uso de OTs como antiincrustantes em embarcações, medida que entrou em vigor em setembro de 2008, (IMO, 2001). A fim de facilitar a ratificação da Convenção AFS pelos seus Estados-Membros, a Comunidade Europeia (CE) publicou um regulamento específico (CE n.º 782/2003) para proibir a utilização de OT prejudiciais em tintas antiincrustantes em navios a partir de 2003 (CE, 2003).

1.2. TRIFENILESTANHO

Os compostos de trifenilestanho (TPT) são um grupo de OT, derivados de trifenil de estanho tetravalente, de acordo com a fórmula geral $(C_6H_5)_3Sn-X$, em que X é um anion ou grupo aniônico, podendo ser um cloreto, hidróxido e acetato. São hidrofóbicos devido à presença de substituintes hidrocarbonados e, portanto, sua solubilidade em água é relativamente pequena (RÜDEL, 2003). São sólidos incolores com baixas pressões de vapor. O TPT é fortemente adsorvido ao sedimento e ao solo, e ocorre uma pequena dessorção. A contaminação ambiental é dependente da persistência do TPT no ambiente que está intimamente relacionada com o tipo de solo e de seu pH. A estimativa da meia-vida do TPT em solo arenoso e sedimento é de 1 a 3 meses, contudo para solos inundados foi descrita a meia-vida de aproximadamente de 126 dias (SEKIZAWA, 1999). As concentrações ambientais de compostos de trifenilestanho diminuíram nos últimos anos como resultado de restrições na sua utilização em tintas antiincrustantes.

Embora o TPT seja usado como agente antiincrustante em adição ao TBT, sua principal aplicação é agrícola, onde este é usado como pesticida, com ação fungicida, sobretudo nas plantações de feijão, algodão, batata, beterraba e arroz (WHO, 1999). Apesar das poucas estimativas de consumo, o uso de TPT como fungicida agrícola não é raro. Em países europeus, como a Holanda, o consumo anual de acetato de trifenilestanho (TPTa) na safra de batata do ano de 1987 foi de 300 toneladas, o que representa aproximadamente 8% do total de fungicidas utilizados neste país (FENT, 1996). Em Minnesota, 10,73% das culturas de batata foram tratadas com hidróxido de TPT (TPT_h) (SUBRAMANYAM, 1993). Segundo a Agencia de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos (EUA), o consumo de hidróxido de TPT em culturas de nozes, batatas e beterrabas, chegou a 260 toneladas (EPA, 1999). Em Taiwan, 27% dos

agricultores entrevistados admitiram o uso ilegal da TPTa, mesmo após sua proibição total nesse país (HU *et al.*, 2009). Sob estas circunstâncias, o escoamento agrícola também poderia contribuir para a contaminação do meio marinho por TPT. A quantidade total de TPT produzida anualmente na China é estimada em 200 toneladas (HU *et al.*, 2009), enquanto no Japão, 140-160 toneladas de TPT foram produzidas para exportação anual durante o período 1994-1996 (WHO, 1999).

A utilização do TPT na agricultura nos EUA levou a concentrações em corpos d'água próximos às atividades agrícolas de até 6 µg de TPT / L, e concentrações bioacumuladas na musculatura de peixes equivalentes a 389 ng de TPT / g de tecido (JONES-LEPP *et al.*, 2004). No Japão, foi encontrado nos tecidos de aves marinhas concentrações de TPT que variaram de 0,6 a 1500 ng / g de peso húmido (MIZUKAWA *et al.*, 2009). A Japan Environment Agency examinou os níveis de TPT na água, sedimentos e em organismos em cerca de 30 locais (estuários e baías) no Japão entre 1982 e 1995, e constatou que: os níveis de TPT na água (limite de detecção de 5 ng / litro) e sedimento (limite de detecção de 1,0 ng / g) das áreas de baía e costeira vêm diminuindo lentamente ao longo dos anos, passando de 2,7-8,0 ng / litro (água) e 3,3-7,8 ng / g (sedimento) entre 1988-1991 para 2,5-3,0 ng / litro (água) e 1,5-2,3 ng / g (sedimento) entre 1992-1995 (JEA, 1996). Na Holanda, foram encontrados no sistema do lago Westinder até 920 ng de TPT / g de sedimento (STAEB *et al.*, 1996). Nos mexilhões zebra utilizados como biomonitor para avaliar a poluição de TPT em águas holandesas (STAEB *et al.*, 1995) foram encontradas concentrações elevadas (1700-3200 ng de estanho / g de peso seco) perto de locais onde o fungicida TPT tinha sido pulverizado. Também foram detectados produtos de degradação (di e monofenilestanho) em quase todos os mexilhões (STAEB *et al.*, 1995). Já na Alemanha, em culturas de

beterrabas pulverizadas com foram encontrados resíduos em variando entre 0.1 a 1.9 mg/kg, 35 dias após a aplicação (FAO, 1991).

Tanto o TBT como o TPT são potencialmente tóxicos para a maioria das espécies que foram testadas. Porém são relativamente escassos os estudos toxicológicos com TPT, especialmente testes de toxicidade crônica de ciclo de vida completo, de modo que pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação. Até o momento, a maioria das informações sobre a distribuição e toxicidade dos OTs é sobre o TBT e seus produtos de transformação, enquanto pouca informação sobre a ocorrência de compostos TPT e seus derivados. Assim, em comparação com o TBT, há uma escassez de informações sobre a distribuição, toxicidade e acúmulo do TPT (FENT & HUNN, 1991; SHIM *et al.*, 2005).

A revisão publicada pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO), descreveu a toxicidade do TPT para os mamíferos e sua potencial toxicidade para os seres humanos, incluindo efeitos de neurotoxicidade, imunotoxicidade, indução de apoptose em timócitos, indução de hiperplasia/adenomas em órgãos endócrinos, e irritação ocular (WHO, 1999). As principais vias de exposição ao TPT são: oral, inalatória, dérmica e absorção pela mucosa conjuntival, sendo altamente absorvido pelo trato gastrointestinal e pele (EPA, 1999). Poucas informações sobre a toxicidade do TPT estão disponíveis para algumas espécies de algas marinhas, invertebrados, anfíbios, peixes e alguns mamíferos, principalmente roedores, sendo que a maioria dos dados sobre a toxicidade do TPT para peixes foi obtida para larvas ou juvenis. Os valores de CL50 para peixes variam de 7,1 a 62 $\mu\text{g L}^{-1}$ (FENT & MEIER, 1992; FENT & MEIER, 1994). Além disso, os compostos TPT podem afetar o comportamento de alimentação e natação de girinos do sapo europeu, *Rana esculenta* (SEMLITSCH *et al.*, 1995). A presença do TPT em ambientes costeiros é muito

evidente, e conforme o estudo de Yi *et al.* (2012), revelou sua concentração em diferentes componentes do ambiente marinho (Figura 2).

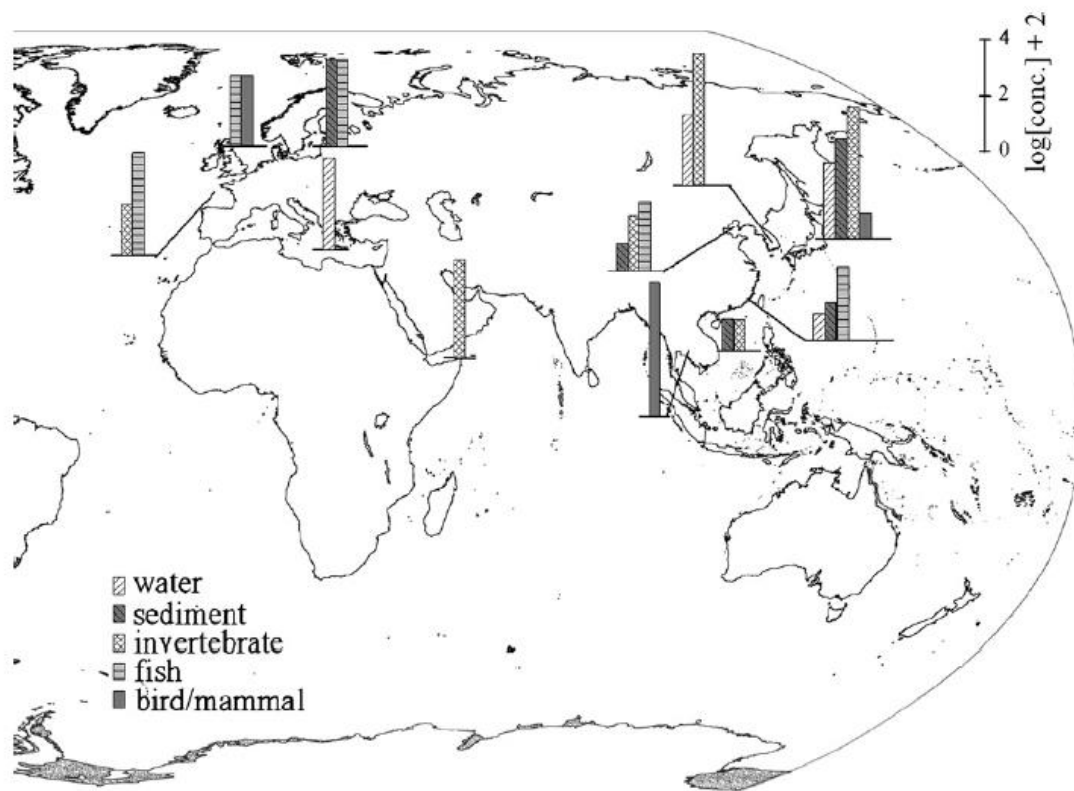


Figura 2: Distribuição do TPT em componentes do ambiente marinho e costeiro. Para uma melhor visualização da concentração de TPT em cada área, os valores foram expressos em $\text{Log } 10 [\text{conc.}] + 2$ (YI *et al.*, 2012).

No estudo realizado por Yi *et al.* (2012) foi analisado a bioacumulação de TPT e outros dois compostos fenilestânicos, o DPT (difenilestanho) e o MPT (monofenilestanho), e constatado que ao contrário dos compartimentos abióticos, o TPT é consistentemente o composto dominante em invertebrados e peixes marinhos, assim como em mamíferos e aves costeiras, de modo que contribui com 63,4%, 65,8% e 49% do total de compostos fenilestânicos nestes, respectivamente (Figura 3).

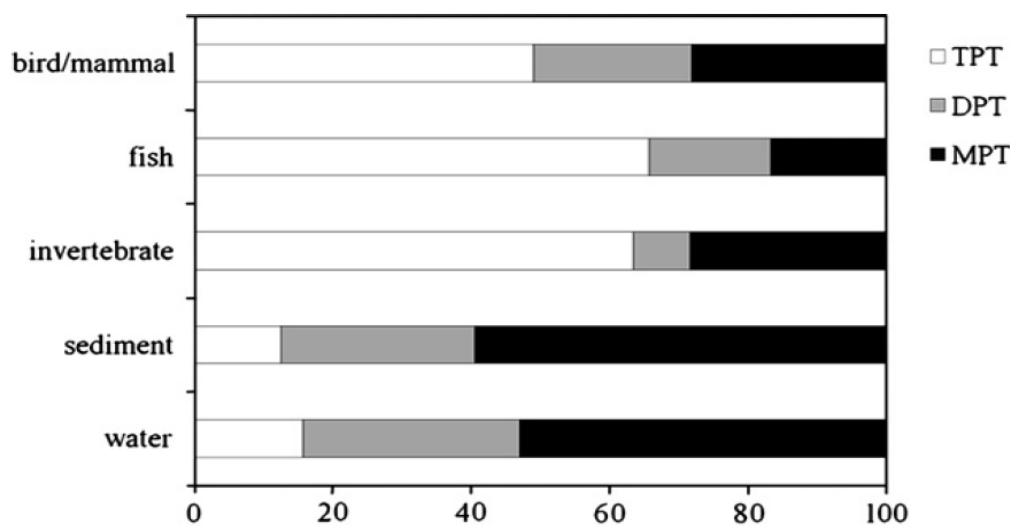


Figura 3:
 Percentual de TPT do

total de compostos fenilestênicos em componentes do ambiente marinho e costeiro. DPT (difenilestanho); MPT (monofenilestanho) (YI *et al.*, 2012).

A absorção de OTs por microorganismos é principalmente através da adsorção de porções orgânicas de OTs sobre a superfície celular (AVERY *et al.*, 1993). Compostos triorganoestênicos, como TBT e TPT, exercem as suas toxicidades através da interação com lípidos de membrana, desregulando assim a respiração e a fotossíntese de algas (MOONEY E PATCHING, 1995). A toxicidade de OTs está relacionada com a área superficial total de microorganismos, como nas algas unicelulares, e a solubilidade lipídica de produtos químicos a base de OT (COONEY E WUERTZ, 1989).

O TPT pode passar pela membrana celular e interagir com diferentes enzimas intracelulares, como por exemplo, com a aromatase, a qual promove inibição por supressão do gene CYP 19, e a glutationa-S-transferase, os quais estão ambos envolvidos na biotransformação de xenobióticos. Mas o TPT pode inibir a sua

expressão, conduzindo assim a uma disfunção do sistema de detoxificação (GEORGE & BUCHANAN, 1990). Além disso, o TPT aumenta o armazenamento de cálcio intracelular ao retardar a mobilização de cálcio, o que por sua vez provoca hiperpolarização das membranas celulares (MIURA & MATSUI, 1991). O mecanismo de toxicidade da TPT não está totalmente esclarecido. Foi relatada uma variedade de efeitos sobre mamíferos, incluindo inibição da fosforilação oxidativa, interrupção da síntese e degradação de esteroides sexuais, neurotoxicidade e imunotoxicidade (KOTAKE, 2012).

1.2.1. TOXICIDADE REPRODUTIVA DO TRIFENILESTANHO

A toxicidade reprodutiva do TPT foi relatada em diversas espécies. A exposição do caracol partenogênico *Potamopyrgus antipodarum* ao TPT levou a uma redução acentuada na reprodução em concentrações de 0,5 mg TPT/kg (Duft *et al.*, 2003). Em anfíbios da espécie *Xenopus tropicalis*, foi verificado que o TPT induz múltiplas malformações no desenvolvimento embrionário, incluindo alargamento do proctodeo e aletas estreitas. Segundo o trabalho de Yuan *et al.* (2011), os estádios de desenvolvimento de *X. tropicalis* são sensíveis a TPT, visto que este atua de diferentes modos de ação para induzir teratogenicidade em embriões de anfíbios.

Estudos relataram que algumas espécies de invertebrados aquáticos do sexo feminino, sofreram o chamado imposex, uma indução anormal das características do sexo masculino, por influência da exposição ao TPT (HORIGUCHI *et al.*, 1997; SCHULTE-OEHLMANN *et al.*, 2000; LYSSIMACHOU *et al.*, 2009). O potencial androgênico do TPT em moluscos está ligado à inibição da atividade da aromatase, ou seja, ao bloqueio da transformação da testosterona em estradiol, o que em caramujos

femininos leva ao desenvolvimento de um pseudopenis, um fenômeno conhecido como imposex (HORIGUCHI *et al.*, 1997; SCHULTE-OEHLMANN *et al.*, 2000; LYSSIMACHOU *et al.*, 2009).

Esta desregulação endócrina ambiental induzida por TPT também foi descrita em peixes e mamíferos, cujo principal mecanismo atribuído pelos autores foi a inibição da enzima aromatase (HORIGUCHI, 2006; HOBLER *et al.*, 2010). O TPT age como um inibidor competitivo da aromatase, uma enzima do grupo do citocromo P450 que está envolvida no processo de produção do hormônio estradiol (MENG *et al.*, 2009; FITAS *et al.*, 2014). Em virtude dessa ação competitiva do TPT, acredita-se que elevadas concentrações de andrógenos não-convertidos possam resultar na ocorrência de alterações fisiológicas, como feedback negativo sobre a síntese e liberação de LH, e assim comprometer a capacidade reprodutiva de espécies expostas (HORIGUCHI, 2006).

A exposição ao TPT pode causar impacto reprodutivo negativo, reduzindo a fertilidade e afetando gravemente a espermatogênese em ratos (CHAUHAN & AGARWAL, 2009; SNOW & HAYS, 1983). Ainda há muitos relatos dos efeitos biológicos dos OTs, como o TPT, incluindo uma ampla gama de efeitos tóxicos e como potentes desreguladores endócrinos. Segundo a revisão realizada por SEKIZAWA (1999), o TPT interfere na reprodução de ratos em doses maiores que 4,8 mg TPT/kg/dia, promovendo um aumento na incidência de tumores de células de Leydig do testículo. Já em camundongos expostos a dose de TPT de 3,75 mg/kg/dia, foi evidenciado que a exposição *in utero* ao TPT durante todo o processo de organogênese (do dia 6 ao dia 17 de gestação) induziu efeito teratogênico, causando o aumento de malformações severas, como presença de fenda palatina e alterações morfológicas em

órgãos sexuais. Contudo, a dose administrada não produziu efeitos tóxicos para o organismo materno, apontando determinada seletividade dos efeitos adversos sobre o desenvolvimento embrionário (SARPA *et al.*, 2007).

No estudo realizado por Grote *et al.* (2004) foi observado que ratos machos expostos durante a puberdade a dose de 2 mg/kg/dia de TPT não apresentaram alterações hormonais relevantes. Contudo, doses iguais ou superiores a 6 mg/kg/dia de TPT, promoveram uma diminuição significativa na concentração de testosterona. De acordo com os autores o TPT pode ser capaz de desbalancear o equilíbrio andrógeno-estrógeno, que está sujeito à regulação neuro-hormonal e o desequilíbrio em qualquer nível do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal durante períodos críticos do desenvolvimento pode levar a alterações permanentes nos receptores teciduais para esses hormônios.

Na ANVISA, o hidróxido de trifenilestanho está registrado sob o nome comercial de Mertin 400 (F59) e regularizado para uso em lavouras de algodão e feijão, sendo seu uso expressamente proibido em lavouras irrigadas em virtude do ser altamente tóxico para organismos aquáticos (ANVISA, 2004). Contudo, segundo fiscais da SEAPA (Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação), denúncias sobre o uso indevido do Mertin 400 vem ocorrendo pelo menos desde 2013, onde em novembro do mesmo ano pelo menos 30 produtores em cidades como Agudo, Restinga Seca, Dona Francisca, Faxinal do Soturno, São João do Polênise, Santa Maria e Paraíso do Sul faziam uso em lavouras de arroz irrigado. Cabe ressaltar que o Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor de arroz irrigado do Brasil, o que remete uma atenção especial ao uso do produto na região. O Ministério Público em ação civil pública ajuizada pela Promotoria de Justiça de Defesa do Meio Ambiente de Porto Alegre, determinou em março de 2017

multa de R\$ 1 milhão mensais quando o produto Mertin 400 for encontrado em lavoura de arroz irrigado, independentemente da quantidade de unidades produtoras, em fiscalização a ser realizada pelos técnicos da SEAPA, com auxílio de outros órgãos ambientais. Na denúncia, o MP alerta para o fato do pesticida ser altamente persistente no meio ambiente, bioconcentrável em peixes e altamente tóxico para organismos aquáticos, além do risco de contaminação do lençol freático e da bacia hidrográfica do Rio Jacuí, para onde escoam as águas utilizadas nas lavouras (MPRS, 2017).

O TPT, por se tratar de um produto tóxico, de classificação toxicológica Classe II de potencial tóxico ao ambiente (ANVISA, 2004), deve-se ter a preocupação sobre a exposição a este composto, sobretudo diante dos relatos de seu impacto ambiental. Deste modo, espécies que habitam regiões suscetíveis, como lavouras, merecem especial atenção aos riscos à esta exposição, visto que podem estar expostos de diversas formas, uma vez que durante a pulverização podem ser expostas a altos níveis deste pesticida tanto oralmente, como por inalação ou absorção dérmica. Sendo assim, espécies nativas de regiões que apresentam um alto desenvolvimento da produção agrícola e do polo naval, como a região de Rio Grande, encontram-se expostas a vários desafios químicos que podem vir interferir em sua reprodução. Dentre estas temos a espécie *Calomys laucha* que normalmente habitam regiões de pastagens, áreas agrícolas, margens de estrada, proximidades de campos de cultivo de cereais (MILLS *et al.*, 1992) e de dunas costeiras (COLARES, 1997), além de se alimentar e construir ninhos para a reprodução frequentemente encontrados próximos a lavouras. Deste modo, por habitar regiões próximas a zona portuária e áreas agrícolas, torna-se relevante a realização de estudos que avaliem o impacto da exposição ao TPT nesta espécie.

2. HIPÓTESES

- O trifenilestanho pode ser excretado através do leite materno, em fêmeas da espécie *Calomys laucha* expostas oralmente ao contaminante.
- A exposição de filhotes da espécie *Calomys laucha* ao trifenilestanho através da amamentação em fêmeas expostas oralmente ao contaminante, promove um impacto negativo em parâmetros da atividade espermática destes na vida adulta.
- Indivíduos da espécie *Calomys laucha* expostos oralmente ao TPT na fase adulta apresentam comprometimento de parâmetros da atividade espermática.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição ao TPT sobre a reprodução de *Calomys laucha*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do TPT sobre a atividade espermática de *C. laucha* expostos na fase adulta;
- Determinar o impacto sobre a atividade espermática da prole de fêmeas de *C. laucha* expostas ao TPT durante o período de amamentação;
- Analisar os parâmetros de cinética espermática da prole de fêmeas de *C. laucha* expostas ao TPT durante o período de amamentação;
- Analisar os parâmetros espermáticos estruturais da prole de fêmeas de *C. laucha* expostas ao TPT durante o período de amamentação.

4. METODOLOGIA

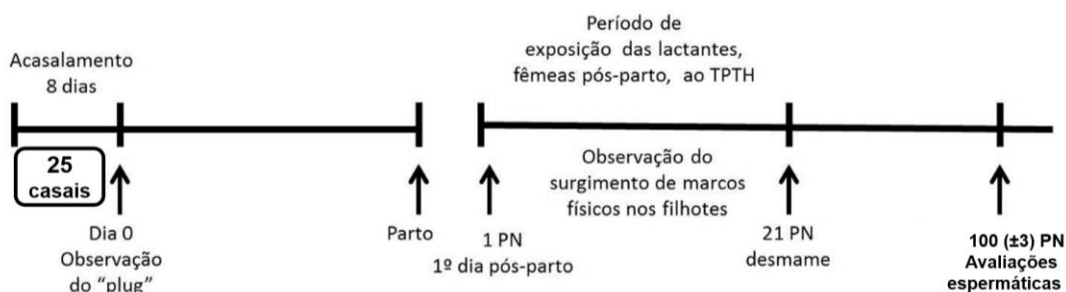
4.1. ESCOLHA DOS ANIMAIS

Foram utilizados indivíduos da espécie *Calomys laucha*, da geração F3, provenientes do biotério de animais não convencionais da Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Os animais foram mantidos em gaiolas para camundongos, em ambiente com temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. A troca da maravalha das camas era realizada semanalmente. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com normas aplicáveis e nas resoluções normativas e diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, aprovado na Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA-FURG) sob o número Pq017/2014 (Anexo 1).

4.2. EXPERIMENTOS

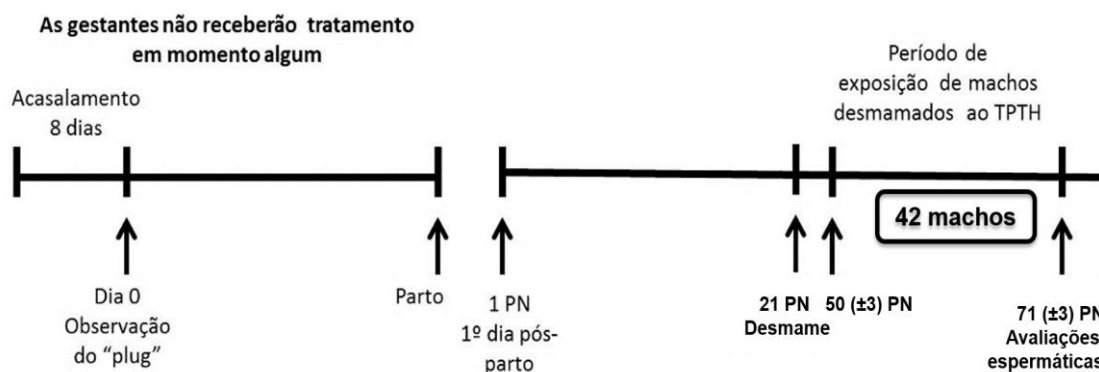
4.2.1 EXPERIMENTO 1 – Análise da exposição durante a amamentação

Neste experimento foram utilizadas 25 fêmeas parturientes que foram expostas ao TPT por gavagem do dia 1 de amamentação (1º dia PND) até o desmame (21 dias PND). Após o desmame os filhotes foram agrupados em 05 grupos de acordo com as doses de tratamento. Ao atingirem aproximadamente 100 (± 3) PND foram realizadas coletas dos epidídimos para avaliação espermática.



4.2.2. EXPERIMENTO 2 – Análise da exposição na fase adulta

Foram utilizados 42 machos não tratados, provenientes da geração F3. No dia do desmame, 21º dia PND, foram separados de suas mães e incluídos aleatoriamente a um dos 06 grupos experimentais, como descrito no item 3.3. O tratamento experimental com TPT foi realizado, mediante gavagem durante 21 dias, a partir de 50 (± 3) PND (dia pós-natal). Após o término do tratamento foram realizadas coleta dos epidídimos para avaliação espermática.



4.3. TRATAMENTO E DOSES

O tratamento consistiu na administração do hidróxido de trifenilestanho (TPTH; Sigma-Aldrich® - Inc), nas concentrações de 0; 0,5; 2,5; 5,0 e 10,0 mg TPT/kg, o qual foi diluído em carboximetilcelulose 1%, de modo a obter um volume de solução de 100 μ L por animal, que foi administrado por gavagem uma vez ao dia entre as 10 e 14 horas. A escolha pela via oral para exposição, se deu em virtude desta ser a fonte de exposição mais propícia no meio ambiente, em decorrência da espécie *Calomys laucha* habitar regiões de lavouras e se alimentar de grãos nestas.

No Exp. 1, os animais foram agrupados aleatoriamente em seis grupos (n=7): Controle água, 100 μ L de água; Controle do veículo, 100 μ L de carboximetilcelulose

1%; 0,5 mg TPT/kg de peso corporal (100 µL); 2,5 mg TPT/kg de peso corporal (100 µL); 5,0 mg TPT/kg de peso corporal (100 µL); 10,0 mg TPT/kg de peso corporal (100 µL).

Já no Exp. 2, os animais foram agrupados aleatoriamente em cinco grupos (n=5): Controle água, 100 µL de água; Controle do veículo, 100 µL de carboximetilcelulose 1%; 0,5 mg TPT/kg de peso corporal (100 µL); 2,5 mg TPT/kg de peso corporal (100 µL); 5,0 mg TPT/kg de peso corporal (100 µL).

4.4. AVALIAÇÃO DE SINAIS DE TOXICIDADE

Foram observados diariamente sinais comportamentais que pudessem remeter a indícios de intoxicação, como diminuição consumo de ração, hipoatividade na gaiola, alterações na coordenação motora, apatia, prostração, bem como o monitoramento quanto à mortalidade. Estes dados não foram quantificados, apenas permitiram determinar a interrupção ou continuação do tratamento experimental.

4.5. COLETA DE MATERIAL

Para a coleta de sêmen era realizado o deslocamento cervical em seguida a imediata remoção cirúrgica dos epidídimos, os quais eram colocados isoladamente em tubos eppendorfs com 1,5 mL do diluente BTS a 37°C, de modo a ficarem submersos. Após a coleta, os tubos eram acondicionados em caixas térmicas e conduzidos até o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel e analisados entre 1:30 e 3 horas após a coleta. O tempo de deslocamento das amostras até o

laboratório de análise, acarretou em uma redução das motilidades espermáticas, de modo que mesmo o grupo controle apresentou valores reduzidos.

4.6. ANÁLISE ESPERMÁTICA

4.6.1. ANÁLISE DA CINÉTICA ESPERMÁTICA

A análise dos parâmetros de cinética espermática foi realizada através da utilização do sistema de análise espermática computadorizada (Computer Assisted Semen Analysis – CASA), utilizando o software Sperm Vision ® (Minitube). As amostras de sêmen foram incubadas por 10 min à 37°C. Logo após, 3µl de cada amostra foram colocados em lâminas com 4 espaços para leitura das análises, que considerou para avaliação dez campos aleatórios automatizados. Os parâmetros analisados foram: Motilidade Total, Motilidade Progressiva, Distância Média Percorrida (µm), Distância Curvilínea (µm), Distância Retilínea (µm), Velocidade Média Do Percurso (µm/s), Velocidade Curvilínea (µm/s), Velocidade Retilínea (µm/s), Retilinearidade, Linearidade, Oscilação, Deslocamento Lateral de Cabeça e Frequência de Batimento Cruzado.

4.6.2. ANÁLISE DA ESTRUTURA CELULAR ESPERMÁTICA

As análises da estrutura celular espermática foram realizadas através de um citometria de fluxo (*Attune Acoustic Focusing Cytometer, Life Technologies, Aplied Biosystems™*), por meio de sondas excitadas por lasers azul (488 nm) e violeta (405 nm). Para a determinação de populações de células, debris celulares e de sujidades nas amostras, foi usado o corante Hoechst 33342, pelo tubo fotomultiplicador (PMT) VL1

(450/40 nm). Foram analisados dez mil eventos espermáticos por amostra, em uma taxa de fluxo de 200 mL/s (PETRUNKINA *et al.*, 2005). Os parâmetros analisados foram: Integridade de Membrana, Fluidez de Membrana, Funcionalidade de Mitocôndria, Reação de Acrossoma, Espécies Reativas de Oxigênio, Lipoperoxidação, Fragmentação de DNA.

Integridade de membrana

A integridade de membrana foi verificada através dos fluoróforos Sybr14 e iodeto de propídio (IP) (Minitübe, Tiefenbach, Germany). A alíquota de sêmen foi incubado por 5 min sonda fluorescente contendo 0,25 µM de Sybr14 e 7,5 µM IP conforme instruções do fabricante - Minitube. Os espermatozoides foram classificados como não lesados e com membrana funcional (Sybr + / IP-) e lesados e/ou com membrana não funcional (Sybr + / IP +; Sybr- / IP +; Sybr- / IP-) (FIGUEROA *et al.*, 2015).

Fluidez de Membrana

A verificação da fluidez de membrana utilizou 2,7 µM corante merocianina hidrofóbico 540 (M540) e 0,1 µM de YO PRO-1 (Invitrogen - Eugene, OR, EUA) em 10 µL de amostra descongelada por 5 min. Foram avaliadas células de alta fluidez (alta concentração de M540) e baixa fluidez (baixa concentração de M540), apenas para os espermatozoides íntegros (YO-PRO negativo) (FERNÁNDEZ-GAGO *et al.*, 2013). A taxa de fluidez de membrana foi calculada através do (número de espermatozoides com baixa fluidez/ número de espermatozoides com baixa fluidez + espermatozoides com alta fluidez) *100.

Funcionalidade de Mitocôndria

A funcionalidade de mitocôndria foi verificada com 3,1 μM de Rhodamina 123 (fluorescência verde), e 7,5 μM de IP em 10 μL de amostra de sêmen por 5 min. As células espermáticas foram classificadas quanto à alta funcionalidade (alta fluorescência pela acumulação de Rhodamina) e baixa funcionalidade (baixa fluorescência, baixa acumulação de Rhodamina), sendo avaliados apenas espermatozoides intactos (IP negativo) (LIU *et al.*, 2015). A taxa de funcionalidade de mitocôndria foi calculada através do (número de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial / número de espermatozoides alto potencial de membrana mitocondrial + espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial) *100.

Reação de Acrossoma

Na avaliação de integridade do Acrossoma foi utilizada a sonda lecitina *Arachishypogaea* (PNA) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA), em combinação com o IP. O FITC-PNA consegue se ligar a poros presentes na membrana acrossomal quando esta se encontra funcional ou íntegra. O IP se liga ao núcleo das células com a membrana lesionada, o que ocorre quando a membrana acrossomal se liga completamente a membrana plasmática, indicando a perda do acrossoma. A solução de trabalho continha PBS (970 μl), FITC-PNA (10 μl), IP (10 μl) e Hoechst 33342 (10 μl). Foi realizada a leitura após alíquota ser incubada por 15 minutos à 37°C. As células foram classificadas íntegras quando apresentaram fluorescência verde e lesadas com fluorescência vermelha (MARTÍNEZ-PASTOR *et al.*, 2010).

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Na avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS) utilizou-se o corante fluorescente 2'7 diacetato de diclorofluoresceína (H2DCF-DA), que é oxidado por intracelularmente na presença das ROS. A solução de trabalho continha PBS (980 µl), H2DCF-DA (10 µl) e Hoechst 33342 (10 µl). A leitura foi realizada em dois momentos: imediatamente após a alíquota de sêmen (10 µl) ser adicionada à 10 µl da solução de trabalho; e após a amostra ser incubada por 60 min à 37°C. A mediana da intensidade de fluorescência verde foi utilizada para a análise (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO *et al.*, 2011).

Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica da célula é determinada através do C11 BODIPY, um fluorescente análogo dos ácidos graxos insaturados (principais alvos das ROS). A sua coloração vermelha original permanece, se não sofrer nenhuma ação de qualquer radical. Porém, na presença de radicais livres esta sonda passa a emitir fluorescência verde. A leitura deste teste foi realizada em dois momentos: imediatamente após a alíquota de sêmen (100 µl) ser adicionada à 1 µl da solução de trabalho e a 10 µl Hoechst 33342; e após a amostra ser incubada por 120 min à 37°C. O nível de peroxidação das células foi medido pela intensidade de fluorescência vermelha ou verde emitidos (AITKEN *et al.*, 2007).

Integridade de DNA

A integridade de DNA foi avaliada pelo ensaio da estrutura de cromatina (SCSA). Para verificação desse parâmetro, 10µL de espermatozoides descongelado foi adicionado a 5µL de TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), 10µL de Triton 1X (Triton X-100, 1%) (v / v) com intervalos de 30 segundos. O corante acridina laranja é adicionado e incubado por 30 segundos, não ultrapassando o tempo de

2 minutos, para fazer a leitura. Os espermatozoides foram classificados quanto DNA íntegro (verde) e fragmentado (laranja/vermelho) (JENKINS *et al.*, 2015). A taxa de fragmentação de DNA foi calculada através do (número de espermatozoides com DNA fragmentado/número de espermatozoides DNA íntegro + espermatozoides com DNA fragmentado) *100.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Tukey HDS. Os resultados foram apresentados pela média \pm desvio padrão, o nível de significância estatística foi de 5% ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa Statistix 9.0.

5. CAPÍTULO 1

**EFFECTS OF EXPOSURE TO TRIPHENYLTIN (TPT)
CONTAMINANT ON SPERM ACTIVITY IN ADULTHOOD OF
Calomys laucha EXPOSED THROUGH BREASTFEEDING**

Manuscrito será submetido a revista:

Reproductive Toxicology

ISSN: 0890-6238

Impact Factor: 3.401

**EFFECTS OF EXPOSURE TO TRIPHENYL TIN (TPT) CONTAMINANT ON
SPERM ACTIVITY IN ADULTHOOD OF *Calomys laucha* EXPOSED
THROUGH BREASTFEEDING**

CASTRO, Tiane Ferreira de¹; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio²; SAALFELD,
Graciela Quintana¹; PIRES, Diego Martins³; PEREIRA, Jessica Ribeiro²; CORCINI,
Carine Dahl³; COLARES, Elton Pinto²

*1- Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil*

*2- Reprodução Animal Comparada- RAC, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio
Grande, Rio Grande, RS, Brasil.*

3- Reprodução Animal - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

ABSTRACT

Triphenyltin (TPT) is an organotin compound (OT), used primarily in agriculture as a fungicide, herbicide and pesticide, and has been used in the composition of antifouling paints for ships worldwide. Over the years, studies have demonstrated its effect as an endocrine disrupter in several organisms, by preventing enzymatic expression and causing reproductive toxicity. Native species of port regions and agricultural activity are susceptible to exposure to TPT, so they deserve special attention on the impacts of this exposure on their physiology, especially on the possible effects on the reproductive system. This study aimed to evaluate the effects of exposure to TPT, via breastfeeding, on reproductive physiology in the *Calomys laucha* species, verifying

its influence on sperm activity in adulthood, since this species inhabits regions prone to exposure to this contaminant. The experimental design was of 5 groups (n = 5), one water control and one vehicle control (carboxymethylcellulose 1%) and three groups with different doses of exposure to the contaminant 0.5; 2.5 and 5.0 mg TPT/kg, which females were exposed by gavage to the TPT for 20 days, from the 1st day postpartum to the 21st postnatal day (PND). After this period, the pups were housed separately and at 100 (\pm 5) PND were euthanized and the kinetics, organelles and biochemistry of the sperm were evaluated. Among the main results obtained in the evaluation of sperm kinetics, a reduction in total motility was observed in the groups of 0.5 and 5.0 mg TPT / kg, being more pronounced in the group 0.5 mg TPT / kg; in progressive motility there was a decrease in all the treated groups, but as in total motility, the group with the most exacerbated reduction was 0.5 mg TPT/kg; it was also observed the decrease in the distances and velocities traveled, rectilinearity and curvilinearity, mainly in the doses of 2.5 and 5.0 mg/kg, as well as in the oscillation. In the results obtained in the evaluation of cellular organelles, a reduction in membrane integrity was evidenced, as the doses increased; the functionality of mitochondria showed reduction in the groups of 0.5 and 5.0 mg TPT/kg; increased membrane rupture in the higher dose 2.5 and 5.0 mg TPT / kg groups; increased the acrosome reaction at doses of 0.5 and 5.0 mg TPT/kg. Based on the results obtained, we can conclude that the TPT causes alteration of the reproductive parameters, decreasing the activity and sperm quality, in individuals exposed in the breastfeeding phase, mainly regarding total and progressive motilities, membrane integrity and the functionality of mitochondria.

KEY WORDS: triphenyltin, TPT, breastfeeding, sperm activity, spermatocidal kinetics

1. INTRODUCTION

Triphenyltin (TPT) is an organotin compound (OT), used primarily in agriculture as a fungicide, herbicide and pesticide, besides has been used in the composition of antifouling paints for ships worldwide (ANTES *et al.*, 2011; FENT, 1996; YI *et al.*, 2012). Over the years, studies have demonstrated its effect as an endocrine disrupter in several organisms, by preventing enzymatic expression and causing reproductive toxicity (CHERNOFF *et al.*, 1990; DELGADO FILHO *et al.*, 2011; GROTE *et al.* (2009) HOBLER *et al.*, 2010).

Environmental endocrine disruption induced by OTs has been described in fish and mammals, whose main mechanism is attributed to the inhibition of the enzyme aromatase (HORIGUCHI, 2006; HOBLER *et al.*, 2010). TPT acts as a competitive inhibitor of aromatase, an enzyme of the cytochrome P450 group that is involved in the production process of the hormone estradiol (MENG *et al.*, 2009; FITAS *et al.*, 2014). Because of this competitive action of TPT, it is believed that high concentrations of unconverted androgens can result in the occurrence of physiological changes and compromise the reproductive capacity of exposed species (HORIGUCHI, 2006).

In the study by Grote *et al.* (2004) it was observed that male rats exposed during puberty at 2.0 mg/kg/day of TPT hydroxide had no significant hormonal changes. However, doses equal to or greater than 6.0 mg / kg / day of TPT hydroxide promoted a significant decrease in testosterone concentration. According to the authors, TPT has the ability to unbalance the androgen-estrogen relationship at any level of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis during critical periods of development and may lead to permanent changes in the tissue receptors for these hormones.

Cooke et al. (2008) performed kinetic investigations of tribulyltin (TBT) distribution and speciation, a OT similar to TPT. In this study, TBT crosses the placenta and accumulates in fetal tissues, and that during lactation the pups would receive minimal amounts of TBT through the milk and during the lactation period, but the TBT levels in the tissues of lactating pups decreased quickly. In view of the similarity between TBT and TPT, we can infer that TPT is transmitted through breast milk to offspring in a manner similar to TBT, and this leads us to question the effects of TPT on spermatogenesis when they become if adults.

Species that inhabit regions prone to TPT exposure should be the focus of studies on their impact on physiology, such as the case of the *Calomys laucha* wild species, which inhabits pasture regions, agricultural areas, near cereal fields (Mills et al., 1992) and coastal dunes (COLARES, 1997) near the region of the naval pole. In this way, *C. laucha* is susceptible to exposure to TPT and its possible physiological effects. Considering that TPT causes changes in the reproductive physiology of animals and there are few studies on the effect of TPT on reproductive activity, especially regarding exposure through breastfeeding, the present study aims to identify the effects of exposure to TPT during the period of lactation on sperm parameters in adult individuals of the *Calomys laucha* species.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMALS

Twenty-five females and five males of the *Calomys laucha* species, from the F3 generation, were obtained from the unconventional animals laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande – FURG. These were kept in cages for mice, under

controlled temperature environment ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and photoperiod of 12 hours clear and 12 hours dark. The animals received ration and water *ad libitum*, replaced weekly or when it ended. It was carried out weekly the shaving of the beds. All procedures were carried out in accordance with applicable standards and in the normative resolutions and guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation, approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-FURG) under the number Pq017 / 2014.

2.2. MATING, GESTATION AND DEVELOPMENT

Two females and one male per cage were housed for mating. After five days the male was removed from the cage and the females remained together during the gestation period. From the 18th day after the beginning of the mating, daily inspections were carried out in the cages to verify the occurrence of the birth. After delivery, the mother and pups were housed alone in a new cage identified with the experimental treatment. The first 24 hours postpartum were considered as 1 postnatal day (PND 1). The experimental treatment was performed by gavage of the parturient females, 1 day postpartum until weaning, so that the pups remained together from the mothers until weaning (21 PND).

2.3. TREATMENT AND DOSES

The experimental treatment was performed using 25 parturient females, which were treated for 20 days by gavage. The treatment of the females consisted of the administration of triphenyltin hydroxide (TPTh; Sigma-Aldrich®-Inc) diluted in carboxymethylcellulose 1% to obtain a solution volume of 100 μL per animal, which was administered by gavage once a day between 10 pm and 02 am hours.

The females with their offspring were randomly grouped into five groups (n = 5): Control water, 100 µL of water; Vehicle control, 100 µl carboxymethylcellulose 1%; 0.5; 2.5 and 5.0 mg TPT/kg body weight (100 µL).

After weaning on day 21 PND, the offspring were separated from their mothers and the offspring were separated according to the experimental group. At 100 (± 5) PND sperm counts of the male offspring were performed.

2.4. COLLECTION OF MATERIAL

For the collection of semen cervical displacement was performed following immediate surgical removal of the epididymis, which were placed in eppendorf tubes alone with 1.5 mL of the BTS diluent at 37°C so as to be submerged in the unconventional animal room of FURG. After the collection, the tubes were packed in thermal boxes and taken to the Laboratório de Reprodução Animal of the UFPel Veterinary School and all analyzes were performed in 03 hours after collection.

2.5. SPERM ANALYSIS - *Evaluations of sperm quality*

2.5.1. ANALYSIS OF SPERMATIC KINETICS

The parameters of sperm kinetics were evaluated using the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) system, using Sperm Vision ® software (Minitube). Semen samples were kept for 10 min at 37°C. Afterwards, 3µl of each sample were analyzed in spermatic chambers (Leja - Minitube / Germany), which considered for analysis ten randomized automated fields. The parameters analyzed were: TM= Total Motility (%); PM= Progressive Motility (%); DAP= Distance Average Path (µm); DCL= Distance Curved Line (µm); DSL= Distance Straight Line (µm); VAP= Velocity Average Path

($\mu\text{m/s}$); VCL= Velocity Curved Line ($\mu\text{m/s}$); VSL= Velocity Straight Line ($\mu\text{m/s}$); STR= Straightness (VSL/VAP); LIN= Linearity (VSL/VCL); WOB= Wobble (VAP/VCL); AHL= Amplitude of Lateral Head Displacement (μm); BCF= Beat Cross Frequency (Hz).

2.5.2. ANALYSIS OF SPERM CELL STRUCTURE

The evaluation of sperm cell structure parameters was performed using a flow cytometer (Attune Acoustic Focusing Cytometer, Life Technologies, Applied Biosystems™), using probes excited by blue (488 nm) and violet (405 nm) lasers. Cell populations, cell debris, and soils were verified by means of the Hoechst stain 33342, by the photomultiplier tube (PMT) VL1 (450/40 nm) (MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012). The achievement rate was 200 events / second and 20,000 spermatoc events were selected per sample. The found results were analyzed through the program Attune Cytometric Software v 2.1. (PETRUNKINA et al., 2005).

To evaluate the sperm membrane integrity was used 20 μM (final concentration) carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and 7.5 μM propidium iodide (PI). After incubation at 37° for 15 min, spermatozoa with integer membrane were stained in green, whereas those with damaged membrane were stained either in red or with simultaneous green and red fluorescence (SILVA, et al., 2016; GILLAN, et al., 2005).

Sperm membrane fluidity was analyzed using the Merocyanine 540 (2.7 μM) and YO-PRO1 marker (100 nM), after incubation of samples at 37°C for 15 min. Sperm cells with elevated membrane fluidity presented intense orange fluorescence (FERNÁNDEZ-GAGO et al., 2013). Sperm cells with reduced fluidity presented orange

weak fluorescence. Data was expressed as the percentage of spermatozoa in each category.

Mitochondrial functionality was evaluated using the Rodamin 123 marker (100nM final concentration) combined with PI (7.5 μ M), following incubation during 15 min at 37°C. Spermatozoa with high mitochondrial functionality showed intense green fluorescence and those with low mitochondrial functionality presented weak fluorescence. Data was expressed as the percentage of spermatozoa in each category (SILVA, et al., 2016).

Acrosome reaction was assessed using *Arachishypogaea* lectin conjugated with fluorescein isothiocyanate (10 μ g FITC-PNA/ml final concentration) combined with PI (7.5 μ M). Samples were evaluated after incubation at 37°C for 15 minutes. Spermatozoa having intact acrosome were unstained and those with reacted acrosome were stained with green fluorescence. On the other hand, spermatozoa with damaged acrosome were stained with red fluorescence, where as those that were both reacted and damaged were stained simultaneously with green and red fluorescence. Data was expressed as the percentage of spermatozoa with damaged acrosome/ reacted (MARTÍNEZ-PASTOR, et al., 2010).

The production of reactive oxygen species (ROS) was determined using 1mM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA), a marker for oxidative stress. Readings were done at two moments: immediately after adding a semen sample to a solution containing PBS, Hoechst 33342 and H2DCF-D; and after incubation at 37°C for 60 min. The production of ROS was determined by the median intensity of the observed green fluorescence just on viable cells (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2011).

The level of lipid peroxidation was evaluated using the C11 BODIPY fluorophore (5 μ M final concentration), originally stained in red fluorescence when there is no oxidation, but that emits green fluorescence in the presence of lipid peroxidation (AITKEN et al., 2007). Samples were evaluated after 120 min of incubation at 37°C. The results were expressed as the percent of spermatozoa with lipid peroxidation: ((median intensity of green fluorescence) / (median intensity of green fluorescence and red fluorescence) *100).

The sperm chromatin condensation Assay – SCCA was used to determinate the DNA integrity. For this, was used 10 μ L of sperm sample with 5 μ L de TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), 10 μ L of Triton 1X (Triton X-100, 1%) (v/v) with 30 seconds of intervals. After was addicted acridine orange and incubated for 30 seconds. The spermatozoa were classified in integer DNA (green) and damaged (orange/red). The SCCA was calculated through of (number of spermatozoa fragment DNA / number of spermatozoa integer DNA + spermatozoa fragment DNA) *100 (JENKINS *et al.*, 2015).

2.6. STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The differences between the groups were determined by the Tukey HDS test. The results were presented by the mean \pm standard deviation, the level of statistical significance was 5% (p <0.05). Statistical calculations were performed using the Statistix 9.0 program.

3. RESULTS

The water control and vehicle control groups were statistically similar in all analyzed parameters, except for the data of average distance traveled, linear and curvilinear, and the average traveled, linear and curvilinear velocities (Fig. 1), so that the other results will be presented comparing the treatments with the control of the vehicle.

3.1. EFFECT OF TPT EXPOSURE ON SPERMATIC KINETICS

There was reduction ($P < 0.05$) of total motility in the 5.0 mg TPT/kg group, compared to the vehicle group and the 0.5 mg TPT/kg group, reaching 80.1% lower than the other treatments. The results obtained in the analysis of progressive motility were similar, but all groups with TPT, 0.5, 2.5 and 5.0 mg TPT/kg, presented a reduction ($P < 0.05$) in relation to the vehicle group, being more marked in the group of 0.5 mg TPT/kg (82.6%) (Fig. 2).

In the evaluation of DAP and DSL, a reduction was observed in all groups treated with TPT, being statistically significant in the 2.5 and 5.0 mg TPT/kg groups. Similarly, DCL analysis revealed that all TPT treated groups also had lower values, however only the 2.5 mg TPT/kg group showed a reduction ($P < 0.05$). Regarding VAP, all groups with TPT presented a reduction ($P < 0.05$), being more pronounced in the 2.5 mg TPT/kg group. VCL and VSL presented reductions ($P < 0.05$) in the 2.5 mg TPT/kg and 2.5 and 5.0 mg TPT/kg groups, respectively (Table 1).

Regarding STR, the lowest dose group 0.5 mg TPT/kg presented higher values than the other groups ($P < 0.05$), while it was observed that the higher dose 2.5 and 5.0 mg TPT/Kg, had lower values in relation to vehicle groups and 0.5 mg TPT/kg (P

<0.05). In LIN data, they were statistically lower in the 2.5 and 5.0 mg TPT/kg groups than in the other groups. Regarding the WOB data, the 5.0 mg TPT/kg group presented a reduction ($P<0.05$) in relation to the other groups. The AHL analysis, however, showed that only the 5.0 mg TPT/kg group presented values significantly higher ($P<0.05$) than the other groups. Regarding the BCF values, only a reduction ($P<0.05$) in the 2.5 mg TPT/kg group was observed (Table 1).

3.2. EFFECT OF EXPOSURE TO TPT ON THE STRUCTURAL EVALUATION OF SPERMATOOZOA

Structural evaluation of spermatozoa evidenced a statistically reduction ($P <0.05$) in membrane integrity in all TPT groups (Fig. 3). Similarly, there was a decrease in mitochondrial functionality in the 0.5 and 5.0 mg TPT/kg groups (Fig. 4). Regarding membrane rupture, an increase in 2.5 and 5.0 mg TPT/kg groups was observed. In the analysis of the acrosome reaction the groups 0.5 and 5.0 mg TPT/kg presented the highest rate of acrosome reaction, in relation to the other groups. Membrane fluidity and DNA fragmentation data showed no significant changes (Table 2).

The analysis of ROS levels of spermatozoa showed that the groups 0.5 and 2.5 mg TPT / kg presented an increase ($P<0.05$) in relation to the other groups. Data from LPO levels showed a remarkable increase ($P<0.05$) in the 2.5 and 5.0 mg TPT / kg groups.

4. DISCUSSION

Breast milk excretion of orally administered TPT has been previously described in a study investigating the presence of TPT residues in cow's milk. In this study, ^{14}C (carbon 14) labeled TPT hydroxide (TPTh) was used, which was administered over a

period of 60 days at doses of 1.13, 5.61 and 22.44 mg TPT / kg diet dry), and observed, as regards the increase in doses, residues of 0.006, 0.034 and 0.134 mg TPT / kg of milk, relative to a transfer factor of 0.004 to 0.006 in milk (SMITH, 1981). Based on the data presented in the study by Smith (1981), who demonstrated the excretion of TPT in milk, we can infer that the changes that we evidenced in the sperm parameters of the puppies of our study are due to the transfer of TPT through milk maternal in *C. laucha*, since only lactating females received TPT by gavage.

This is the first study to evaluate the effects of exposure to TPT on sperm activity in individuals exposed during breastfeeding through breast milk of mothers who received TPT by gavage only during the breastfeeding period. The works found had periods and / or different exposure routes, such as: Grote et al. (2009) who carried out the exposure of female rats at gavage at 2.0 and 6.0 mg TPT/kg/day from the sixth day of gestation (6 GD) until weaning (21 PND) and observed that the pups showed decreases in body weight gain, testis weight and testosterone concentration, as well as a significant delay in age in preputial separation; Mello et al. (2015) exposed mouse pups to TPT (1.875, 3.75, 7.5 and 15.0 mg TPT/kg/day) through gavage during the pre-pubertal development period and puberty (15 to 45 PND); Reddy et al. (2006) carried out the exposure of mice by intraperitoneal injections of 10 and 25 µg TPT/kg/day for 5 (five) days at the end of the pre-pubertal period between 20 and 25 PND, and found a decrease in epididymal sperm count, sperm motility, sperm viability, and testosterone concentration. In addition to the differences in doses, periods and routes of exposure, we emphasize that the research objects of the cited studies were differentiated, so that they were concerned with evaluating testis weight, testosterone concentration, testis histology, sperm count and spermatids, as well as milestones in physical development.

Thus, it is evident the difference in the objects of study that we are worried to investigate, since we seek to perform evaluations of sperm activity and structure, which are more subtle parameters, but of great relevance in reproduction.

One of the most relevant parameters in sperm activity is sperm motility, which is related to fertility, and is considered determinant in the evaluation of seminal quality (COX *et al.*, 2006; VAN WEERT *et al.*, 2004; VERSTEGEN *et al.*, 2002). In our study, was showed a marked reduction in total and progressive motility. We emphasize that all analyzes were performed in 1:30 and 2 hours after collection, and this traffic time to the analysis laboratory, produced a reduction in the motilities observed even the control group.

The negative effects on sperm motility due to exposure to TPT were previously described by other authors, such as Reddy *et al.* (2006) who compared the impact of exposure to 10 and 25 µg/kg of TBT and TPT intraperitoneally on the sperm activity of rats at the end of the prepubertal period (20 to 25 PND). The authors found that levels of testicular steroidogenic enzymes, 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3beta-HSD) and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) were reduced in treated subjects. They also showed that serum testosterone levels decreased as the follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) increased in the treated animals when compared to the control group. The results suggest that TBT and TPT compromise spermatogenesis as a whole, as well as sperm motility, due to the inhibition of testosterone production. Although there are methodological differences in the studies cited, the effects observed by the authors corroborate with those evidenced in our work, however our data allow us to infer that observed effects are long lasting or even

permanent, even at the dose of 0.5 mg TPT/kg, much lower than that used in the studies of Grote et al. (2009), Mello et al. (2015), Reddy et al. (2006).

In our study, VAP values showed a reduction ($P < 0.05$) in all groups exposed to TPT, as did VSL and LIN, whose values decreased ($P < 0.05$) in the 2.5 and 5.0 mg TPT/kg doses, and the VCL and BCF, which reduced ($P < 0.05$) in the 2.5 mg TPT/kg dose group. Verstegen et al. (2002) correlated the parameters of spermatic kinetics with the fertilization rate, and observed that the values of VAP, VCL and VSL are significantly higher in sperm samples that produce more than 50% of fertilized oocytes. As well as samples with high values of these parameters of speed and of LIN and BCF present better migration and penetration in the cervical mucus (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002). Thus, based on the decrease of these kinetic parameters observed in our work, as well as the decrease of total and progressive motilities, we can observe that the exposure to TPT was detrimental to the sperm activity of *C. laucha* species.

The negative effects observed on the sperm motility of the groups exposed to the TPT seem to be closely related to the changes observed in other sperm parameters, such as membrane integrity and membrane rupture, which were quite expressive, besides mitochondrial functionality. These changes may be related to the ability of triorganotin compounds to cross the cell membrane, bind to nuclear receptors (NR), and translocate to the nucleus, forming a triorganotin-NR complex and co-activators. This complex bind to DNA response elements and induces transcription of target genes and generates alterations in the expression of some proteins, as well as mitochondrial and cellular dysfunctions, such as inhibition of ionic transport and oxidative phosphorylation (KISHTA et al., 2007; DELGADO FILHO et al., 2011; WANG et al., 2006). Delgado

Filho et al. (2011) examined exposure to triorganotin compounds (TBT and TPT) during pregnancy through the maternal placental circulation, and concluded that these accumulate in fetal tissues and may induce various changes. Although in our study the exposure was not during the gestational period, the observed data of decreased membrane integrity and mitochondrial functionality may be related to changes in the DNA response elements described by the authors. Since individuals were exposed during the prepubescent period of breastfeeding and the observed effects persisted for a long time after the end of exposure to TPT.

In our results, was observed that PTT promoted damage in the formation and structural organization of sperm cells, so that even after two spermatogenic cycles we can still observe a marked reduction in sperm membrane integrity, reaching 66.9% in the dose of 5.0 mg TPT/kg, as well as a increase in the cell membrane disruption evidenced in the groups of doses of 2.5 mg TPT / kg (69.5%) and 5.0 mg TPT / kg (62.4%) ($P < 0.05$). Such structural changes in cell membranes as a result of TPT exposure were previously described in bacteria, where it was evidenced that TPT has a hydrophobic nature, which allows to interact rapidly with lipids constituting the cell membrane, besides increasing the permeability of the cell membrane, inducing damage and even the death of some cells, besides also being able to alter the molecular organization of the membrane, (GAO et al., 2014; YE et al., 2013). Other studies have described that TPT increases the permeability of the cell membrane, which can induce damage and even the death of some cells, as well as the ability to alter the molecular organization of the membrane, triggering a spontaneous efflux of certain ions, such as Cl^- and Na^+ (BONARSKA-KUJAWA et al., 2012, GAO et al., 2014). This compromise of membrane integrity may be related to the interaction of TPT with membrane lipids,

but mainly with changes in DNA response elements, since the effects were evidenced 79 days after the end of exposure.

Our data revealed an increase in lipoperoxidation levels (LPO), observed in doses of 2.5 and 5.0 mg TPT/kg, as well as in the levels of reactive oxygen species (ROS) at doses of 0.5 and 2.5 mg TPT/kg. The oxidative damage process, by LPO, occurs mainly through the production of ROS that react with the polyunsaturated fatty acids of the phospholipids of the cell membranes. This may impair cell structure and function, causing changes in the membrane properties, increasing its permeability, eventually damaging membranes and other tissues (BERGAMINI et al., 2004). In the study by Abdollahi et al. (2004), it has been described that LPO is one of the main molecular mechanisms involved in pesticide-induced cytotoxicity, which in the case of TPT also promotes interactions with the cell membrane phospholipids (YE et al., 2013), as well as changes in DNA response elements (KISHTA, et al., 2007). This set of actions promotes changes in cellular oxidative balance. In a study by De Simplicio et al. (2000), the activities of antioxidant enzymes in livers and kidneys of rabbits and lambs submitted to chronic exposure to TPT were evaluated and a decrease in the levels of glutathione peroxidase-dependent peroxidase (Se-GPX) was observed in both species, as well as those of GPX renal rabbits and hepatic GST of lambs. These results suggest that reduced levels of important antioxidant enzymes, such as GST and GPX, make up part of the complex mechanism of toxicity of TPT. These data allow us to infer that the data evidenced in our study, related to the increase ($P < 0.05$) in LPO levels of 47.7% in the 2.5 mg TPT / kg group and 45.4% in the group 5.0 mg TPT / kg, are probably due to mechanisms of inhibition of the activity of antioxidant enzymes due to changes in DNA response elements due to exposure to TPT.

Regarding mitochondrial functionality, we observed a reduction ($P < 0.05$) in all groups treated with TPT. These changes in mitochondrial functionality may be related to modifications in DNA response elements, which promote mitochondrial and cellular dysfunctions, such as the inhibition of ionic transport and oxidative phosphorylation (KISHTA et al., 2007, DELGADO FILHO et al., 2011, WANG et al., 2006). These data are of great relevance when evaluating sperm activity, since rodent species have observed that after epididymal maturation the mitochondria of the spermatozoa are polarized, thus becoming functional, and only thus allowing *in vivo* fertilization (AITKEN et al., 2007). If this polarization does not occur due to mitochondrial dysfunctions, caused by persistent damage promoted by exposure to TPT during the period of breastfeeding, and consequently the period of development of the reproductive organs, the spermatozoon will be unable to effect fertilization. Thus, we can infer that the persistent decrease in the functionality of mitochondria observed in our study can lead to impairment of sperm activity.

We found in our study that the effects of TPT exposure on sperm activity were persistent even after two cycles of spermatogenesis, since exposure to TPT was suspended at weaning at 21 PND and was only analyzed 79 days after the end of the exposure at 100 (± 5) PND, evidencing the persistence of effects on kinetics and spermatid structure. These data differ from those found in the study by Mello et al. (2015), who verified that exposure, orally, to TPT in pups during the period from 15 to 45 PND, promoted delay in the appearance of physical developmental milestones and decrease in the number of spermatozoa and spermatids in doses 7.5 and 15.0 mg TPT/kg/day. However, the authors reported that individuals analyzed after 20 days after exposure to 65 PNDs did not show such changes, indicating that toxic effects on male

gonads were reversible upon discontinuation of treatment (MELLO et al., 2015). However, the data of Mello et al. (2015) refer to an exposure after 15 PND, while our data may be related to damages occurring between 1 and 15 PND, it is still worth mentioning that the results are referring to histological analysis, while ours sought functional analyzes of sperm activity.

It should be noted that although the doses that the pups were exposed to are very low, considering that the exposure is through breast milk, where the elimination of TPT by this route was considered extremely low in other species such as cattle (SMITH, 1981) and humans (MINO et al., 2008), are able to promote several changes in sperm activity. Thus, it is evident that the exposure to very low doses of TPT at this stage of development are extremely relevant in their reproductive physiology, since several functional and structural sperm parameters presented values corresponding to a loss in sperm activity. Among these, we can highlight the sperm motility that is considered a fundamental parameter in the evaluation of sperm activity, serving as an important tool in the selection of an ejaculate with greater fertilization efficiency, and being the most used test to predict seminal quality (COX et al., 2006, VAN WEERT et al., 2004, VERSTEGEN et al., 2002).

Considering the results obtained in our study, we can conclude that females of the species *C. laucha* can eliminate TPT in breast milk when exposed orally, and the exposure of the puppies through breastfeeding promotes negative changes in several parameters of sperm activity.

5. REFERENCES

- ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE A.
Pesticides and oxidative stress: A review. **Med. Sci. Monit.**, v.10, p.141-147, 2004.
- AITKEN, R.J.; NIXON, B.; LIN, M.; KOPPERS, A.J.; LEE, Y.H.; BAKER, M.A.
Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation.
Asian Journal of Andrology 9 554–564., 2007.
- ANTES, F. G.; KRUPP, E.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; FELDMANN, J.
Speciation and degradation of triphenyltin in typical paddy fields and its uptake into
riceplants, **Environ. Sci. Technol.** V.45, p.10524–10530, 2011.
- BERGAMINI, C. M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A.; CERVELLATI, C. Oxygen,
reactive oxygen species and tissue damage. **Curr. Pharm. Des.**, v.10, p.1611-1626,
2004.
- BONARSKA-KUJAWA, D.; KLESZCZYŃSKA, H.; PRZESTALSKI, S. The location
of organotins within the erythrocyte membrane in relation to their toxicity,
Ecotoxicol. Environ. Saf. V. 78, p. 232–238, 2012.
- CHERNOFF, N., SETZER, R. W., MILLER, D.B., ROSEN, M.B. AND ROGERS,
J.M. Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the
rat. **Teratology**, 42: 651-658, 1990.
- COLARES, E.P. Aspectos da fisiologia reprodutiva de *Calomys laucha* OLFERS, 1818
(Mammalia: Rodentia). USP – São Paulo. Tese de Doutorado. 1997.
- COOKE, G.M.; FORSYTH, D.S.; BONDY, G.S.; TACHON, R.; TAGUE, B.; COADY,
L. Organotin speciation and tissue distribution in rat dams, fetus, and neonates
following oral administration of tributyltin chloride. **J. Toxicol. Environ. Health A.**

v. 71, n.6, p.384–395, 2008.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.

Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p.860-867, 2006.

DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P.F.I.; PODRATZ P. L.; GRACEL J. B. Triorganotin

as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Braz J Med Biol Res**, v. 44(9), p. 958-965, 2011.

DE SIMPLICIO, P.; DACASTO, P.; CARLETTI, M.; GIANNERINI, F.; NEBBIA, C.

Changes in hepatic and renal glutathione-dependent enzyme activities in rabbits and lambs subchronically treated with triphenyltin acetate. **Vet Hum Toxicol**. v. 42, n.3, p.159-62, 2000.

FAO Pesticide residues in food — 1991. Evaluations, Part I — Residues. Rome, **Food**

and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 337–371 (FAO Plant Production and Protection Paper 113/1), 1991.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**,

p.26, p.1-117, 1996.

FITAS, A.L.; AMARAL, D.; LOPES, L. Aromatase inhibitors in male adolescents with

idiopathic short stature. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, V9 (1), p. 53-58, 2014.

GAO, J.; YE, J.; MA, J.; TANG, L.; HUANG, J. Biosorption and biodegradation of

triphenyltin by *Stenotrophomonas maltophilia* and their influence on cellular metabolism. **Journal of Hazardous Materials**. v. 276, p. 112–119, 2014.

- GROTE, K.; STAHLSCHMIDT, B.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology** 202, 145–158, 2004.
- GROTE, K.; HOBLER, C.; ANDRADE, A.J.; GRANDE, S.W.; GERICKE, C.; TALSNESS, C.E. APPEL, K.E; CHAHOUD, I. Sex differences in effects on sexual development in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride, **Toxicology**, v. 260, n.1-3, p. 53-59, 2009.
- HOBLER, C.; ANDRADE, A.J.M.; GRANDE, S.W.; GERICKE, C; TALSNESS, C.E.; APPEL, K.E.; CHAHOUD, I.; GROTE, K. Sex-dependent aromatase activity in rat offspring afterpre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride. **Toxicology**. v. 276, p. 198–205, 2010.
- HORIGUCHI, T. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. **Environ. Sci.** 13(2), 77–87, 2006.
- KISHTA, O.; ADEEKO, A.; LI D.; LUU, T.; BRAWER, J.R.; MORALES, C. In utero exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. **Reprod Toxicol**, v. 23 p. 1-11. 40, 2007.
- MELLO, M.S.C.; DELGADO, I.F.; FAVORETO, A.O.A.; LOPES, C.M.T.; BATISTA, M.M.; KEMPINAS, W.D.G.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Sexual maturation and fertility of mice exposed totriphenyltin during prepubertal and pubertal periods. **Toxicology Reports**, v.2, p. 405-414, 2015.

- MENG, P.J.; LIN, J.; LIU, L.L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **J Environ Manage**; 90 (Suppl 1): S8-S15, 2009.
- MILLS, J.N.; ELLIS, B.A.; CHILDS, J.E.; MAIZTEGUI, J.L.; CASTRO-VASQUEZ, A. Seasonal changes in mass and reproductive condition of the corn mouse (*Calomys musculus*) on the Argentine pampa. **J. Mammal**; v.73, p. 876-884, 1992.
- MINO, Y.; AMANO, F.; YOSHIOKA, T.; KONISHI, Y. Determination of Organotins in Human Breast Milk by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. **Journal of Health Science**, v. 54, n. 2, p. 224-228, 2008.
- MORTIMER, S.T. CASA- Practical aspects. **J Androl**, p.515-524, 2000.
- PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; BRANDT, H.; TOPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. **Theriogenology**. v. 64 p. 1766–1782, 2005.
- REDDY, P. S.; PUSHPALATHA, T.; SREENIVASUL, A.; REDDY, P. Reduction of spermatogenesis and steroidogenesis in mice after fentin and fenbutatin administration. **Toxicology Letters**. V. 166, Iss 1, p. 53-59, 2006.
- SMITH, K.S. 14-C-TPTH residue levels in milk and tissues of lactating dairy cows. Cannon Laboratories, USA. **Report Project** of 7489, 1981. [cited in FAO, 1991].
- VAN WEERT, J.M.; REPPING, S.; VAN VOORHIS, B.J.; VAN DER VEEN, F.; BOSSUYT, P.M.; MOL, B.W. Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis. **Fertil Steril.**; v. 11, p. 612–620, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

WANG, B.A.; LI, M.; MU, Y.M.; LU, Z.H.; LI, J. Y. Effects of tributyltin chloride (TBT) and triphenyltin chloride (TPT) on rat testicular Leydig cells. **Zhonghua Nan Ke Xue - National Journal of Andrology**, v. 12, p. 516- 519, 2006.

YE, J.S.; YIN, H.; PENG, H.; BAI, J. Q.; XIE, D.P.; WANG, L.L. Biosorption and biodegradation of triphenyltin by *Brevibacillus brevis*, **Bioresour. Technol.** V. 129, p. 236–241, 2013.

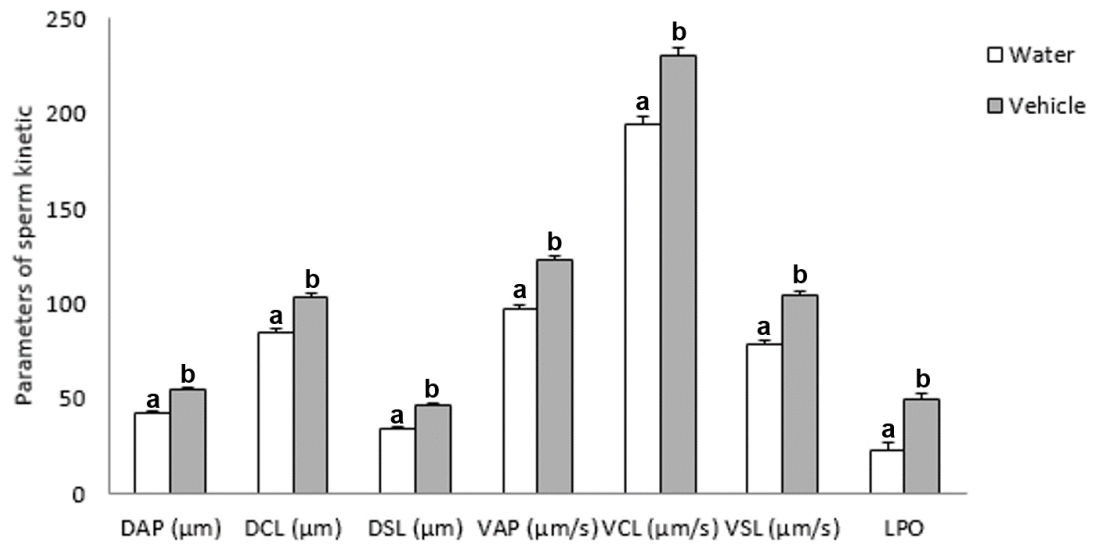


Figure 1: Comparison between values in DAP (Distance Average Path), DCL (Distance Curved Line), DSL (Distance Straight Line), VAP (Velocity Average Path), VCL (Velocity Curved Line), VSL (Velocity Straight Line), LPO (lipid peroxidation) in to the groups water and Vehicle. Values followed by different letters indicate significant differences among the storage moments ($P < 0.05$).

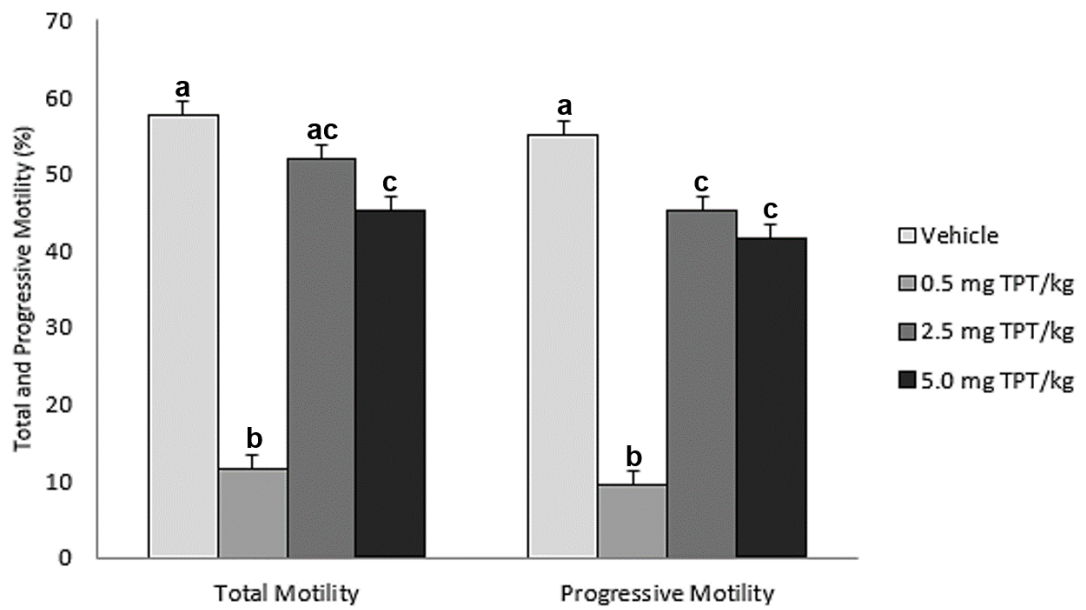


Figure 2: Graphical demonstration of the parameters of total and progressive motility between the experimental groups, evidencing the reduction according to the increase of doses of TPT. Values followed by different letters indicate significant differences between the storage moments ($P < 0.05$).

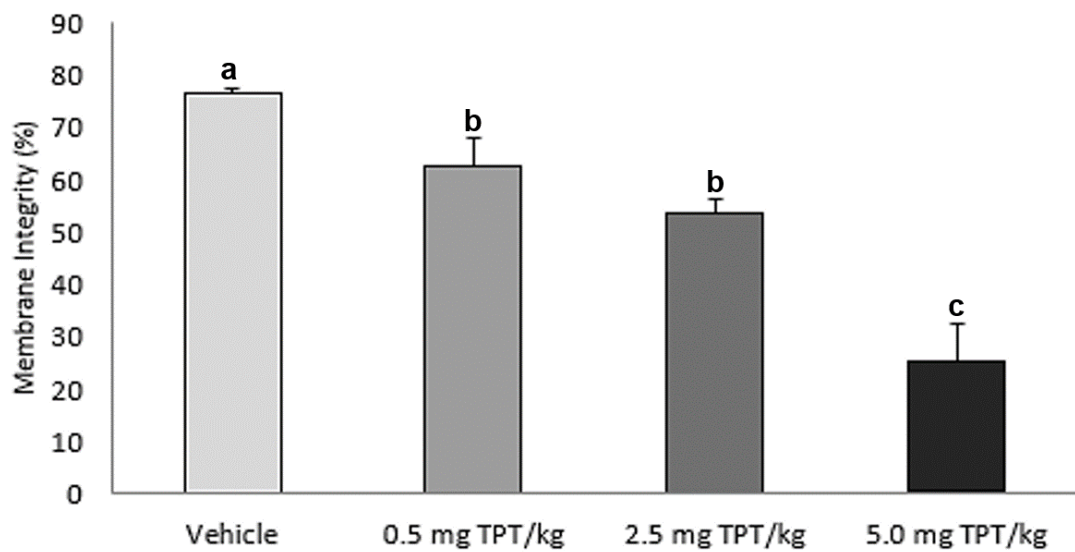


Figure 3: Graphical demonstration of the membrane integrity of the experimental groups, evidencing the decrease of the same according to the increase of the doses of TPT. Values followed by different letters indicate significant differences between the storage moments ($P < 0.05$).

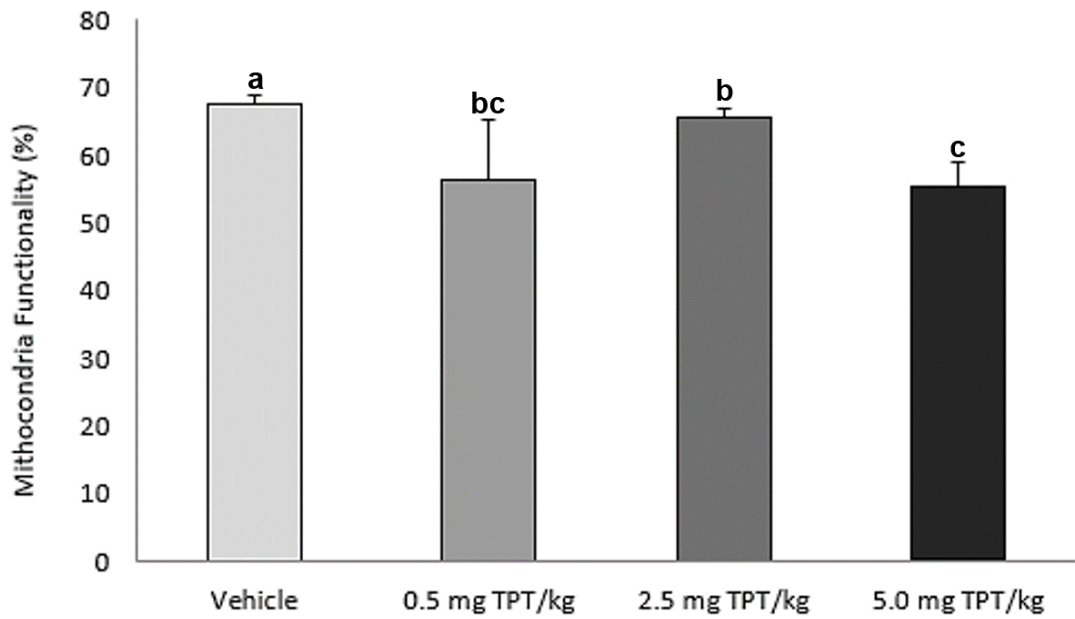


Figure 4: Graphic evidenced the decrease in mitochondrial functionality between the experimental groups, being significant in the groups 0.5 and 5.0 mg TPT / kg ($P < 0.05$). Values followed by different letters indicate significant differences between the storage moments ($P < 0.05$).

Table 1: Mean values and standard deviation of the sperm kinetic parameters obtained after computerized analysis of the spermatic movement of *C. laucha* exposed through breastfeeding to the TPT from the 1st to the 21st PND, and evaluated with 100 (\pm 5) PND.

Sperm Kinematics	Vehicle	0.5 mg TPT/kg	2.5 mg TPT/kg	5.0 mg TPT/kg
DAP	54.95 \pm 1.7 ^a	51.54 \pm 2.5 ^a	39.44 \pm 1.3 ^b	45.42 \pm 1.7 ^c
DCL	103.25 \pm 2.9 ^a	96.03 \pm 4.1 ^a	79.44 \pm 2.5 ^b	99.60 \pm 3.6 ^a
DSL	46.61 \pm 1.9 ^a	45.76 \pm 2.6 ^a	30.82 \pm 1.2 ^b	35.46 \pm 1.7 ^b
VAP	123.35 \pm 3.9 ^a	110.87 \pm 5.6 ^b	88.95 \pm 3.2 ^c	99.83 \pm 3.8 ^{bc}
VCL	230.35 \pm 6.4 ^a	207.01 \pm 9.2 ^{ab}	178.72 \pm 6.1 ^b	218.16 \pm 8.0 ^a
VSL	104.85 \pm 4.4 ^a	98.32 \pm 5.7 ^a	69.52 \pm 2.8 ^b	77.97 \pm 3.8 ^b
STR	0.83 \pm 0.01 ^a	0.87 \pm 0.01 ^b	0.77 \pm 0.01 ^c	0.77 \pm 0.01 ^c
LIN	0.46 \pm 0.02 ^a	0.47 \pm 0.02 ^a	0.38 \pm 0.01 ^b	0.35 \pm 0.01 ^b
WOB	0.54 \pm 0.02 ^a	0.53 \pm 0.02 ^a	0.49 \pm 0.004 ^{ab}	0.45 \pm 0.01 ^b
AHL	4.19 \pm 0.08 ^a	4.06 \pm 0.2 ^a	4.03 \pm 0.1 ^a	4.46 \pm 0.07 ^b
BCF	42.25 \pm 0.9 ^a	43.32 \pm 1.4 ^a	40.21 \pm 0.5 ^b	41.21 \pm 0.8 ^{ab}

TM= Total Motility (%); PM= Progressive Motility (%); DAP= Distance Average Path (μ m); DCL= Distance Curved Line (μ m); DSL= Distance Straight Line (μ m); VAP= Velocity Average Path (μ m/s); VCL= Velocity Curved Line (μ m/s); VSL= Velocity Straight Line (μ m/s); STR= Straightness (VSL/VAP); LIN= Linearity (VSL/VCL); WOB= Wobble (VAP/VCL); AHL= Amplitude of Lateral Head Displacement (μ m); BCF= Beat Cross Frequency (Hz).

Values followed by different letters indicate significant differences among the storage moments ($P < 0.05$).

Table 2: Mean values and standard deviation of the parameters obtained in flow cytometry from the sperm evaluation of *C. laucha* exposed to TPT from 1 to 21 PND and evaluated with 100 (± 5) PND.

Sperm Structure	Vehicle	0.5 mg TPT/kg	2.5 mg TPT/kg	5.0 mg TPT/kg
Membrane Fluidity	17.42 \pm 1.7 ^a	23.67 \pm 3.1 ^a	19.87 \pm 2.6 ^a	20.77 \pm 3.1 ^a
Membrane Rupture	19.83 \pm 2.9 ^a	17.27 \pm 0.4 ^a	33.62 \pm 0.7 ^b	32.20 \pm 0.9 ^b
SCCA	2.22 \pm 0.1 ^a	2.50 \pm 0.4 ^a	2.18 \pm 0.03 ^a	2.52 \pm 0.2 ^a
Acrosome Reaction	45.42 \pm 2.6 ^a	62.67 \pm 0.7 ^b	47.98 \pm 3.2 ^{ac}	55.46 \pm 1.1 ^{bc}
ROS	808 \pm 47 ^a	2254 \pm 1036 ^b	1791 \pm 514 ^b	757 \pm 111 ^a
LPO	49.37 \pm 3.9 ^a	32.19 \pm 3.4 ^a	72.94 \pm 8.1 ^b	71.79 \pm 2.3 ^b

SCCA= Sperm Chromatin Condensation Assay; ROS= Reactive Oxygen Species; LPO= Lipid peroxidation

Values followed by different letters indicate significant differences among the storage moments (P < 0.05).

6. CAPÍTULO 2

**TRIPHENYLTIN (TPT) ALTERS SPERMATIC PARAMETERS
OF *Calomys laucha***

Manuscrito será submetido a revista:

Theriogenology

ISSN: 0093-691X

Impact Factor: 2.056

TRIPHENYLTIN (TPT) ALTERS SPERMATIC PARAMETERS OF
Calomys laucha

CASTRO, Tiane Ferreira de¹; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio²; CORCINI, Carine
Dahl³; SAALFELD, Graciela Quintana¹; PIRES, Diego Martins³; PEREIRA, Jessica
Ribeiro²; COLARES, Elton Pinto²

*1- Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil*

*2- Reprodução Animal Comparada- RAC, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio
Grande, Rio Grande, RS, Brasil.*

3- Reprodução Animal - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the influence of triphenyltin (TPT) exposure on reproductive physiology in the *Calomys laucha* species, verifying the effects on sperm activity in adulthood, since this species inhabits regions susceptible to exposure to this contaminant. The experimental design was of 6 groups (n = 7), one water control and one vehicle control (carboxymethylcellulose 1%) and four groups with different doses of exposure to the contaminant 0.5; 2.5; 5.0 and 10.0 mg TPT/kg. The individuals were exposed by gavage to the TPT for 21 days, from the 50° (± 3) to the 71° (± 3) day of life, after this period they were euthanized and the sperm activity was evaluated through the use of the computerized sperm analysis system Computer Assisted Semen

Analysis – CASA) and a flow cytometer. The animals exposed to the highest dose (10.0 mg/kg) presented signs of severe intoxication in only 7 (seven) days of exposure, demonstrating a higher sensitivity of this species to this contaminant, although other studies used higher doses. The 10.0 mg TPT/kg dose was analyzed separately for short-term exposure and the results suggest that exposure at this dose was severely detrimental to sperm activity. Among the main results obtained in the evaluation of sperm kinetics, a reduction in total motility was observed from the 0.5 mg TPT/kg group, which was accentuated according to the increase in the doses of TPT; in progressive motility, there was a decrease from the dose of 0.5 mg TPT/kg and maintained the plateau until the dose of 5.0 mg TPT/kg; it was also observed an increase in the distances and velocities average path, rectilinear and curvilinear in doses of 2.5 and 5.0 mg/kg. In the data obtained in the flow cytometry evaluation, a decrease in mitochondrial functionality was observed, as the dose increased, as well as an increase in membrane fluidity from the 5.0 mg TPT/kg dose, the acrosome reaction presented higher values at doses of 0.5 and 5.0 mg TPT/kg. Based on the results obtained, we can conclude that the TPT causes impairment of the sperm activity, reducing in individuals exposed in the adult phase, mainly with regard to total and progressive motilities and mitochondrial functionality.

Keywords: triphenyltin, TPT, sperm activity, spermatid kinetics, spermatid motility, mitochondrial function.

1. INTRODUCTION

Organotin compounds (OTs), used on a large scale, are present in various chemical agents widely used in agriculture and industry in general. These compounds

have been introduced into the environment since 1960 and are currently detected in coastal environments around the world, especially in Asian countries and high port activity regions (SHAM et al., 2015; YI et al., 2014). Triphenyltin (TPT) is an OT, mainly used in agriculture as a fungicide in potato, coffee, bean and rice crops, as well as being used as a biocide, wood preservatives and disinfection agents in the circulation of industrial refrigeration water, as well as in anti-fouling paints for ships (FENT, 1996; YI et al., 2012).

Studies have shown that TPT causes serious environmental impact as well as in animal physiology. Exposure to TPT in animals can occur through ingestion of contaminated food and water, inhalation of contaminated air, and skin contact during application of the product to crops. Some areas are subject to increased risk due to geographic reasons, such as port and agricultural regions (FENT, 1996; NASH et al., 2004, MELLO et al., 2015). The TPT can be removed from the environment by biodegradation (STASINAKIS et al., 2005), photolysis (PALM et al., 2003), biological-absorption (YAMADA & TAKAYANAGI, 1992), sedimentation and flow (DÍEZ et al., 2005). However, the long half-life of TPT, which may vary from weeks to years, allows it to remain in the environment for long periods, making exposure of several species to this contaminant susceptible (YE et al., 2013). The most important exposure ways, may be through oral, dermal and inhalation routes (EPA, 1999).

Because it is a substance that can act as an endocrine disruptor, TPT is harmful to several organisms with a wide range of toxicological properties, seriously disrupting the endocrine system, preventing enzymatic expression and causing reproductive toxicity (HOBLER et al., 2010). Exposure to TPT can cause negative reproductive impact, reducing fertility and severely affecting spermatogenesis in rats (CHAUHAN &

AGARWAL, 2009; SNOW & HAYS, 1983). There are still many reports of the biological effects of OTs, such as TPT, including a wide range of toxic effects and potent endocrine disrupters. TPT acts as a competitive inhibitor of aromatase, an enzyme of the cytochrome P450 group that is involved in the production process of the hormone estradiol (MATTHIESSEN & GIBBS, 1998; MENG et al., 2009; FITAS et al., 2014). Because of this competitive action of TPT, it is believed that high concentrations of unconverted androgens can result in the occurrence of physiological changes and compromise the reproductive capacity of exposed species (HORIGUCHI, 2006).

Due to the marked toxicity and the property of endocrine disruption of TPT, they raise concerns about the impact of its use on the environment and on animal reproductive health (HOBLER et al., 2010; MELLO et al., 2015). In this context, species that inhabit regions susceptible to TPT exposure deserve special attention, such as the *Calomys laucha* species. This species normally inhabits pasture regions, agricultural areas, road margins, near cereal fields (MILLS et al., 1992) and coastal dunes (COLARES, 1997) near the region of the naval pole, being exposed to several Chemical challenges that may interfere with its reproduction. Considering that there are few studies on the effect of TPT on reproductive activity, and no one considered effects on sperm structure and movement, this study aims to identify the effects of TPT exposure on sperm activity in adult *Calomys laucha* species.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMALS

Forty-two male *Calomys laucha*, of the F3 generation, were obtained from the unconventional animals laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

The animals were kept in mouse cages. The environment had a controlled temperature ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark. The animals received ration and water ad libitum, replaced weekly or when it ended. The shaving of the beds was carried out weekly. All procedures were carried out in accordance with applicable standards and in the normative resolutions and guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation, approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-FURG) under the number Pq017 / 2014.

2.2. TREATMENT AND DOSES

The experimental treatment was performed using 42 males, from 50 (± 3) PND (postnatal day). These were treated for 21 days by gavage. The treatment consisted of the administration of triphenyltin hydroxide (TPTh; Sigma-Aldrich®-Inc) at concentrations of 0; 0.5; 2.5; 5.0 and 10.0 mg TPT/kg, which was diluted in carboxymethylcellulose 1% to obtain a solution volume of 100 μL per animal, which was administered once a day between 10 am and 02 pm.

The animals were randomly grouped into six groups ($n = 7$): Control water, 100 μL water; Vehicle control, 100 μL carboxymethylcellulose 1%; 0.5; 2.5; 5.0 and 10.0 mg TPT/kg body weight (100 μL).

2.3. ASSESSMENT OF SIGNS OF TOXICITY

Behavioral signs that could refer to signs of intoxication, such as decreased feed intake, hypoactivity in the cage, changes in motor coordination, apathy, prostration, as well as mortality monitoring were observed daily. These data were not quantified, only allowed to determine the interruption or continuation of the experimental treatment.

2.4. COLLECTION OF MATERIAL

For the collection of semen, the cervical displacement was performed after immediate surgical removal of the epididymis, which were placed in eppendorf tubes alone with 1.5 mL of the BTS diluent at 37°C, in order to be submerged. After the collection, the tubes were packed in thermal boxes and taken to the Laboratório de Reprodução Animal of the UFPel of the UFPel Veterinary School and analyzed within 3 hours after collection.

2.5. SPERM ANALYSIS - *Evaluations of sperm quality*

2.5.1. ANALYSIS OF SPERMATIC KINETICS

Sperm motion parameters were evaluated through a computer assisted semen analyses system (SpermVision®3.5, Minitube, Tiefenbach, Germany) at 200 X in a phase contrast microscope (Axio Scope A1®, Zeiss, Germany). Samples were incubated at 37°C for 10 min and diluted to reach from 100-150 spermatozoa per field, in six automated randomized fields. The parameters evaluated were: total and progressive motility; distance average path (DAP); distance in a curved line (DCL); distance in a straight line (DSL); velocity average path (VAP); velocity in a curved line (VCL); velocity in a straight line (VSL); straightness (STR); linearity (LIN); wobble (WOB); amplitude of lateral head displacement (ALH); and beat cross frequency (BCF).

2.5.2. ANALYSIS OF SPERM CELL STRUCTURE

Flow cytometry analyzes were performed using the Acoustic Focusing Cytometer (Attune®, California, USA), equipped with blue (488 nm) and violet (405 nm) lasers.

The non-sperm events were removed from the analysis by FSC X SSC scatter plots (PETRUNKINA et al., 2005) and then discarded based on the fluorescence of Hoechst 33342 (H33342, 14533, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and the negative events for H33342 discarded (debris) (MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012). In these cases, the samples were exposed to H33342 at the final concentration of 2 mM, 5 minutes before each analysis, and the events for this fluorochrome were detected with photomultiplier (Photomultiplier - PMT) VL1 (450/40 filter); except in the fragmentation of DNA that was not used H33342. Green, orange and red fluorescence were read with BLT (filter 530/30), BL2 (filter 575/24) and BL3 (filter > 640) PMTs respectively. The flow stability of the cytometer was tested daily using standard beads (Invitrogen). The acquisition rate was 200 events / second and 20,000 spermatoc events were selected per sample. The results obtained were analyzed through the program Attune Cytometric Software v 2.1.

Sperm membrane integrity was evaluated using 20 μ M (final concentration) carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and 7.5 μ M propidium iodide (PI). After incubation at 37° for 15 min, spermatozoa with integer membrane were stained in green, whereas those with damaged membrane were stained either in red or with simultaneous green and red fluorescence (SILVA, et al., 2016; GILLAN, et al., 2005).

Sperm membrane fluidity was evaluated using the Merocyanine 540 (2.7 μ M) and YO-PRO1 marker (100 nM), after incubation of samples at 37°C for 15 min. Sperm cells with high membrane fluidity presented intense orange fluorescence (FERNÁNDEZ-GAGO et al., 2013). Sperm cells with reduced fluidity presented orange weak fluorescence. Data was expressed as the percentage of spermatozoa in each category.

Mitochondrial functionality was evaluated using the Rodamin 123 marker (100nM final concentration) combined with PI (7.5 μ M), following incubation during 15 min at 37°C. Spermatozoa with elevated mitochondrial functionality showed intense green fluorescence and those with low mitochondrial functionality presented weak fluorescence. Data was expressed as the percentage of spermatozoa in each category (SILVA, et al., 2016).

Acrosome membrane integrity status was assessed using *Arachishypogaea* lectin conjugated with fluorescein isothiocyanate (10 μ g FITC-PNA/ml final concentration) combined with PI (7.5 μ M). Samples were evaluated after incubation at 37°C for 15 minutes. Spermatozoa having intact acrosome were unstained and those with reacted acrosome were stained with green fluorescence. On the other hand, spermatozoa with damaged acrosome were stained with red fluorescence, where as those that were both reacted and damaged were stained simultaneously with green and red fluorescence. Data was expressed as the percentage of spermatozoa with damaged acrosome/ reacted (MARTÍNEZ-PASTOR, et al., 2010).

The production of reactive oxygen species (ROS) was determined using 1mM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA). Readings were done at two moments: immediately after adding a semen sample to a solution containing PBS, Hoechst 33342 and H2DCF-D; and after incubation at 37°C for 60 min. The production of ROS was determined by the median intensity of the observed green fluorescence just on viable cells (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2011).

The DNA integrity was determined using sperm chromatin condensation Assay – SCCA, using 10 μ L of sperm sample with 5 μ L de TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), 10 μ L of Triton 1X (Triton X-100, 1%) (v/v) with 30 seconds

of intervals. The acridine orange was added and after incubation for 30 seconds. The spermatozoa were classified in integer DNA (green) and damaged (orange/red). The SCCA was calculated through of (number of spermatozoa fragment DNA / number of spermatozoa integer DNA + spermatozoa fragment DNA) *100 (JENKINS *et al.*, 2015).

2.6. STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The differences between the groups were determined by the Tukey HSD test. The results were presented by the mean \pm standard deviation, the level of statistical significance was 5% ($p < 0.05$). Statistical calculations were performed using the Statistix 9.0 program.

3. RESULTS

The water control and vehicle control groups were not statistically different in all analyzed parameters, except for the data of average distance traveled, linear and curvilinear, and of the average traveled, linear and curvilinear velocities (Fig. 1), so that, the other results will be presented comparing the treatments to the control group of the vehicle.

3.1. EFFECTS OF TOXICITY ON EXPOSURE TO TPT

Exposure to TPT has been shown to be clinically harmful at doses ≥ 5.0 mg TPT/kg. In the subjects in the 5.0 mg TPT/kg dose group, mild apathy and motor incoordination were observed. In the individuals in the 0.5 and 2.5 mg TPT/kg groups there were apparently no clinical signs of intoxication. However, there was death of one subject in each of the 0.5; 2.5 and 5.0 mg TPT/kg groups. Clinical signs of intoxication were observed from the fifth day of exposure to TPT in the maximum dose group (10.0

mg TPT/kg), which showed apathy and severe lack of motor coordination. It was observed that the station position was no longer quadruped and became a "sitting dog". They also presented moments of prostration with bilateral abduction of the hind limbs when in station position and after death.

Signs of intoxication observed in the 10.0 mg TPT/kg dose group suggest that this dose is highly toxic to *Calomys laucha*, and due to the observed poisoning and probable evolution at death, the final analysis of this group was performed at 7 days of exposure. The 10.0 mg TPT/kg group presented results (Fig. 2) that suggest a severe reduction in sperm activity parameters. It should be noted that the data referring to this group reflect the results of a short-term exposure (seven days).

3.2. EFFECT OF TPT EXPOSURE ON SPERMATIC KINETICS

Analyzing the results obtained in sperm kinetics, we noted that significant differences occurred in total and progressive motility (Fig. 3), where we can see a reduction in total motility from the 0.5 mg TPT/kg group and more evident with increase of doses of TPT. We still observed a statistics difference in the progressive motility between the vehicle group and the evaluated groups; however, among the groups exposed to the TPT, there was no significant difference despite a reduction in progressive motility in the group receiving the 5.0 mg TPT/kg dose. It should be noted that all analyzes were performed in 03 hours after collection, and this traffic time to the analysis laboratory, caused a reduction in the motilities observed even the control group.

In the evaluation of the distances average path, rectilinear and curvilinear (Table 1), the vehicle group differed from the data observed in the other groups, presenting lower values. Similar result was evidenced in relation to the average trajectory

velocities, rectilinear and curvilinear, where the groups of 0.5; 2.5 and 5.0 mg TPT/kg presented higher ($P < 0.05$) results as the doses increased, relative to the vehicle group.

Regarding rectilinearity, the highest dose group, 5.0 mg TPT/kg, presented higher values than the other groups ($P < 0.05$). The linearity data, the groups of 0.5 and 2.5 mg TPT/kg obtained statistically lower values, in relation to vehicle groups and 5.0 mg TPT/kg. In the oscillation data, it was observed that the groups of 0.5; 2.5 and 5.0 mg TPT/kg did not show any differences, but were lower in relation to the vehicle group.

Regarding the lateral head displacement data, there was an increase according to the increase of doses, being statistically significant from the dose 0.5 mg TPT/kg. In the cross-beat frequency analysis, all groups presented similar values, and only the 5.0 mg TPT/kg group presented a statistical difference in relation to the vehicle group.

3.3. EFFECT OF EXPOSURE TO TPT ON THE STRUCTURAL EVALUATION OF SPERMATOZOA

During the evaluation of spermatozoa, no changes in membrane integrity and DNA fragmentation were observed between groups (Table 2). However, when analyzing the functionality of mitochondria, a clear reduction of their function could be observed as the TPT/kg doses increased, so that treatments with doses of 2.5 and 5.0 mg TPT/kg showed a reduction ($P < 0.05$) (Fig 4).

In our study, it was evidenced that the groups 0.5 and 5.0 mg TPT / kg presented the highest rate of acrosome reaction, in relation to the other groups. When evaluating membrane fluidity data, a increase ($P < 0.05$) in membrane fluidity was observed at 5.0 mg TPT/kg. The other groups did not present statistical differences among themselves.

The ROS analysis of spermatozoa showed that the group 0.5 mg TPT / kg had a higher increase in ROS levels, being statistically different from the other groups (P<0.05).

4. DISCUSSION

In our study, we showed signs of toxicity at doses > 5.0 mg TPT/kg; however, there were apparently no signs of intoxication in the other groups. Individuals exposed to doses of 5.0 and 10.0 mg TPT/kg showed motor incoordination, decreased feed intake and apathy. These signs were intense in the individuals exposed to the highest dose (10.0 mg TPT/kg), so we began to observe these deaths from the sixth day of exposure, which led to the interruption of this exposure and immediate analysis. This result is similar to that seen in a study carried out with mice, however in these signs of intoxication and lethality suggest in individuals exposed to doses 33.33% higher, being ≥ 7.5 and 15.0 mg TPT/kg respectively. In the same study, deaths at the highest dose (15.0 mg TPT/kg) did not start until the second week of treatment (MELLO et al., 2015). Thus, we can observe that *C. laucha* species is more sensitive to the effects of TPT than mice and that the 10.0 mg TPT/kg group presented short term damage to spermatozoa besides causing general intoxication, indicating that this dose is highly detrimental to sperm and life.

When comparing studies performed in other species using higher doses of TPT hydroxide, such as the studies by Chernoff et al. (1990) using 13.0 mg TPT/kg for 10 days in rats; or of Vianna et al. (2002), which exposed mice for 12 days at doses of 15.0 mg TPT/kg and the study by Mello et al. (2015) that used 15.0 mg TPT / kg for 21 days in mice, we can infer that the species *C. laucha* presents a greater sensitivity to TPT,

since in only six days of exposure severe signs of intoxication were observed at doses 10.0 mg TPT/Kg. There are also other studies evaluating exposure to other triphenyltin compounds, such as Snow and Hays (1983), which compared the administration of 20.0 mg/kg triphenyltin acetate (TPTa) and the same dose of triphenyltin chloride (TPTCl) orally per day for 20 days, and demonstrated that both compounds severely affected spermatogenesis in rats. It should be noted that there are no previous studies evaluating the effects of TPT in *Calomys laucha* and these studies used different species and higher doses.

In the results obtained in the analysis of the spermatic kinetics of our study, a reduction in the sperm quality was observed as the TPT/kg dose increased. The values for total sperm motility and progressive sperm motility presented a reduction in the percentage as the dose increased, reaching a reduction of 57.3% in total sperm motility when compared to the vehicle group (V: 46.1 ± 1.5) as compared to 5.0 mg TPT / kg (5.0: 19.7 ± 2.0). With respect to progressive sperm motility, a reduction of 37.5% was observed in the dose of 0.5 mg TPT/kg and reaching 55.3% in the dose of 5.0 mg TPT/kg. This parameter is fundamental in the evaluation of sperm activity, since the analysis of sperm motility has been pointed out by many authors as an important tool in the selection of an ejaculate with greater fertilization efficiency, being the determination of the percentage of mobile spermatozoa, the most used test to predict the seminal quality (BRANIGAN et al., 1999, COX et al., 2006, EDDY et al., 1994; VAN WEERT et al., 2004; VERSTEGEN et al., 2002).

The negative effects that OTs cause on reproduction have been reported in several species, mainly aquatic, and similarly coastal species are also susceptible to their effects. Chauhan & Agarwal (2009), exposed male rats (*Rattus norvegicus*), adults 4 to

6 months of age, using doses of 0, 10.0 and 20.0 mg TPT/kg body weight for 60 days, and identified a reduction in sperm motility of 46% at 10.0 mg TPT/kg and 72% at highest dose (20.0 mg TPT/kg). In teleosts fishes, *Clarias gariepinus*, an african catfish, and *Cyprinus carpio*, a common carp, exposed to tribulyltin (TBT), a OT compound similar to TPT, parameters of sperm motility were evaluated through the computerized sperm analysis system (CASA), where a reduction in sperm movement was observed in both species. In the african catfish the movement of the spermatozoa sold out faster than in the carp. The results showed that TBT had a significant effect on motility in both species, and evidenced the greater sensitivity of african catfish compared to carp, with the intensity and duration of movement being higher in carp than in catfish sperm (RURANGWA Et al., 2002; TAKAHASHI et al., 1999). The comparison between the effects of exposure to TBT and TPT on sperm activity was addressed in a study conducted in rats exposed to 25.0 µg / kg of TBT and TPT intraperitoneally, who found both had similar effects negatively affecting sperm motility, as well as spermatogenesis (REDDY et al., 2006). These data corroborate the negative effects on sperm motility evidenced in our study.

This negative interference of TPT in motile apparently is closely related to the other alterations in other sperm parameters, such as mitochondrial functionality, as well as membrane integrity and fluidity also observed in our work. In relation to mitochondrial functionality, a marked decrease in its function was observed in relation to the increase in TPT/kg doses. Mitochondrial functionality has an intimate relationship with sperm quality and fertilization capacity, since mitochondria participate in several cellular functions, in addition to the production of ATP, such as calcium homeostasis, ROS generation, apoptotic intrinsic pathway and biosynthesis of steroid hormones

(AMARAL et al., 2013). Defects in mitochondrial spermatozoa have already been shown to be associated with decreased sperm motility and consequently decreased reproductive performance (PELLICCIONE et al., 2011). In rodent species, it was observed that the mitochondria of the spermatozoa are polarized, and thus functional, after epididymal maturation. Without this process, the spermatozoon is unable to effect *in vivo* fertilization (Aitken et al., 2007). Studies in cattle and boars observed a peak in oxygen uptake during sperm capacitation processes and *in vitro* acrosome reaction, so that the authors could infer that mitochondrial functionality is related to sperm capacitation, being fundamental in this process. (CORDOBA et al., 2006, RAMIO-LLUCH et al., 2011).

Thus, we can infer that besides the fundamental performance in energy production, the functionality of mitochondria is closely related to sperm motility, and that the reduction observed in this parameter is the main aggravating factor in the reduction of total and progressive motility, so that the negative action of the TPT on the sperm activity is evident, being able to generate damages in the fertility in *C. laucha*.

Controlled ROS levels are critical in sperm performance (mainly in terms of motility, capacity building, acrosome reaction and fertilization capacity). The generation of ROS may also have a pathological effect on the male gametes, if excess, or if there is an imbalance with the available antioxidant defenses, resulting in a decrease in viability, motility, membrane integrity and increases in DNA damage, morphological defects and lipid peroxidation, possibly resulting in a phenomenon similar to apoptosis (AITKEN et al., 2012; AMARAL et al., 2013; KOPPERS et al., 2008; KOTHARI et al., 2010; MAHFOUZ et al., 2010). In our study, we observed that in the 2.5 and 5.0 mg TPT/kg doses ROS levels were similar to the vehicle group, a fact that may be associated with a

possible increase in antioxidant defenses or mitochondrial functionality. However, at the dose of 0.5 mg TPT / kg, there was an increase in ROS, but apparently, this dose did not cause damage enough to induce the increase of antioxidant defenses. But it should be emphasized that at this dose already reduced levels of total and progressive motilities were observed, and there may be a relationship between ROS levels and decreased motility.

A study by Ye et al. (2013) has shown that TPT, by its hydrophobic nature, tends to interact rapidly with lipids, which are the primary constituents of the cell membrane. Other studies have shown that TPT increases cell membrane permeability, inducing damage and even death of some cells, as well as having the capacity to alter the molecular organization of the membrane, triggering a spontaneous efflux of certain ions, such as Cl^- and Na^+ (BONARSKA-KUJAWA et al., 2012, GAO et al., 2014). These studies have described the effects of TPT on the cellular metabolism of other cells and single-celled organisms, but there are no studies on their effects on the sperm cell. However, such data allow us to understand the increase in membrane fluidity observed at the dose of 5.0 mg TPT/kg, and thus suggest that there will be a negative effect on activity of *C. laucha* spermatozoa.

Alterations in the spermatid membrane are fundamental so that the spermatozoa can affect the acrosomal reaction and, consequently, the fertilization. In the process of sperm capacitation, cholesterol mobilizes from the membrane so that proteins and receptors can interact. When the relationship between cholesterol and phospholipid is reduced, there is a decrease in the microviscosity of the sperm membrane, exposing the phospholipids and, in a way that allows the increase of the calcium influx, occurring the acrosome reaction (CROSS, 1998; GADELLA et al., 2008). Considering that TPT

causes changes in membrane structure through lipid interactions, we can infer that the increase in acrosome reaction observed in all treated groups was significant in the 0.5 and 5.0 mg TPT/kg, are related to these structural alterations.

The evaluation of toxicity using animal sperm has rapidly developed as a simple and valid model during the last decades, since its use does not require sterile and expensive cell culture conditions. Mammalian sperm were initially used to verify the toxicity of compounds to which humans can be exposed (BAVISTER & ANDREWS, 1988) and also to evaluate human reproductive risk (SLOTT et al., 1993). In this context, we suggest that doses ≥ 0.5 mg TPT/kg are considered to be of relevance for reproduction in *C. laucha*, since from this dose alterations in sperm activity were observed, mainly with regard to total and progressive motility, functionality of membrane and ROS levels.

Based on the data obtained from the survival of *Calomys laucha* and sperm analysis, we can suggest that this species is more sensitive to the harmful effects of TPT than other rodent species such as rats and mice, so that exposure to this contaminant presents a negative impact on parameters of sperm activity.

5. REFERENCES

- AITKEN, R.J.; NIXON, B.; LIN, M.; KOPPERS, A.J.; LEE, Y.H.; BAKER, M.A. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. **Asian Journal of Andrology** 9 554–564, 2007.
- AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; DE IULIIS, G.N.; MCLAUGHLIN, E.A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Mol Human Reprod**, v.13, p. 203–211, 2007.
- AITKEN, R.J.; JONES, K.T.; ROBERTSON, S.A. Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health. **Jour of Andrology** v.33 p.1096–1106, doi:10.2164/jandrol.112.016535, 2012.
- AMARAL, A.; LOURENÇA, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality, **Society for Reproduction and Fertility** DOI: 10.1530/REP-13-0178, ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899 (online), 2013.
- BAVISTER, B.D.; ANDREWS, J.C. A rapid sperm motility procedure for quality-control testing of water and culture medium. **J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer** v.5, p.67–75, 1988.
- BONARSKA-KUJAWA, D.; KLESZCZYŃSKA, H.; PRZESTALSKI, S. The location of organotins within the erythrocyte membrane in relation to their toxicity, **Ecotoxicol. Environ. Saf.** V. 78, p. 232–238, 2012.
- BRANIGAN, E.F.; ESTES, M.A.; MULLER, C.H. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. **Fertil Steril.** V. 11, p. 547–551, 1999.

- CHAUHAN, A.; AGARWAL, M. Toxicological Studies of Orally Administered Triphenyltin Complex [(C₆H₅)₃Sn(Sal. Benz. H.)] on the Reproductive Organs of Male Albino Rats. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 868-884, 2009.
- CHERNOFF, N., SETZER, R. W., MILLER, D.B., ROSEN, M.B. AND ROGERS, J.M. Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. **Teratology**, 42: 651-658, 1990.
- COLARES, E.P. Aspectos da fisiologia reprodutiva de *Calomys laucha* OLFERS, 1818 (Mammalia: Rodentia). USP – São Paulo. Tese de Doutorado. 1997.
- CORDOBA, M.; MORA, N.; BECONI M.T. 2006 Respiratory burst and NAD(P)H Oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Theriogenology** 65 882–892, 2006.
- COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p.860-867, 2006.
- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol Reprod**, v.59, p 7-11, 1998.
- DÍEZ, S.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D.; BAYONA, J.M. Survey of organotin compounds in rivers and coastal environments in Portugal 1999–2000, **Environ.Pollut.** v.136, p. 525–536, 2005.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and

- importance of individual male variability. **Reprod Dom Anim.** v.46, p.393–403, 2011.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill JD, editor. New York: Raven Press. **The Spermatozoon**; p. 29–77, 1994.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C). **Reregistration Eligibility Decision (RED) – Triphenyltin Hydroxide (TPTH)**, EPA. 738-R-99-010, September, 1999.
- FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology** v.80, p.400–410, 2013.
- FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology** p.26, p.1-117, 1996.
- FITAS, A.L.; AMARAL, D.; LOPES, L. Aromatase inhibitors in male adolescents with idiopathic short stature. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, V9 (1), p. 53-58, 2014.
- GAO, J.; YE, J.; MA, J.; TANG, L.; HUANG, J. Biosorption and biodegradation of triphenyltin by *Stenotrophomonas maltophilia* and their influence on cellular metabolism. **Journal of Hazardous Materials.** v. 276, p. 112–119, 2014.
- GADELLA, B.M.; TSAI, P.S.; BOURKE, A.; BREWIS, I.A. Sperm head membrane reorganization during capacitation. **Int J Dev Biol**, v.52, p.473, 2008.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology** v.63, p.445–457, 2005.

- HOBLER, C.; ANDRADE, A.J.M.; GRANDE, S.W.; GERICKE, C; TALSNESS, C.E.; APPEL, K.E.; CHAHOUD, I.; GROTE, K. Sex-dependent aromatase activity in rat offspring after pre and postnatal exposure to triphenyltin chloride, **Toxicology**. v. 276, p. 198–205, 2010.
- HORIGUCHI, T. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex, **Environ. Sci.** 13(2), 77–87, 2006.
- JEA, Japan Environment Agency. *Chemicals in the environment*. Tokyo, Environmental Health Department, Office of Health Studies, 1996.
- KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; MCLAUGHLIN, E.A.; AITKEN; R.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, p.3199–3207, doi:10.1210/jc.2007-2616, 2008.
- KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; DU PLESSIS, S.S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48 p.425–435, 2010.
- MAHFOUZ, R.Z.; DU PLESSIS, S.S.; AZIZ, N.; SHARMA, R.; SABANEKH, E.; AGARWAL, A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v.93 p.814–821, 2010.
- MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; VALVERDE, A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ. J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on

- the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. **PLoS One**. v.7, n.5, e36550, 2012.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L.; PAZ, P. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. **Reprod Dom Anim**. v.45, p.67–78, 2010.
- MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P.E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environ Toxicol Chem**; v.17, p. 37-43, 1998.
- MELLO, M.S.C.; DELGADO, I.F.; FAVORETO, A.O.A.; LOPES, C.M.T.; BATISTA, M.M.; KEMPINAS, W.D.G.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Sexual maturation and fertility of mice exposed to triphenyltin during prepubertal and pubertal periods. **Toxicology reports**, v.2, p. 405-414, 2015.
- MENG, P.J.; LIN, J.; LIU, L.L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **J Environ Manage**; 90 (Suppl 1): S8-S15, 2009.
- MILLS, J.N.; ELLIS, B.A.; CHILDS, J.E.; MAIZTEGUI, J.L.; CASTRO-VASQUEZ, A. Seasonal changes in mass and reproductive condition of the corn mouse (*Calomys musculus*) on the Argentine pampa. **J. Mammal**; v.73, p. 876-884, 1992.
- NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biol Reprod**. v.68, p.1828–1835, 2003.

- NASH, J.P.; KIME, D.E.; VAN DER VEN, L.T.M.; WESTER, P.W.; BRION, F.; MAACK, G. Long term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. **Environ Health Perspect.** 112:1725–33, 2004.
- PALM, W.U.; KOPETZKY, R.; RUCK, W. OH-radical reactivity and direct photolysis of triphenyltin hydroxide in aqueous solution, **J. Photochem. Photobiol.** v. 156, p. 105–114, 2003.
- PELLICCIONE, F.; MICILLO, A.; CORDESCHI, G.; D'ANGELI, A.; NECOZIONE, S.; GANDINI, L.; LENZI, A.; FRANCAVILLA, F.; FRANCAVILLA, S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. **Fertility and Sterility** 95 641–646. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.07.1086, 2011.
- PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; BRANDT, H.; TOPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. **Theriogenology.** v. 64 p. 1766–1782, 2005.
- RAMIO-LLUCH, L.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; PENA, A.; COLAS, C.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T.; RAMIREZ, A.; CONCHA, I.I.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. 'In vitro' capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. **Reproduction in Domestic Animals** 46 664–673, 2011.

- REDDY, P. S.; PUSHPALATHA, T.; SREENIVASULA REDDY, P. Reduction of spermatogenesis and steroidogenesis in mice after fentin an fenbutatin administration. **Toxicology Letters**. V. 166, Iss 1, p. 53-59, 2006.
- RURANGWA, E.; BIEGNIIEWSKA, A.; SLOMINSKA, E.; SKORKOWSKI, E.F.; OLLEVIER, F. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 131, p. 335–344, 2002.
- SHAM, R.C.T.; HO, K.K.Y.; LEUNG, K.M.Y. Tissue-specific accumulation of triphenyltin compounds in selected marine demersal fishes of Hong Kong. The 2015 **International Conference on Biodiversity, Ecology and Conservation of Marine Ecosystems (BECOME 2015)**, The University of Hong Kong, Hong Kong, 1-4 June 2015. In Programme and Abstracts, p. 251, 2015.
- SILVA, E.F.; VARELA JUNIOR, A.S.; CARDOSO, T.F.; STEFANELLO, F.M.; KALB, A.C.; MARTINEZ, P.E.; CORCINI, C.D. Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm **Toxicology in vitro**, v.35, p. 31– 35, 2016.
- SLOTT, V.L.; SUAREZ, J.D.; POSSE, P.M.; LINDER, R.E.; STRADER, L.F.; PERREAULT, S.D. Optimization of the Hamilton-Thorn computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. **Fund. Appl. Toxicol.** 21, p. 298–307, 1993.
- SNOW, R. L.; HAYS, R. L. Phasic distribution of seminiferous tubules in rats treated with triphenyltin compounds. **Bull Environ. Contam. Toxicol.** 31, 658–665, 1983.

- STASINAKIS, A.S.; THOMAIDIS, N.S.; NIKOLAOU, A.; KANTIFES, A. Aerobic biodegradation of organotin compounds in activated sludge batch reactors, **Environ. Pollut.** v. 134, p. 431–438, 2005
- TAKAHASHI, S.; MUKAI, H.; TANABE, S.; SAKAYAMA, K.; MIYAZAKI, T.; MASUNO, H. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. **Environ Pollut**; 106: 213-218, 1999.
- VAN WEERT, J.M.; REPPING, S.; VAN VOORHIS, B.J.; VAN DER VEEN, F.; BOSSUYT, P.M.; MOL, B.W. Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis. **Fertil Steril.**; v. 11, p. 612–620, 2004.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- VIANA, V.G. Investigação de possíveis danos funcionais causados pela exposição pré-natal ao trifenil hidróxido de estanho (TPTH). **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública – FIOCRUZ**, 2002.
- YAMADA, H.; TAKAYANAGI, K. Bioconcentration and elimination of bis (tributyltin)oxide (TBTO) and triphenyltin chloride (TPTC) in several marine fish species, **Water Res.** v. 26, p.1589–1595, 1992.
- YE, J.S.; YIN, H.; PENG, H.; BAI, J. Q.; XIE, D.P.; WANG, L.L. Biosorption and biodegradation of triphenyltin by *Brevibacillus brevis*, **Bioresour. Technol.** V. 129, p. 236–241, 2013.

YI, A.X.; LEUNG, K.M.Y.; LAM, M.H.W.; LEE, J.S.; GIESY, J.P. Review of measured concentrations of triphenyltin compounds in marine ecosystems and meta-analysis of their risks to humans and the environment. **Chemosphere** 89:1015–1025, 2012.

YI, A.X.; HAN, J.; LEE, J.S.; LEUNG, K.M.Y. Ecotoxicity of triphenyltin on the marine copepod *Tigriopus japonicus* at various biological organizations: from molecular to population-level effects. **Ecotoxicology**, 2014.

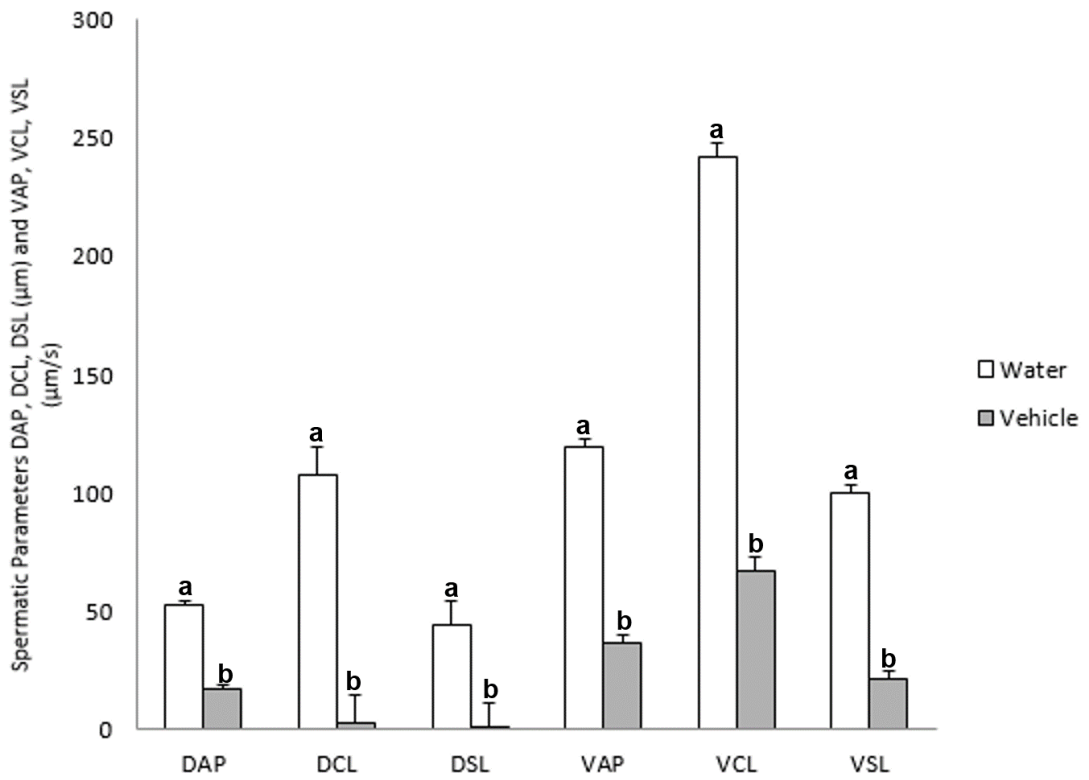


Figure 1: Comparison between values in Distance Average Path (DAP), Distance Curved Line (DCL), Distance Straight Line (DSL), Velocity Average Path (VAP), Velocity Curved Line (VCL), Velocity Straight Line (VSL) between the water and vehicle groups. Values followed by different letters indicate significant differences between the storage moments ($P < 0.05$).

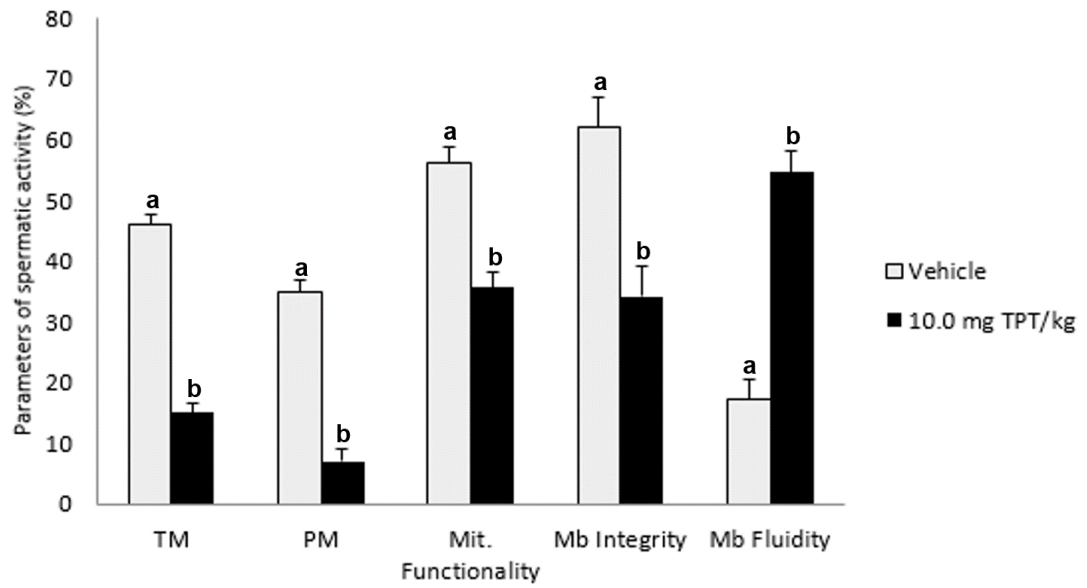


Figure 2: Comparison between vehicle groups and 10.0 mg TPT / kg in the parameters TM (Motility Total), PM (Motility Progressive), Mit. Functionality (Mitochondria Functionality), Membrane Integrity (Mb. Integrity)) and Mb Fluidity (Membrane Fluidity). Values followed by different letters indicate significant differences between the storage moments ($P < 0.05$).

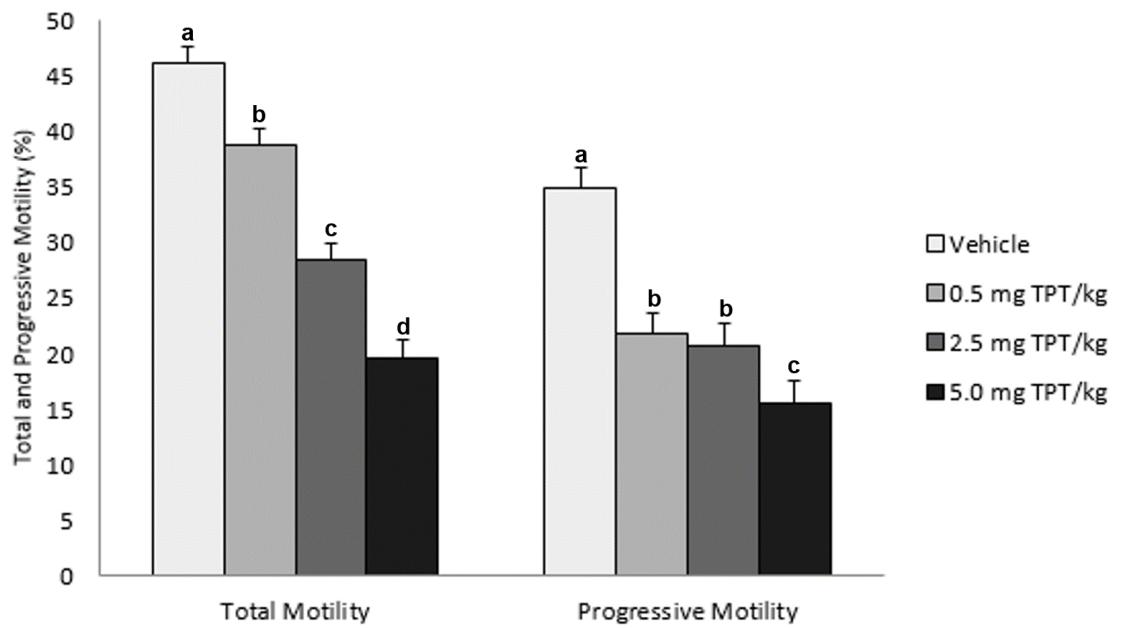


Figure 3: Graphical demonstration of the parameters of total and progressive motility between the experimental groups, evidencing the reduction according to the increase of doses of TPT. Values followed by different letters indicate significant differences between the storage moments ($P < 0.05$).

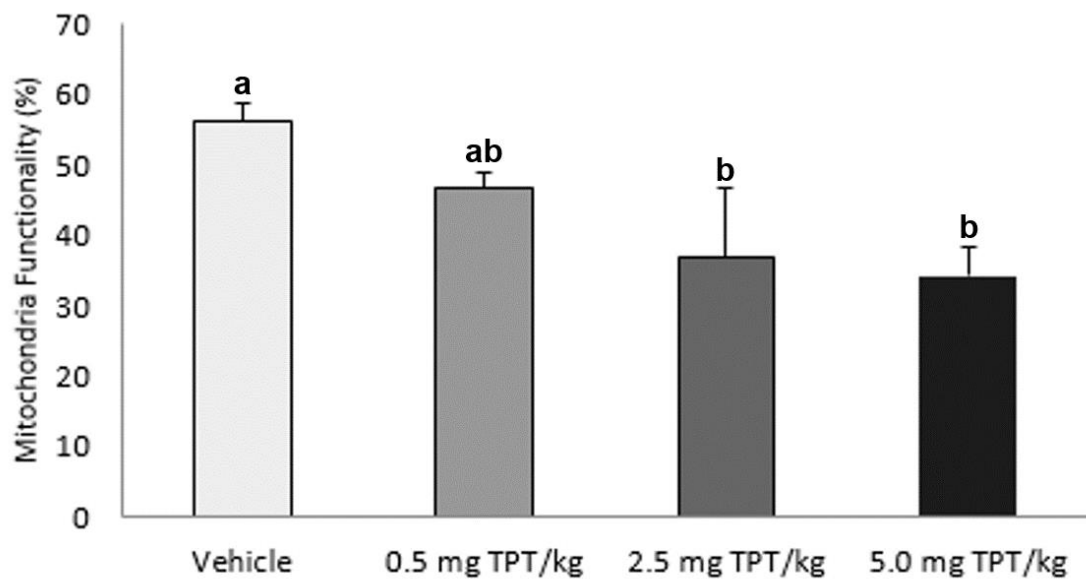


Figure 4: Graphical demonstration of the functionality of mitochondria between the experimental groups, evidencing the decrease of the same according to the increase of the doses of TPT. Values followed by different letters indicate significant differences between the storage moments ($P < 0.05$).

Table 1: Mean values and standard deviation of spermatic kinetics parameters obtained after computerized analysis of spermatic movement of *C. laucha* treated orally with TPT (0, 0.5, 2.5 and 5.0 mg TPT / kg) for 21 Days, from 50 (\pm 3) to 71 (\pm 3) PND.

Spermatic Kinetic	Vehicle	0.5 mg TPT/kg	2.5 mg TPT/kg	5.0 mg TPT/kg
DAP (μm)	17.4 \pm 1.0 ^a	20.2 \pm 1.3 ^a	28.0 \pm 1.3 ^b	36.2 \pm 2.2 ^c
DCL (μm)	31.7 \pm 2.8 ^a	42.5 \pm 3.8 ^a	60.2 \pm 3.6 ^b	75.2 \pm 4.9 ^c
DSL (μm)	10.3 \pm 0.5 ^a	12.3 \pm 1.1 ^a	19.0 \pm 1.2 ^b	31.0 \pm 2.1 ^c
VAP ($\mu\text{m/s}$)	37.0 \pm 2.2 ^a	43.5 \pm 2.7 ^a	60.2 \pm 2.9 ^b	79.5 \pm 4.7 ^c
VCL ($\mu\text{m/s}$)	67.2 \pm 6.0 ^a	91.2 \pm 7.8 ^a	128.9 \pm 7.7 ^b	164.8 \pm 10.4 ^c
VSL ($\mu\text{m/s}$)	21.9 \pm 1.0 ^a	26.5 \pm 2.2 ^a	40.6 \pm 2.5 ^b	68.2 \pm 4.5 ^c
STR	0.61 \pm 0.02 ^a	0.60 \pm 0.02 ^a	0.65 \pm 0.01 ^a	0.84 \pm 0.01 ^b
LIN	0.37 \pm 0.03 ^a	0.31 \pm 0.02 ^b	0.32 \pm 0.01 ^b	0.41 \pm 0.01 ^a
WOB	0.60 \pm 0.02 ^a	0.50 \pm 0.01 ^b	0.50 \pm 0.01 ^b	0.50 \pm 0.01 ^b
AHL	1.9 \pm 0.2 ^a	2.7 \pm 0.1 ^b	3.2 \pm 0.1 ^c	3.6 \pm 0.2 ^c
BCF	23.6 \pm 0.7 ^a	24.8 \pm 1.0 ^a	26.0 \pm 0.6 ^a	36.0 \pm 1.1 ^b

DAP= Distance Average Path (μm); DCL= Distance Curved Line (μm); DSL= Distance Straight Line (μm); VAP= Velocity Average Path ($\mu\text{m/s}$); VCL= Velocity Curved Line ($\mu\text{m/s}$); VSL= Velocity Straight Line ($\mu\text{m/s}$); STR= Straightness (VSL/VAP); LIN= Linearity (VSL/VCL); WOB= Wobble (VAP/VCL); AHL= Amplitude of Lateral Head Displacement (μm); BCF= Beat Cross Frequency (Hz).

Values followed by different letters indicate significant differences among the storage moments ($P < 0.05$).

Table 2: Mean and standard deviation of the parameters obtained in flow cytometer of the spermatic evaluation of *C. laucha* treated orally with TPT (0; 0.5, 2.5 and 5.0 mg TPT / kg) of 50 (\pm 3) to 71 (\pm 3) PND.

Sperm Structure	Vehicle	0.5 mg TPT/kg	2.5 mg TPT/kg	5.0 mg TPT/kg
Membrane Integrity	62.0 \pm 4.9 ^a	60.6 \pm 4.4 ^a	56.2 \pm 4.8 ^a	63.9 \pm 4.9 ^a
Membrane Fluidity	17.1 \pm 3.3 ^a	20.0 \pm 6.5 ^a	18.8 \pm 2.6 ^a	24.6 \pm 3.2 ^b
Acrosome Reaction	47.8 \pm 1.3 ^a	84.7 \pm 2.1 ^b	55.3 \pm 3.1 ^{ac}	65.8 \pm 4.8 ^c
ROS	2085 \pm 116 ^a	5833 \pm 536 ^b	1933 \pm 57 ^a	2308 \pm 80 ^a
SCCA	2.07 \pm 0.11 ^a	2.38 \pm 0.04 ^a	1.93 \pm 0.16 ^a	3.31 \pm 0.86 ^a

SCCA= Sperm Chromatin Condensation Assay; ROS= Reactive Oxigen Species

Values followed by different letters indicate significant differences among the storage moments (P < 0.05).

7. DISCUSSÃO GERAL

Estudos sobre os efeitos da exposição ao TPT são de grande relevância para compreender o potencial risco a fisiologia reprodutiva de espécies susceptíveis a exposição, como o caso da espécie *C. laucha*. Em nosso estudo evidenciamos sinais de toxicidade em doses $> 5,0$ mg TPT/kg, porém, aparentemente não houve sinais de intoxicação nos demais grupos. Os indivíduos expostos a doses de 10,0 mg TPT/kg demonstraram incoordenação motora, diminuição no consumo de ração e apatia; ainda foram observadas mortes destes a partir do sexto dia de exposição, o que nos levou a interrupção desta exposição e imediata análise. Este resultado é semelhante ao visto em um estudo realizado com camundongos, contudo nestes os sinais de intoxicação e letalidade sugeriram em indivíduos expostos a doses maiores, sendo $\geq 7,5$ e 15,0 mg TPT/kg respectivamente, sendo que as mortes na maior dose (15,0 mg TPT/kg) só ocorreram a partir da segunda semana de tratamento (MELLO *et al.*, 2015). Deste modo, podemos observar que a espécie *C. laucha* apresenta maior sensibilidade aos efeitos do TPT do que camundongos e que o grupo 10,0 mg TPT/kg apresentou, a curto prazo, danos aos espermatozoides além de causar intoxicação geral, indicando que esta dose é altamente prejudicial aos espermatozoides e a vida.

Ao compararmos estudos realizados em outras espécies utilizando doses maiores de hidróxido de TPT, como os estudos de Chernoff *et al.* (1990) utilizando 13,0 mg TPT/kg durante 10 dias em ratos; o de Vianna *et al.* (2002), que expôs camundongos durante 12 dias a doses de 15,0 mg TPT/kg e o estudo de Mello *et al.* (2015) que utilizou 15,0 mg TPT/kg durante 21 dias em camundongos, podemos inferir que a espécie *C. laucha* apresenta maior sensibilidade ao TPT, visto que em apenas seis dias

de exposição foram observados sinais graves de intoxicação, em doses > 5,0 mg TPT/kg, sendo observados no grupo de 10 mg TPT/kg.

Há ainda outros estudos que avaliaram a exposição a outros compostos trifenilestânicos, como o realizado por Snow e Hays (1983) que comparou a administração de 20,0 mg/kg de acetato de trifenilestanho (TPTa), e mesma dose de cloreto de trifenilestanho (TPTcl) via oral, por dia, durante 20 dias, e demonstraram que ambos os compostos afetaram gravemente a espermatogênese em ratos. Cabe ressaltar que não há estudos anteriores avaliando os efeitos do TPT em *Calomys laucha* e estes estudos citados utilizaram espécies diferentes e doses mais elevadas.

A excreção de TPT via leite materno é outro ponto relevante para compreendermos os seus efeitos na fase de maturação dos órgãos reprodutivos, que ocorre junto a fase de amamentação. Essa eliminação de TPT via leite materno foi descrita anteriormente em um estudo que investigou a presença de resíduos de TPT em leite de vacas. Neste estudo foi utilizado hidróxido de TPT (TPT_h) marcado com ¹⁴C (carbono 14), que foi administrado oralmente durante um período de 60 dias, em doses de 1,13, 5,61 e 22,44 mg TPT/kg de dieta (matéria seca), e constatado, respectivamente ao aumento de doses, resíduos de 0,006, 0,034 e 0,134 mg TPT/kg de leite, referente a um fator de transferência de 0,004 a 0,006 no leite (SMITH, 1981). Sendo assim, com base nos dados apresentados no trabalho de Smith (1981), que demonstraram a excreção do TPT no leite, podemos inferir que as alterações que evidenciamos nos parâmetros espermáticos dos filhotes do nosso estudo, seja devida à transferência do TPT através do leite materno em *C. laucha*, uma vez que somente as fêmeas lactantes receberam o TPT por gavagem.

Em nossa pesquisa bibliográfica não encontramos outros estudos semelhantes sobre os efeitos da exposição ao TPT sobre a atividade espermática em indivíduos expostos somente via leite materno durante o período de amamentação. Os trabalhos encontrados apresentavam períodos e/ou vias de exposição diferente, como: Grote *et al.* (2009) que realizaram a exposição de ratas fêmeas, por gavagem a 2,0 e 6,0 mg TPT/kg/dia, a partir do sexto dia de gestação (6 GD) até o desmame (21 PND) e observaram que os filhotes apresentaram diminuições no ganho de peso corporal, de peso dos testículos e da concentração de testosterona, bem como um atraso na idade na separação prepucial; Mello *et al.* (2015) expuseram filhotes de camundongo ao TPT (1,875, 3,75, 7,5 e 15,0 mg TPT/kg/dia) através de gavagem durante o período de desenvolvimento pré-púbere e puberdade (15 a 45 PND); Reddy *et al.* (2006) realizaram a exposição de camundongos através de injeções intraperitoneais de 10 e 25 µg TPT/kg/dia durante 5 (cinco) dias no final do período pré-púbere entre 20 e 25 PND, e constataram uma diminuição na contagem epididimal de espermatozoides, na motilidade espermática, na viabilidade espermática e na concentração de testosterona. Além das diferenças em doses, períodos e vias exposição, ressaltamos que os objetos de investigação dos estudos citados foram diferenciados, de modo que estes se ocuparam em avaliar o peso dos testículos, a concentração de testosterona, histologia de dos testículos, contagem de espermatozoides e espermátides, além de marcos no desenvolvimento físico. Sendo assim, é evidente a diferença nos objetos de estudo que nos preocupamos em investigar, visto que buscamos realizar avaliações da atividade e estrutura do espermatozoide, que são parâmetros mais sutis, porém de grande relevância na fertilidade.

Um dos parâmetros mais relevantes na atividade espermática é a motilidade dos espermatozoides, que está relacionada a fertilidade, e é considerada determinante na avaliação da qualidade seminal (COX *et al.*, 2006; VAN WEERT *et al.*, 2004; VERSTEGEN *et al.*, 2002). Nos resultados obtidos na análise da cinética espermática de nosso estudo, foi constatada, na exposição em machos adultos, uma diminuição da qualidade espermática conforme aumento na dose de TPT/kg. Os valores para os parâmetros de motilidade espermática total e motilidade espermática progressiva apresentaram redução no percentual conforme aumento da dose, chegando a apresentar uma redução de 57,3% na motilidade espermática total quando comparado o grupo veículo (V: $46,1 \pm 1,5$) em relação ao de 5,0 mg TPT/kg (5,0: $19,7 \pm 2,0$). Com relação a motilidade espermática progressiva foi constatada uma redução de 37,5% na dose de 0,5 mg TPT/kg e chegando a 55,3% na dose de 5,0 mg TPT/kg. Este parâmetro é fundamental na avaliação da atividade espermática, visto que a análise da motilidade espermática tem sido apontada por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado com maior eficácia de fertilização, sendo a determinação da percentagem de espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal (BRANIGAN *et al.*, 1999; COX *et al.*, 2006; EDDY *et al.*, 1994; VAN WEERT *et al.*, 2004; VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Os efeitos negativos que os OTs causam na reprodução foram relatados em diversas espécies, como no estudo de Chauhan & Agarwal (2009), que expuseram ratos machos (*Rattus norvegicus*), adultos de 4 a 6 meses de idade, utilizando doses de 0, 10,0 e 20,0 mg TPT/ kg peso corporal, durante 60 dias, e identificaram uma redução na motilidade espermática de 46% na dose de 10 mg TPT/kg e de 72% na maior dose (20,0 mg TPT/ kg). Já em peixes teleósteos, *Clarias gariepinus*, um bagre africano, e

Cyprinus carpio, uma carpa comum, expostos a tribultilestanho (TBT), um composto OT semelhante ao TPT foram avaliados parâmetros da cinética espermática, onde foi observado uma redução na movimentação espermática em ambas as espécies. No bagre africano o movimento dos espermatozoides esgotou mais rapidamente do que na carpa. Os resultados mostraram que os OTs têm um efeito significativo sobre a motilidade em ambas as espécies e, evidenciaram a maior sensibilidade do bagre africano em comparação a carpa, sendo a intensidade e a duração do movimento mais elevada no esperma da carpa que do bagre (RURANGWA *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 1999). A comparação entre os efeitos da exposição ao TBT e TPT na atividade espermática foi abordada em um estudo realizado em ratos expostos a 25 µg/kg de TBT e TPT, por via intraperitoneal, que constatou ambos tiveram efeitos semelhantes afetando negativamente a motilidade espermática, bem como a espermatogênese no todo (REDDY *et al.*, 2006). Tais dados vêm a corroborar os efeitos negativos na motilidade espermática evidenciados em nosso trabalho.

Em nosso estudo de exposição durante a amamentação, também observamos que os valores de VAP apresentaram redução em todos os grupos expostos ao TPT, assim como a VSL e LIN, cujos valores diminuíram nos grupos de doses 2,5 e 5,0 mg TPT/kg, e a VCL e BCF, que reduziram ($P < 0,05$) no grupo de dose de 2,5 mg TPT/kg. Verstegen *et al.* (2002) correlacionou os parâmetros da cinética espermática com a taxa de fertilização, e observou que os valores de VAP, VCL e VSL são maiores em amostras espermáticas que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados. Assim como amostras com elevados valores desses parâmetros de velocidade e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN *et al.*, 2002). Deste modo, com base na diminuição destes parâmetros cinéticos observados

em nosso trabalho, bem como a diminuição das motilidades total e progressiva, podemos observar que a exposição ao TPT se mostrou prejudicial a atividade espermática da espécie *C. laucha*, o que pode vir a impactar negativamente na fertilidade.

Os efeitos negativos observados na motilidade espermática dos grupos expostos ao TPT aparentemente estão intimamente relacionados com as alterações evidenciadas em outros parâmetros espermáticos, como integridade de membrana e ruptura de membrana, que foram bem expressivas, além da funcionalidade de mitocôndria. Estas alterações podem estar relacionadas com a capacidade que os compostos triorganoestânicos têm de atravessar a membrana celular, se ligarem a receptores nucleares (NR) e se translocarem para o núcleo, formando um complexo triorganoestânico-NR e co-ativadores. Este complexo se liga a elementos de resposta no DNA e induz a transcrição de genes alvo e gera alterações na expressão de algumas proteínas, assim como disfunções mitocondriais e celulares, como a inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa (KISHTA *et al.*, 2007; DELGADO FILHO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2006). Delgado Filho *et al.* (2011) analisaram a exposição a compostos triorganoestânicos (TBT e TPT) durante a gestação através da circulação materna via placenta, e concluíram que estes se acumulam nos tecidos fetais e podem induzir diversas alterações. Embora, em nosso estudo a exposição não tenha sido durante o período gestacional, os dados que observamos de diminuição da integridade de membrana e funcionalidade mitocondrial podem estar relacionados as alterações nos elementos de resposta no DNA descritas pelos autores, visto que os indivíduos foram expostos durante o período de amamentação, na fase pré-púbere, e os efeitos observados persistiram por muito tempo após o término da exposição ao TPT.

Em nossos resultados observamos que a exposição ao TPT, via amamentação, promoveu um dano persistente na formação e organização estrutural das células espermáticas, de modo que mesmo após dois ciclos espermatogênicos ainda foi possível observar uma acentuada redução na integridade da membrana espermática, chegando a 66,9% na dose de 5,0 mg TPT/kg, bem como um aumento no rompimento de membrana celular evidenciado nos grupos de doses de 2,5 mg TPT/kg (69,5%) e 5,0 mg TPT/kg (62,4%) ($P < 0,05$). Tais alterações estruturais em membranas celulares em decorrência da exposição ao TPT foram descritas previamente em bactérias, onde Ye *et al.* (2013) demonstraram que o TPT, por sua natureza hidrofóbica, tende a interagir rapidamente com lipídeos, que são os constituintes primários da membrana celular.

Outros estudos evidenciaram que o TPT aumenta a permeabilidade da membrana celular, induzindo danos e até mesmo a morte de algumas células, além de também ter a capacidade de alterar a organização molecular da membrana, desencadeando um efluxo espontâneo de certos íons, como Cl^- e Na^+ (BONARSKA-KUJAWA *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2014). Estes estudos citados descreveram os efeitos do TPT no metabolismo celular de outras células e de organismos unicelulares, porém não há estudos sobre seus efeitos na célula espermática.

Contudo, tais dados nos permitem compreender o aumento na fluidez de membrana observado na dose de 5,0 mg TPT/kg, e com isso inferir que poderão ocorrer prejuízos na fertilização dos espermatozoides de *C. Laucha*. Este comprometimento da integridade de membrana pode estar relacionado com a interação do TPT com os lipídeos de membrana, mas principalmente com alterações nos elementos de resposta no DNA, visto que nos indivíduos expostos durante a amamentação, os efeitos foram evidenciados 79 dias após o término da exposição.

Alterações na membrana espermática são fundamentais para que os espermatozoides possam efetuar a reação acrossomal e, conseqüentemente, a fecundação. No processo de capacitação espermática, o colesterol se mobiliza da membrana para que proteínas e receptores possam interagir. Quando a relação entre colesterol e fosfolípido é reduzida, ocorre uma diminuição da microviscosidade da membrana espermática, expondo os fosfolípidios e, de modo que permite o aumento do influxo de cálcio, ocorrendo a reação de acrossoma (CROSS, 1998; GADELLA *et al.*, 2008). Tendo em vista que o TPT ocasiona alterações na estrutura da membrana através de interações com lipídeos, podemos inferir que o aumento na reação de acrossoma observado em todos os grupos tratados, sendo estatisticamente significativo nos grupos de doses 0,5 e 5,0 mg TPT/kg, estão relacionados a estas alterações estruturais, visto que este parâmetro está relacionado com a presença de acrossoma não íntegros/reativos.

De um modo geral, a interferência negativa do TPT na motilidade aparentemente está intimamente relacionada com as demais alterações em outros parâmetros espermáticos, como funcionalidade de mitocôndria, assim como integridade e fluidez de membrana também observados em nosso trabalho. Em relação a funcionalidade de mitocôndria foi observada uma acentuada diminuição de sua função em relação ao aumento das doses de TPT/kg. A funcionalidade de mitocôndria apresenta uma íntima relação com a qualidade do espermatozoide e com a capacidade de fertilização, visto que as mitocôndrias participam de várias funções celulares, além da produção de ATP, tais como a homeostase do cálcio, a geração ROS, a via apoptótica intrínseca e biossíntese de hormônios esteróides (AMARAL *et al.*, 2013). Defeitos na ultra-estrutura mitocondrial do espermatozoide já demonstraram estar associados a diminuição da

motilidade do espermatozoide e conseqüente queda no desempenho reprodutivo (PELLICCIONE *et al.*, 2011). Em espécies de roedores, foi observado que as mitocôndrias dos espermatozoides são polarizadas, e assim funcionais, após a maturação epididimal. Sem este processo o espermatozoide é incapaz de efetuar a fertilização *in vivo* (AITKEN *et al.*, 2007). Estudos realizados em bovinos e javalis, observaram um pico no consumo de oxigênio durante os processos de capacitação espermática e a reação de acrossoma *in vitro*, de modo que os autores puderam inferir que a funcionalidade de mitocôndria está relacionada com a capacitação espermática, sendo fundamental neste processo (CORDOBA *et al.*, 2006, RAMIO-LLUCH *et al.*, 2011). Sendo assim, podemos inferir que além da fundamental atuação na produção de energia, a funcionalidade da mitocôndria está intimamente relacionada com a motilidade espermática, e que a redução observada neste parâmetro seja o principal agravante na redução da motilidade total e progressiva, de modo que fica evidente a ação negativa do TPT sobre a atividade espermática, podendo gerar prejuízos na fertilidade em *C. Laucha*.

A diminuição na funcionalidade de mitocôndria também foi observada em machos expostos através da amamentação, de modo que observamos uma redução ($P < 0,05$) em todos os grupos tratados com TPT. Estas alterações na funcionalidade de mitocôndria podem estar relacionadas com modificações nos elementos de resposta no DNA, que promovem disfunções mitocondriais e celulares, como a inibição do transporte iônico e da fosforilação oxidativa (KISHTA *et al.*, 2007; DELGADO FILHO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2006). Estes dados apresentam grande relevância ao avaliarmos a atividade espermática, tendo em vista que em espécies de roedores, foi observado que após a maturação epididimal as mitocôndrias dos espermatozoides são polarizadas,

fincando assim funcionais, e só assim permitindo a fertilização *in vivo* (AITKEN *et al.*, 2007). Caso não ocorra esta polarização devido a disfunções mitocondriais, ocasionadas por danos persistentes promovidos pela exposição ao TPT durante o período de amamentação, e conseqüentemente período de desenvolvimento dos órgão reprodutivos, o espermatozoide ficará incapaz de efetuar a fertilização. Deste modo, podemos inferir que a diminuição persistente na funcionalidade de mitocôndria observada em nosso estudo, pode acarretar em comprometimento da capacidade reprodutiva.

Níveis controlados de ROS são fundamentais no desempenho do espermatozoide (principalmente no que se refere a motilidade, capacitação, reação de acrossoma e capacidade de fertilização). A geração de ROS também pode ter um efeito patológico no gameta masculino, se em excesso, ou se há um desequilíbrio com as defesas antioxidantes disponíveis, resultando numa diminuição da viabilidade, motilidade, integridade de membrana e aumentos em danos no DNA, defeitos morfológicos e peroxidação de lipídeos, resultando possivelmente num fenômeno semelhante a apoptose (AITKEN *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*, 2013; KOPPERS *et al.*, 2008; KOTHARI *et al.*, 2010; MAHFOUZ *et al.*, 2010). Em nosso estudo, observamos que nas doses de 2,5 e 5,0 mg TPT/kg os níveis de ROS se assemelharam com o grupo veículo, fato que pode estar associado a um possível aumento das defesas antioxidantes ou funcionalidade da mitocôndria. Porém, na dose 0,5 mg TPT/kg houve aumento de ROS, contudo aparentemente esta dose não causou dano suficientemente capaz de induzir o aumento de defesas antioxidantes, porém cabe ressaltar que nesta dose já foram evidenciados níveis reduzidos das motilidades total e progressiva, podendo haver uma relação entre os níveis de ROS e com a queda na motilidade.

Nossos dados de exposição durante o período de amamentação revelaram um aumento nos níveis de lipoperoxidação (LPO), observado nas doses de 2,5 e 5,0 mg TPT/kg, assim como nos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) nas doses de 0,5 e 2,5 mg TPT/kg. O processo de dano oxidativo, por LPO, ocorre principalmente através da produção de ROS que reagem com os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas celulares. Isto por sua vez, pode prejudicar a estrutura e a função celular, produzindo modificações nas propriedades da membrana, aumentando sua permeabilidade, eventualmente danificando membranas e outros tecidos (BERGAMINI *et al.*, 2004). No estudo realizado por Abdollahi *et al.* (2004), foi descrito que a LPO é um dos principais mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade induzida por pesticidas, que no caso do TPT, também promove interações com os fosfolipídeos da membrana celular (YE *et al.*, 2013), além de alterações nos elementos de resposta no DNA (KISHTA *et al.*, 2007; DELGADO FILHO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2006). Este conjunto de ações promove alterações no equilíbrio oxidativo celular. No estudo realizado por De Simplicio *et al.* (2000), foram avaliadas as atividades de enzimas antioxidantes em fígados e rins de coelhos e cordeiros, submetidos a exposição crônica ao TPT e foi verificado que houve uma queda nos níveis de glutathiona peroxidase dependente de selênio (Se-GPX) nas duas espécies, assim como nos de GPX renal de coelhos e de GST hepática de cordeiros. Estes resultados sugerem que a redução nos níveis de importantes enzimas antioxidantes, como GST e GPX, compõe parte do complexo mecanismo de toxicidade de TPT. Estes dados nos permitem inferir que os dados evidenciados em nosso estudo, referentes ao aumento ($P < 0,05$) nos níveis de LPO de 47,7% no grupo de 2,5 mg TPT/kg e de 45,4% no grupo 5,0 mg TPT/kg, sejam provavelmente decorrentes de mecanismos de inibição

da atividade de enzimas antioxidantes por alterações nos elementos de resposta do DNA em virtude da exposição ao TPT.

Os dados obtidos nos indivíduos expostos ao TPT durante a amamentação nos permitem inferir que as alterações evidenciadas são persistentes e podem ser até permanentes, visto que constatamos efeitos persistentes mesmo após dois ciclos da espermatogênese, tendo em vista que a exposição ao TPT foi suspensa no desmame aos 21 PND e somente foram analisados 79 dias após o término da exposição, aos 100 (± 5) PND. Estes dados divergem dos encontrados no estudo de Mello *et al.* (2015), que verificaram que a exposição ao TPT em filhotes durante o período de 15 a 45 PND, promoveu retardo no surgimento de marcos físicos de desenvolvimento e diminuição no número de espermatozoides e espermátides nas doses 7,5 e 15,0 mg TPT/kg/dia. Contudo, os autores relataram que indivíduos analisados após 20 dias do término da exposição, aos 65 PND, não apresentaram tais alterações, indicando que os efeitos tóxicos sobre as gônadas masculinas foram reversíveis com a interrupção do tratamento (MELLO *et al.*, 2015). Contudo, os dados de Mello *et al.* (2015) são referentes a uma exposição após os 15 PND, enquanto os nossos dados podem estar relacionados a danos ocorridos entre 1 e 15 PND, ainda cabe ressaltar que os resultados são referentes a análise histológica, enquanto os nossos buscaram análises funcionais da atividade espermática.

Cabe ressaltar que embora as doses que os filhotes foram expostos são muito baixas, tendo em vista que a exposição é através leite materno, onde a eliminação do TPT por essa via foi considerada extremamente baixa em outras espécies, como bovinos (SMITH, 1981) e humanos (MINO *et al.*, 2008), são capazes de promover diversas alterações na atividade espermática. Deste modo fica evidente que a exposição a doses

muito baixas de TPT nesta fase do desenvolvimento são extremamente relevantes na sua fisiologia reprodutiva, visto que diversos parâmetros espermáticos funcionais e estruturais apresentaram valores que correspondem a um prejuízo na atividade espermática. Dentre estes podemos destacar a motilidade espermática que é considerada um parâmetro fundamental na avaliação da atividade espermática, servindo como importante ferramenta na seleção de um ejaculado com maior eficácia de fertilização, e sendo o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal (COX *et al.*, 2006; VAN WEERT *et al.*, 2004; VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Com base nos dados obtidos de sobrevivência e análise espermática, podemos sugerir que a espécie *C. laucha* apresenta maior sensibilidade aos efeitos nocivos do TPT, do que outras espécies de roedores como ratos e camundongos, de modo que a exposição a este contaminante tanto na fase de desenvolvimento como na fase adulta, promove efeitos prejudiciais em parâmetros de atividade espermática. Sugerimos que doses $\geq 0,5$ mg TPT/kg sejam consideradas de relevância para reprodução em *C. laucha*, visto que a partir desta dose foram observadas alterações na atividade espermática, principalmente no que se refere a motilidade total e progressiva, integridade de membrana, funcionalidade de mitocôndria e níveis de ROS. Ainda, podemos concluir que as fêmeas da espécie *C. laucha* podem eliminar o TPT no leite materno, quando expostas por via oral, e a exposição dos filhotes via amamentação promove alterações negativas persistentes em diversos parâmetros da atividade espermática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE A. Pesticides and oxidative stress: A review. **Med. Sci. Monit.**, v.10, p.141-147, 2004.
- AITKEN, R.J.; NIXON, B.; LIN, M.; KOPPERS, A.J.; LEE, Y.H.; BAKER, M.A. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. **Asian Journal of Andrology** 9 554–564, 2007.
- AITKEN, R.J.; JONES, K.T.; ROBERTSON, S.A. Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health. **Jour of Andrology** v.33 p.1096–1106, 2012.
- AMARAL, A.; LOURENÇA, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality, **Society for Reproduction and Fertility** DOI: 10.1530/REP-13-0178, ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899 (online), 2013.
- ANVISA, 2004. http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2004.pdf
- AVERY, S.V., CODD, G.A., GADD, G.M. Biosorption of tributyltin and other organotin compounds by cyanobacteria and microalgae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 812–817, 1993.
- BERGAMINI, C. M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A.; CERVELLATI, C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Curr. Pharm. Des.**, v.10, p.1611-1626, 2004.
- BLUNDEN, S. J.; EVANS, C. J. The Handbook of Environmental Chemistry; Hutzinger, O., ed.; **Springer-Verlag**: Berlim, vol. 3, 1990.

- BONARSKA-KUJAWA, D.; KLESZCZYŃSKA, H.; PRZESTALSKI, S. The location of organotins within the erythrocyte membrane in relation to their toxicity, **Ecotoxicol. Environ. Saf.** V. 78, p. 232–238, 2012.
- BRANIGAN, E.F.; ESTES, M.A.; MULLER, C.H. Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. **Fertil Steril.** V. 11, p. 547–551, 1999.
- CAO, D., JIANG, G., ZHOU, Q., YANG, R. Organotin pollution in China: an overview of the current state and the potential health risk. **J. Environ. Manage**, S16–S24, 2009.
- CE. The European Community, 2003. Regulation (EC) No. 782/2003 of the European Parliament and of the Council of 14 April 2003 on the Prohibition of Organotin Compounds on Ships. Off. **J. Eur. Union**: L 115/1. Disponível em: http://europa.eu/index_en.htm
- CHAUHAN, A.; AGARWAL, M. Toxicological Studies of Orally Administered Triphenyltin Complex [(C₆H₅)₃Sn(Sal. Benz. H.)] on the Reproductive Organs of Male Albino Rats. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 868-884, 2009.
- CHERNOFF, N., SETZER, R. W., MILLER, D.B., ROSEN, M.B. AND ROGERS, J.M. Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. **Teratology**, 42: 651-658, 1990.
- COLARES, E.P. Aspectos da fisiologia reprodutiva de Calomys laucha OLFERS, 1818 (Mammalia: Rodentia). USP – São Paulo. **Tese de Doutorado**. 1997.

- COONEY, J.J., WUERTZ, S. Toxic effects of tin compounds on microorganisms. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, p. 375–402, 1989.
- CORDOBA, M.; MORA, N.; BECONI M.T. 2006 Respiratory burst and NAD(P)H Oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Theriogenology** 65 882–892, 2006.
- COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p.860-867, 2006.
- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol Reprod**, v.59, p 7-11, 1998.
- DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN F, J.R. Pesticide use and poisoning among farmers from the county of Patydo Alferes, Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. Jan-Feb; 20(1):180-6, 2004.
- DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P.F.I.; PODRATZ P. L.; GRACEL J. B. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Braz J Med Biol Res**, v. 44(9), p. 958-965, 2011.
- DE SIMPLICIO, P.; DACASTO, P.; CARLETTI, M.; GIANNERINI, F.; NEBBIA, C. Changes in hepatic and renal glutathione-dependent enzyme activities in rabbits and lambs subchronically treated with triphenyltin acetate. **Vet Hum Toxicol**. v. 42, n.3, p.159-62, 2000.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal

red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. **Reprod Dom Anim.** v.46, p.393–403, 2011.

DUFT, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; TILLMANN, M.; MARKERT, B.; OEHLMANN, J. Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mud snail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. **Environ Toxicol Chem**, v. 22, p. 145–152, 2003.

ECOBICHON, D.J. Toxic effects of pesticides. In: KLASSEN, C.D. **Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons.** New York: McGraw-Hill, p. 643-689, 1996.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill JD, editor. New York: Raven Press. **The Spermatozoon**; p. 29–77, 1994

EPA. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C). **Reregistration Eligibility Decision (RED) – Triphenyltin Hydroxide (TPTH)**, EPA. 738-R-99-010, September, 1999.

FAO Pesticide residues in food — 1991. Evaluations, Part I — Residues. Rome, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, pp. 337–371 (FAO Plant Production and Protection Paper 113/1), 1991.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology** 26: 1-117, 1996.

FENT, K., HUNN, J. Phenyltins in water, sediment, and biota of freshwater marinas. **Environ. Sci. Technol.**, v. 25, p. 956–963, 1991.

- FENT, K., MEIER, W. Tributyltin-induced effects on early life stages of minnows *Phoxinus phoxinus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 22, p. 428–438, 1992.
- FENT, K., MEIER, W. Effects of triphenyltin on fish early life stages. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 27, p. 224–231, 1994.
- FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. **Theriogenology**, 80: 400–10, 2013.
- FIGUEROA, E.; MERINO, O.; RISOPATRÓN, J.; ISACHENKO, V.; SÁNCHEZ, R.; EFFER, B.; ISACHENKO, E.; FARIAS, J.G.; VALDEBENITO, I. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmosalar*) sperm vitrification. **Theriogenology**, 83: 238–245, 2015.
- FITAS, A.L.; AMARAL, D.; LOPES, L. Aromatase inhibitors in male adolescents with idiopathic short stature. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, V9 (1), p. 53-58, 2014.
- FORGET, G. Pesticides: necessary but dangerous poisons. **Internationals Development Research Center Report**, 18: 4-5, 1989.
- GADELLA, B.M.; TSAI, P.S.; BOURKE, A.; BREWIS, I.A. Sperm head membrane reorganization during capacitation. **Int J Dev Biol**, v.52, p.473, 2008.
- GAIDO, K.; DOHME, L.; WANG, F.; CHEN, I.; BLANKVOORT, B.; RAMAMOORTHY, K. & SAFE, S. Comparative estrogen activity of wine extracts and organochlorine pesticide residues in food. **Environmental Health Perspectives**, 106 (Sup. 6):1347-1351, 1998.

- GAO, J.; YE, J.; MA, J.; TANG, L.; HUANG, J. Biosorption and biodegradation of triphenyltin by *Stenotrophomonas maltophilia* and their influence on cellular metabolism. **Journal of Hazardous Materials**. v. 276, p. 112–119, 2014.
- GEORGE, S.G., BUCHANAN, G. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 8, p. 437–449, 1990.
- GIBBS, P.E., BRYAN, G.W., PASCOE, P.L., BURT, G.R. The use of dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. **J. Mar. Biol. Assoc. UK** 67, 507–523, 1987.
- GODOI, A.F.L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M.. Environmental contamination for organotin compounds. **Quím. Nova**, v. 26, n. 5, 2003.
- GOLDMAN, J. M.; LAWS, S. C.; BALCHAK, S. K.; COOPER, R. L. & KAVLOK, R. J. Endocrine-Disrupting Chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**. v.30 (2), p.135-196, 2000.
- GOMEZ-ARIZA, J.L., MORALES, E., GIRALDEZ, I. Spatial distribution of butyltin and phenyltin compounds on the Huelva coast (southwest Spain). **Chemosphere** 37, 937–950, 1998.
- GROTE, K.; STAHLSCHMIDT, B.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p. 145–158, 2004.

- GROTE, K.; HOBLER, C.; ANDRADE, A.J.; GRANDE, S.W.; GERICKE, C.; TALSNESS, C.E. APPEL, K.E; CHAHOUD, I. Sex differences in effects on sexual development in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride, **Toxicology**, v. 260, n.1-3, p. 53-59, 2009.
- GUARD, H. E., COBET, A. B. AND COLEMAN, W. M. Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. **Science**, 213: 770-771, 1981.
- HALLAS, L.E.; MEANS, J.C.; COONEY, J.J. Methylation of tin by estuarine microorganisms. **Science** 215(4539):1505–1507, 1982.
- HOBLER, C.; ANDRADE, A.J.M.; GRANDE, S.W.; GERICKE, C; TALSNESS, C.E.; APPEL, K.E.; CHAHOUD, I.; GROTE, K. Sex-dependent aromatase activity in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride. **Toxicology**. v. 276, p. 198–205, 2010.
- HOCH, M. Organotin compounds in the environment: an overview. **Appl Geochem** 16(7–8):719–743, 2001.
- HORIGUCHI, T., SHIRAISHI, H., SHIMIZU, M., MORITA, M. Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. Bronni* in Japan. **J. Mar. Biol. Assoc. UK** 74, 651–669, 1994.
- JENKINS, J.A.; DRAUGELIS-DALE, R.O.; PINKNEY, A.E.; IWANOWICZ, L.R.; BLAZER, V.S. Flow cytometric method for measuring chromatin fragmentation in fixed sperm from yellow perch (*Percaflavescens*). **Theriogenology**, 83: 920–931, 2015.

JONES-LEPP, T.L.; VARNER, K.E.; HEGGEM, D. Monitoring dibutyltin and triphenyltin in fresh waters and fish in the United States using microliquidchromatography–electrospray/ion trap mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 46, 90–95, 2004.

LYSSIMACHOU, A.; NAVARRO, J.C.; BACHMANN, J.; PORTE, C. Triphenyltin alters lipid homeostasis in females of the ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. **Environ Pollut**, v. 157, p. 1714–1720, 2009.

HORIGUCHI, T.; SHIRAISHI, H.; SHIMIZU, M.; MORITA, M. Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. **Environ Pollut**, v. 95, p. 85–91, 1997.

HORIGUCHI, T. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. **Environ. Sci.** 13(2), 77–87, 2006.

HU, J., ZHANG, Z., WEI, Q., ZHEN, H., ZHAO, Y., PENG, H., WAN, Y., GIESY, J.P., LI, L., ZHANG, B. Malformations of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, and its causal agent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.106, p. 9339–9344, 2009.

IMO. International Marine Organization. **Convenção sobre o Controle de Sistemas Antiincrustantes Nocivos em Navios (Convenção AFS)**. 2001. Disponível em: <http://www.imo.org>

KANNAN, K.; TANABE, S. Global contamination by organotin compounds. In: ARAI, T.; HARINO, H.; OHJI, M.; LANGSTON, W.J. **Ecotoxicology of antifouling biocides**. Springer, Tokyo, p. 39–60, 2009.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DE ROSA, C.; FLUNER-CRISP, P.; KAATARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, M.; SINK, T. & TILSON, H. A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, 104(Sup. 4):715-740, 1996.

KISHTA, O.; ADEEKO, A.; LI D.; LUU, T.; BRAWER, J.R.; MORALES, C. In utero exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. **Reprod Toxicol**, v. 23 p. 1-11. 40, 2007.

KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; MCLAUGHLIN, E.A.; AITKEN; R.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, p.3199–3207, 2008.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; DU PLESSIS, S.S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48 p.425–435, 2010.

KOTAKE, Y. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 1876–1880, 2012.

LEUNG, K.M.Y., WHEELER, J.R., MORRITT, D., CRANE, M. Endocrine disruption in fishes and invertebrates: issues for saltwater ecological risk assessment. In: Newman, M.C., Roberts, M.H., Jr., Hale, R.C. (Eds.), **Coastal and Estuarine Risk Assessment**. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 189–216, 2001.

- LIU, Q.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, X.; XU, S.; MA, D.; XIAO, Z.; XIAO, Y.; LI, J. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. **Fish Physiol Biochem**, 41:413–422, 2015.
- MALA, N. Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: a review. **Appl Organomet Chem** 22(10):598–612, 2008.
- MAHFOUZ, R.Z.; DU PLESSIS, S.S.; AZIZ, N.; SHARMA, R.; SABANEKH, E.; AGARWAL, A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v.93 p.814–821, 2010.
- MATTHIESSEN, P. Detection, monitoring, and control of tributyltin: an almost complete success story. **Environ Toxicol Chem** 32(3):487–489. doi:10.1002/etc.2108, 2013.
- MELLO, M.S.C.; DELGADO, I.F.; FAVORETO, A.O.A.; LOPES, C.M.T.; BATISTA, M.M.; KEMPINAS, W.D.G.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Sexual maturation and fertility of mice exposed to triphenyltin during prepubertal and pubertal periods. **Toxicology reports**, v.2, p. 405-414, 2015.
- MENG, P.J.; LIN, J.; LIU, L.L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **J Environ Manage**; 90 (Suppl 1): S8-S15, 2009.
- MILLS, J.N.; ELLIS, B.A.; CHILDS, J.E.; MAIZTEGUI, J.L.; CASTRO-VASQUEZ, A. Seasonal changes in mass and reproductive condition of the corn mouse (*Calomys musculus*) on the Argentine pampa. **J. Mammal.**, v.73, p. 876-884, 1992.

- MINO, Y.; AMANO, F.; YOSHIOKA, T.; KONISHI, Y. Determination of Organotins in Human Breast Milk by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. **Journal of Health Science**, v. 54, n. 2, p. 224-228, 2008.
- MIURA, Y., MATSUI, H. Inhibitory effects of phenyltin compounds on stimulus induced changes in cytosolic free calcium and plasma membrane potential of human neutrophils. **Arch. Toxicol.**, v. 65, p. 562–569, 1991.
- MIZUKAWA, H.; TAKAHASHI, S.; NAKAYAMA, K.; SUDO, A.; TANABE, S. Contamination and accumulation feature of organotin compounds in common cormorants (*Phalacrocorax carbo*) from Lake Biwa, Japan. In: Obayashi, Y., Isobe, T., Subramanian, A., Suzuki, S., Tanabe, S. (Eds.), The Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, **Environmental Research in Asia**. TERRAPUB. pp. 153–161, 2009.
- MOONEY, H.M., PATCHING, J.W. Triphenyltin inhibits photosynthesis and respiration in marine microalgae. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 14, p. 265–270, 1995.
- MORTIMER, S.T. CASA- Practical aspects. **J Androl**, p.515-524, 2000.
- MPRS. Ministério Público do Estado do Rio Grande do Sul. Justiça proíbe uso de de agrotóxico Mertin 400 em lavouras de arroz irrigado no RS. Disponível em: <https://www.mprs.mp.br/ambiente/noticias/id43687.html>. Acesso em 20 de abril de 2017
- PALM, W.U.; KOPETZKY, R.; RUCK, W. OH-radical reactivity and direct photolysis of triphenyltin hydroxide in aqueous solution, **J. Photochem. Photobiol.** v. 156, p. 105–114, 2003.

PELLICCIONE, F.; MICILLO, A.; CORDESCHI, G.; D'ANGELI, A.; NECOZIONE, S.; GANDINI, L.; LENZI, A.; FRANCAVILLA, F.; FRANCAVILLA, S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained as the no zoospermia. **Fertility and Sterility** 95 641–646, 2011.

PETRUNKINA, A.M.; VOLKER, G.; BRANDT, H.; TOPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. **Theriogenology**. v. 64 p. 1766–1782, 2005.

RAMIO-LLUCH, L.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; PENA, A.; COLAS, C.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T.; RAMIREZ, A.; CONCHA, I.I.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. 'In vitro' capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. **Reproduction in Domestic Animals** 46 664–673, 2011.

REDDY, P. S.; PUSHPALATHA, T.; SREENIVASULA REDDY, P. Reduction of spermatogenesis and steroidogenesis in mice after fentin an fenbutatin administration. **Toxicology Letters**. V. 166, Iss 1, p. 53-59, 2006.

RÜDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.56, p. 180–189, 2003.

RURANGWA, E.; BIEGNIIEWSKA, A.; SLOMINSKA, E.; SKORKOWSKI, E.F.; OLLEVIER, F. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant

reduced spermatozoa motility. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 131, p. 335–344, 2002.

SARPA, M. Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos/ Marcia Sarpa de Campos Mello. XXIII, p. 131. **Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**, 2007.

SCHULTE-OEHLMANN, U., TILLMANN, M., MARKERT, B., OEHLMANN, J., WATERMANN, B., SCHERF, S. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xenoandrogen. **Ecotoxicology**, v.9, p.399–412, 2000.

SEKIZAWA, J. World Health Organization (WHO). Triphenyltin Compounds. **Concise International Chemical Assessment Document 13**, Geneva, 1999.

SEMLITSCH, R.D., FOGLIA, M., MUELLER, A., STEINER, I., FIORAMONTI, E., FENT, K. Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding behaviour of tadpoles. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 14, p. 1419–1423, 1995.

SHIM, W.J., HONG, S.H., KIM, N.S., YIM, U.H., LI, D., OH, J.R. Assessment of butyl- and phenyltin pollution in the coastal environment of Korea using mussels and oysters. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 51, p. 922–931, 2005.

SMITH, K.S. 14-C-TPTH residue levels in milk and tissues of lactating dairy cows. Cannon Laboratories, USA. **Report Project** of 7489, 1981. [cited in FAO, 1991].

- SNOW, R. L.; HAYS, R. L. Phasic distribution of seminiferous tubules in rats treated with triphenyltin compounds. **Bull Environ. Contam. Toxicol.** 31, 658–665, 1983.
- SONAK S, PANGAM P, GIRIYAN A, HAWALDAR K Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **J Environ Manag** 90(1): S96–S108, 2009.
- STAEB, J.A.; FRENA, Y. M.; FRERIKS. I.L.; BRINKMAN, U.A.T.; COFINO, W.P. Survey of nine organotin compounds in the Netherlands using the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) as biomonitor. **Environmental toxicology and chemistry**, 14(12):2023–2032, 1995.
- STAEB, J.A.; TRAAS, T.P.; STROOMBERG, G.; VAN-KESTEREN, J.; LEONARDS, P.; VAN-HATTUM, B.; BRINKMAN, U.A.; COFINO, W.P. Determination of organotin compounds in the foodweb of a shallow freshwaterlake in the Netherlands. **Archives of environmental contamination and toxicology**, 31(3):319–328, 1996.
- SUBRAMANYAM, B. Chemicals used on Four Crops in Minnesota During 1991. University of Minnesota, **Station Bulletin n. 603**, 1993. Disponível em: <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/DC6235.html>
- TAKAHASHI, S.; MUKAI, H.; TANABE, S.; SAKAYAMA, K.; MIYAZAKI, T.; MASUNO, H. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. **Environ Pollut**; 106: 213-218, 1999.
- VAN WEERT, J.M.; REPPING, S.; VAN VOORHIS, B.J.; VAN DER VEEN, F.; BOSSUYT, P.M.; MOL, B.W. Performance of the postwash total motile sperm

count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis. **Fertil Steril.**; v. 11, p. 612–620, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VIANA, V.G. Investigação de possíveis danos funcionais causados pela exposição pré-natal ao trifenil hidróxido de estanho (TPTH). **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública – FIOCRUZ**, 2002.

WANG, B.A.; LI, M.; MU, Y.M.; LU, Z.H.; LI, J. Y. Effects of tributyltin chloride (TBT) and triphenyltin chloride (TPT) on rat testicular Leydig cells. **Zhonghua Nan Ke Xue - National Journal of Andrology**, v. 12, p. 516- 519, 2006.

WHO. Concise International Chemical Assessment Document 13. Triphenyltin Compounds. **World Health Organization**. Geneva, 1999.

YE, J.S.; YIN, H.; PENG, H.; BAI, J. Q.; XIE, D.P.; WANG, L.L. Biosorption and biodegradation of triphenyltin by *Brevibacillus brevis*, **Bioresour. Technol.** V. 129, p. 236–241, 2013.

YI, A.X.; LEUNG, K.M.Y.; LAM, M.H.W.; LEE, J.S.; GIESY, J.P. Review of measured concentrations of triphenyltin compounds in marine ecosystems and meta-analysis of their risks to humans and the environment. **Chemosphere**, v. 89, p. 1015–1025, 2012.

YUAN, J.; ZANG, X. L.; YU L.; SUN, Z.; ZHU, P.; WANG, X. H. Stage-specific malformations and phenotypic changes induced in embryos of amphibian (*Xenopus tropicalis*) by triphenyltin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.7, p. 1960–1966, 2011.

ANEXO 1

PARECER Nº P060/2014

PROCESSO Nº	23116.004921/2014-53
CEUA Nº	Pq017/2014
UNIDADE	ICB
TÍTULO DO PROJETO	Efeitos da exposição ao pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) na reprodução e no desenvolvimento pós natal de <i>Calomys laucha</i> Olfers, 1818 (Rodentia: Muridae)
NÚMERO DE ANIMAIS E VIGÊNCIA	350 animais (<i>Calomys laucha</i>) Vigência: 28/02/2017
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Março de 2017
PROFESSOR RESPONSÁVEL	Elton Pinto Colares

PARECER DA CEUA:

Após a análise do conteúdo do processo, o protocolo experimental utilizando animais foi considerado APROVADO, pois cumpre o disposto na Lei no 11.794, nas demais normas aplicáveis e nas Resoluções Normativas e Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

Rio Grande, 17/09/2014.

Profa. Dra. Ana Paula Horn
Coordenadora da CEUA-FURG