



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JAMISON CORDEIRO DIAS

**EFEITOS DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E
HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS**

BRASÍLIA-DF

2015

JAMISON CORDEIRO DIAS

EFEITOS DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E
HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr^a. Angélica Amorim Amato

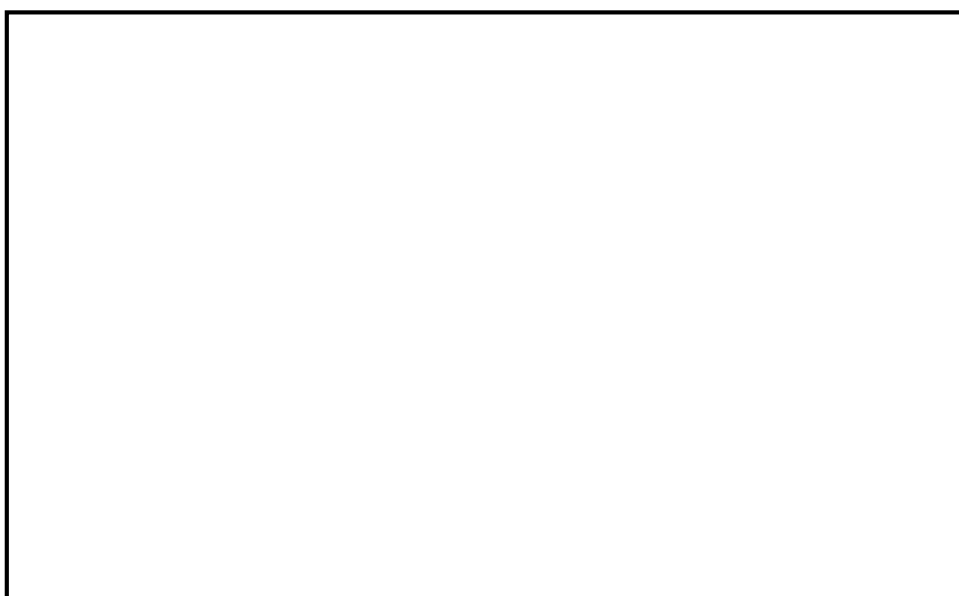
Co-orientadora: Profa. Dr^a. Michella Soares Coelho

BRASÍLIA-DF

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação



Jamison Cordeiro Dias

EFEITOS DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Angélica Amorim Amato - Universidade de Brasília

Profa. Djane Braz Duarte - Universidade de Brasília

Prof. Felipe Saldanha de Araújo - Universidade de Brasília

Profa. Yris Maria Fonseca-Bazzo – Universidade de Brasília

Dedico este trabalho ao meu bondoso Deus, a minha esposa Luiza Karla que não mediu esforços para estar ao meu lado e por sempre me apoiar em tudo, aos meus pais José Olavo e Maria Guadalupe que sempre me incentivaram em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho, pessoas estas que foram pontuais para a conclusão desse trabalho! Aos meus pais, José Olavo e Maria Guadalupe, que sempre acreditaram em minha capacidade, meu eterno agradecimento. A minha querida esposa, Luiza Karla, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me incentivando e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Você também faz parte dessa conquista. A minha filha Marry Hillary, que mesmo distante, me incentiva e me enche de orgulho. Aos meus irmãos Henrique, Lidiana, Fabrícia, Geisiane, Igor e Pakollo, meus sinceros agradecimentos. Ao meu grande amigo (*in memoriam*), Vitor Mancilha, um exemplo de superação e esperança.

À Profa. Dr.^a Angélica Amorim Amato (UnB - Farmol), minha orientadora, um verdadeiro exemplo de profissional, sempre comprometida em perpetuar o conhecimento, compartilhando-o de forma brilhante e exponencial.

À Profa. Dr.^a Michella Coelho, minha co-orientadora, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Por sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me ensinando conhecimentos essenciais para a realização desse trabalho.

Quero deixar meus agradecimentos a Fernanda, que desde o início me ajudou muito em tudo. A Carol, parceira de bancada que contribuiu de forma pontual. Ao meu amigo Camaronês Martin Fonkoua, a todos os estagiários do Farmol, a Glorinha da histologia e as secretarias da pós-graduação.

Amigos e professores que pensam de formas tão distintas, enriqueceu significativamente a minha formação. Agradeço a enorme diversidade que me rodeia que, apesar de me desorientar às vezes, me ajuda a captar diferentes olhares sobre o mesmo prisma. A todos os professores do Farmol, obrigado pelos ensinamentos.

“O dado mais importante que separa o ser humano de todos os seus semelhantes na escala filogenética é o conhecimento. Somente o conhecimento liberta o homem.”

Dr. Enéias Ferreira Carneiro.

RESUMO

O nonilfenol (NP) é um produto da degradação microbiana dos etoxilatos de alquilfenol utilizado na indústria de surfactantes não iônicos, lubrificantes, antioxidantes, detergentes, tintas, inseticidas e herbicidas, além de ser um estabilizador de polímeros plásticos. Devido à ausência de tratamento dos resíduos destas indústrias, ou dos resíduos domésticos, é amplamente encontrado na água, inclusive na água potável. O NP é considerado um desregulador endócrino (DE) com atividade estrogênica bem estabelecida, e recentemente foi identificado também seu potencial obesogênico em cultura e modelos animais submetidos a exposição durante o desenvolvimento. Entretanto, o efeito da exposição concorrente ao NP sobre o desenvolvimento de obesidade e distúrbios metabólicos a ela associados foi pouco explorado. Assim, o objetivo deste estudo foi de investigar o efeito da exposição ao NP, desde o desmame até a vida adulta, sobre a massa corporal, adiposidade e homeostase da glicose em camundongos Swiss, e também o efeito da exposição ao NP, somente na vida adulta, sobre estas mesmas variáveis. Para tanto, vinte camundongos Swiss machos alimentados com dieta padrão (normolipídica) foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos com cinco animais cada, sendo G1= controle (veículo), G2= tratamento com 0,05 mg/kg/d de NP da 6^a à 20^a semana de vida (do desmame à vida adulta), G3= tratamento com 0,25 mg/kg/d de NP da 6^a à 20^a semana de vida (do desmame à vida adulta) e G4 = tratamento com 0,25 mg/kg/d de NP da 14^a à 20^a semana de vida (na vida adulta). O NP foi administrado na água de beber. Foi avaliado o efeito deste DE sobre a massa corporal, massa de depósitos de tecido adiposo, homeostase da glicose, consumo de dieta, consumo hídrico, perfil lipídico, concentração sérica de enzimas hepáticas e características histológicas do tecido adiposo e fígado dos camundongos. Não foi observada modificação significativa da massa corporal dos animais tratados com NP, independentemente da dose e do tempo de exposição, embora tenha sido verificada tendência de menor peso em todos os grupos tratados com NP. Não foi observada também modificação do consumo de dieta. A glicemia de jejum, avaliada na 14^a e 18^a semanas de vida, não se modificou em resposta à exposição ao NP, ao passo que a tolerância à glicose aumentou na 18^a semana, após 12 semanas de tratamento com NP na dose de 0,25 mg/kg/d. Não houve modificação da sensibilidade insulínica analisada pelo teste de tolerância à insulina. Não houve, ainda, modificação do perfil lipídico e da concentração sérica de transaminases. Foi observada redução de massa adiposa subcutânea inguinal e aumento do diâmetro dos adipócitos neste tecido, nos grupos tratados com a maior dose de NP (G3 e G4). Foi observado ainda aumento do acúmulo intracelular de lipídeos no tecido adiposo marrom interescapular e no fígado. A massa dos rins e do coração não se modificou em resposta à exposição ao NP. Os achados do presente estudo sugerem que a exposição crônica ao NP, a partir do desmame, não apresenta efeito obesogênico e que possa melhorar a tolerância à glicose sem modificar a resistência insulínica, embora pareça aumentar a deposição de lipídeos em tecidos chave da ação da insulina.

Palavras-chave: desregulador endócrino; nonilfenol; obesidade; tolerância à glicose.

ABSTRACT

Nonylphenol (NP) is the result of microbial degradation of alkylphenol ethoxylates (NP) used in manufacturing non-ionic surfactants, emulsifiers, anti-oxidants, detergents, paints, pesticides, herbicides, in addition to being a stabilizer of plastic polymers. Due to the absence of treatment of residues from these industries and of domestic residues, it is widely present in water, including drinkable water. NP is an endocrine disruptor (ED) with well-established estrogenic activity, and its obesogenic potential was recently described in cell culture and in rodent models exposed to NP during the developmental stage. However, the effect of concurrent exposure to NP outside the developmental stage on body weight and metabolic disturbances remains largely unexplored. In this scenario, the aim of this study was to investigate the effect of exposure to NP, since weaning until adult life, on body weight, adiposity and glucose homeostasis in male Swiss mice, and also the effect of exposure limited to adult life on these variables. Twenty mice fed control chow (normolipidic) were randomly assigned into four groups, G1 = control (vehicle), G2 = treatment with NP 0,05 mg/kg/d from the 6th to the 20th week of life (from weaning until adult life), G3 = treatment with NP 0,25 mg/kg/d from the 6th to the 20th week of life (from weaning until adult life), and G4 = treatment with NP 0,25 mg/kg/d from the 14th to the 20th week of life (in adult life). NP was administered in drinking water and the following variables were investigated: body weight, adiposity, glucose homeostasis, energy consumption, water consumption, lipid profile, serum levels of liver enzymes and histological features of adipose tissue and liver. No significant body weight change was seen in response to NP exposure, independently of the dose and the exposure time. However, there was a trend towards weight reduction in all groups exposed to NP, without change in energy consumption. Fasting blood glucose levels assessed at the 14th and 18th weeks did not change in response to exposure to NP, although there was an increase in glucose tolerance at the 18th weeks, after 12 weeks of exposure to 0,25 mg/kg/d of NP. There was no change in insulin sensitivity assessed by insulin tolerance test, and there was also no change in lipid profile or serum levels of liver enzymes. Mice exposed to the higher dose of NP (G3 and G4) exhibited a decrease in inguinal adipose mass and an increase in adipocyte diameter at this depot. There was also an increase in lipid accumulation in the liver and interscapular brown adipose tissue. Kidney or heart mass did not change in response to exposure to NP. The findings from the present study suggest that chronic exposure to NP, since weaning, does not have an obesogenic effect and that it may even improve glucose tolerance without changing insulin sensitivity in mice fed a control diet, although increasing lipid accumulation in key sites of insulin action.

Key-words: endocrine disruptor; nonylphenol; obesity; glucose tolerance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Sistema endócrino humano | 17 |
| Figura 2 – Mecanismo de ligação ao receptor, sinalização e resposta celular, para os hormônios lipofílicos, representados na imagem pelos hormônios esteroides | 18 |
| Figura 3 – Fontes de exposição e contaminação com os desreguladores endócrinos . | 24 |
| Figura 4 – Estrutura química do 4-nonilfenol | 25 |
| Figura 5 – O NP não modifica o peso corporal de camundongos Swiss | 39 |
| Figura 6 – O NP não modifica o ganho de peso corporal de camundongos Swiss | 40 |
| Figura 7 – O NP não modifica a ingestão média diária de dieta de camundongos Swiss | 41 |
| Figura 8 – Efeito do NP sobre a ingestão hídrica média diária de camundongos Swiss | 42 |
| Figura 9 – O NP não modifica a glicemia de jejum de camundongos Swiss | 43 |
| Figura 10 – Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de glicose em camundongos Swiss | 44 |
| Figura 11 – O NP não modifica a glicemia de jejum de camundongos Swiss | 45 |
| Figura 12 – Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de glicose em camundongos Swiss..... | 46 |
| Figura 13 – Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de insulina em camundongos Swiss | 47 |
| Figura 14 – Efeito do NP sobre a concentração sérica de transaminases de camundongos Swiss | 48 |
| Figura 15 – Efeito do NP sobre o perfil lipídico de camundongos Swiss | 49 |
| Figura 16 – Efeito do NP sobre a massa de tecido adiposo branco visceral | 50 |
| Figura 17 – Efeito do NP sobre a massa de tecido adiposo branco subcutâneo inguinal de camundongos Swiss | 50 |
| Figura 18 – Efeito do NP sobre a massa de tecido adiposo marrom interescapular de camundongos Swiss | 51 |
| Figura 19 – Efeito do NP sobre a massa de diferentes órgãos | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 – Efeito do NP sobre características histológicas do tecido adiposo marrom interescapular de camundongos Swiss | 53 |
| Figura 21 – Efeito do NP sobre características histológicas do fígado de camundongos | 54 |
| Figura 22 – Efeito do NP sobre características histológicas do tecido adiposo branco inguinal de camundongos | 55 |
| Figura 23 – Efeito do NP sobre características histológicas do tecido adiposo branco epididimal de camundongos | 56 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de alguns compostos classificados como desreguladores endócrinos 23

Tabela 2 – Descrição dos componentes da dieta padrão 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: alanina aminotransferase

AST: asparto aminotransferase

BPA: bisfenol A

DE: Desreguladores endócrinos

DNA: ácido desoxirribonucleico

HDL: *high density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)

kJ: kilojoule

LDL: *low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

mL: mililitro

NP: nonilfenol

pH: potencial hidrogenioiônico

RNA: ácido ribonucleico

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 1.1 O sistema endócrino | 16 |
| 1.1.2 Classificação dos hormônios | 17 |
| 1.1.3 Ação hormonal | 19 |
| 1.1.4 Mecanismos de desregulação do sistema endócrino | 20 |
| 1.2 Desreguladores endócrinos | 21 |
| 1.2.1 Vias de exposição humana aos desreguladores endócrinos | 23 |
| 1.3 Nonilfenol | 25 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 30 |
| 3 OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 Objetivo geral | 31 |
| 3.2 Objetivos específicos | 31 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 Considerações éticas | 32 |
| 4.2 Modelo animal e dieta | 32 |
| 4.3 Delineamento experimental | 33 |
| 4.3.1 Glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina..... | 35 |
| 4.3.2 Eutanásia, coleta de sangue e retirada de amostras teciduais | 36 |
| 4.4 Determinações bioquímicas | 36 |
| 4.5 Análise histológica | 36 |
| 4.6 Fixação do tecido adiposo e hepático | 36 |
| 4.7 Inclusão em parafina | 37 |
| 4.8 Corte no micrótomo | 37 |
| 4.9 Coloração com hematoxilina-eosina | 37 |
| 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 38 |

| | |
|--|----|
| 6 RESULTADOS | 39 |
| 6.1 Efeito do tratamento com nonilfenol sobre o peso corporal, ingestão de dieta e ingestão hídrica | 39 |
| 6.2 Efeito do nonilfenol sobre a homeostase da glicose | 43 |
| 6.3 Efeito do nonilfenol sobre a concentração sérica de transaminases e sobre o perfil lipídico | 47 |
| 6.4 Efeito do nonilfenol sobre a massa de diferentes depósitos de tecido adiposo e sobre a massa do fígado | 49 |
| 6.5 Efeitos do nonilfenol sobre características histológicas do tecido adiposo e do fígado | 53 |
| 7 DISCUSSÃO | 57 |
| 8 CONCLUSÃO | 64 |
| REFERÊNCIAS | 65 |
| ANEXOS | 78 |

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O SISTEMA ENDÓCRINO

O sistema endócrino está presente nos organismos multicelulares e é responsável pelo controle da diferenciação e função de praticamente todas as células e em processos fisiológicos como crescimento e desenvolvimento, diferenciação sexual, reprodução e manutenção da homeostase (BIRKETT et al., 2003; GUYTON et al., 2006). É formado por um conjunto de glândulas produtoras de hormônios, muitas das quais são reguladas por hormônios tróficos secretados pela hipófise, a qual estabelece a ligação entre o sistema endócrino e o sistema nervoso (hipotálamo). Esta ligação compreende complexa rede de mensagens químicas que responde a sinais internos e externos para regular a homeostase (NOGUEIRA, 1999).

Há grande variedade de glândulas e hormônios (Figura 1). A alteração da síntese e secreção destes últimos pode modificar funções e características de órgãos e sistemas, principalmente em períodos críticos do crescimento e da formação dos órgãos e tecidos, nomeadamente durante a fase embrionária e nos primeiros anos de vida do indivíduo (NUSSEY et al., 2001; NELSON et al., 2004).

Em condições fisiológicas, um determinado hormônio atua sobre células específicas, denominadas células alvo, que podem representar desde a célula que o produziu até células situadas em locais distantes. As células alvo correspondentes a determinado hormônio possuem, na membrana, citoplasma ou núcleo, proteínas denominadas receptores hormonais, capazes de se combinar especificamente com os hormônios (ALVES et al., 2007). Apenas quando ocorre a combinação correta, as células alvo exibem respostas características da ação hormonal (ALVES et al., 2007).

Os hormônios não são exclusivos dos seres humanos. Estão presentes na natureza, tanto em espécies animais, como em vegetais. Nos organismos vertebrados existe bastante semelhança entre os hormônios existentes nas diversas espécies, quer nas suas características estruturais, quer na função que desempenham. Nos vegetais, embora existam diferenças de estrutura e função, o mecanismo de ação é semelhante. Esta é a razão pela qual qualquer substância que interfira no mecanismo de ação hormonal pode alterar o desenvolvimento, a reprodução e outras funções dos seres vivos das diversas espécies (LOZANO et al., 2000).

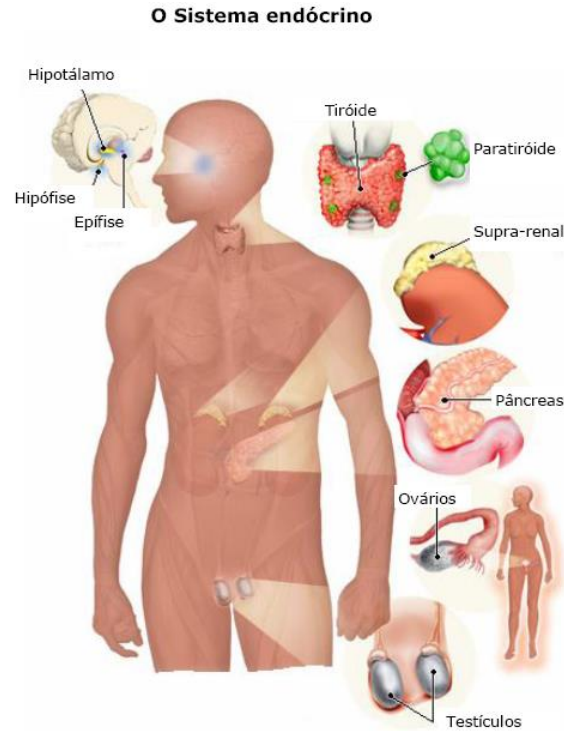


Figura 1 - O sistema endócrino humano. Representação das glândulas endócrinas do homem e mulher (Adaptado de: Anatomy of the endocrine system. Disponível em: >[http://www.emedicinehealth.com/anatomy of the endocrine system/article](http://www.emedicinehealth.com/anatomy_of_the_endocrine_system/article)).

1.1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS

Os hormônios podem ser classificados de diversas formas, de acordo com critérios fisiológicos, anatômico-topográficos, químicos e bioquímicos. A classificação fisiológica considera o papel ou consequência da ação hormonal e, segundo ela, os hormônios podem ser classificados em digestivos, renais, sexuais e metabólicos. A classificação anatômico-topográfico, por sua vez, relaciona os hormônios com os órgãos e os tecidos em que são produzidos. A classificação segundo critérios químicos agrupa os hormônios de acordo com a sua natureza química; há, assim, hormônios derivados de aminoácidos (adrenalina), de natureza peptídica (subdivididos em oligopeptídeos, como a ocitocina, e peptídeos, como a insulina) e os hormônios lipídicos, nomeadamente os hormônios esteroides e os derivados dos ácidos graxos (eicosanoides). No grupo dos hormônios esteroides (lipídeos derivados do colesterol), encontram-se os esteroides sexuais (testosterona e progesterona) e os esteroides adrenais, como o cortisol. A classificação bioquímica agrupa os hormônios de acordo com seu mecanismo de atuação, que origina uma primeira divisão baseada na localização celular dos receptores. Também considera a natureza dos segundos mensageiros e das transformações originadas em consequência da ação hormonal (LOZANO et al.,2000).

Os hormônios também podem ser classificados quanto à sua solubilidade ou considerando os receptores aos quais se ligam. De acordo com a sua solubilidade, os hormônios podem ser classificados em lipossolúveis e hidrossolúveis. Esta forma de classificação indica igualmente a localização dos respectivos receptores hormonais (NUSSEY et al., 2001).

Os hormônios lipossolúveis (derivados de aminoácidos e esteroides) em geral atravessam a membrana celular mais facilmente devido à sua menor dimensão e natureza lipofílica. Circulam livremente nas células alvo e ligam-se a receptores específicos da superfamília de receptores nucleares, que podem estar localizados no citoplasma ou no núcleo, como representado na (Figura 2A) (PER-ERIK *et al.*, 1998; CAMPBELL et al., 2005; NUSSEY et al., 2001; NELSON et al., 2004). Os hormônios hidrossolúveis (proteínas), por sua vez, em geral interagem com receptores na superfície da membrana celular e, assim, iniciam uma cascata de sinalização intracelular, como representado na (Figura 2B) (PER-ERIK et al., 1998; NUSSEY et al., 2001; NELSON et al., 2004).

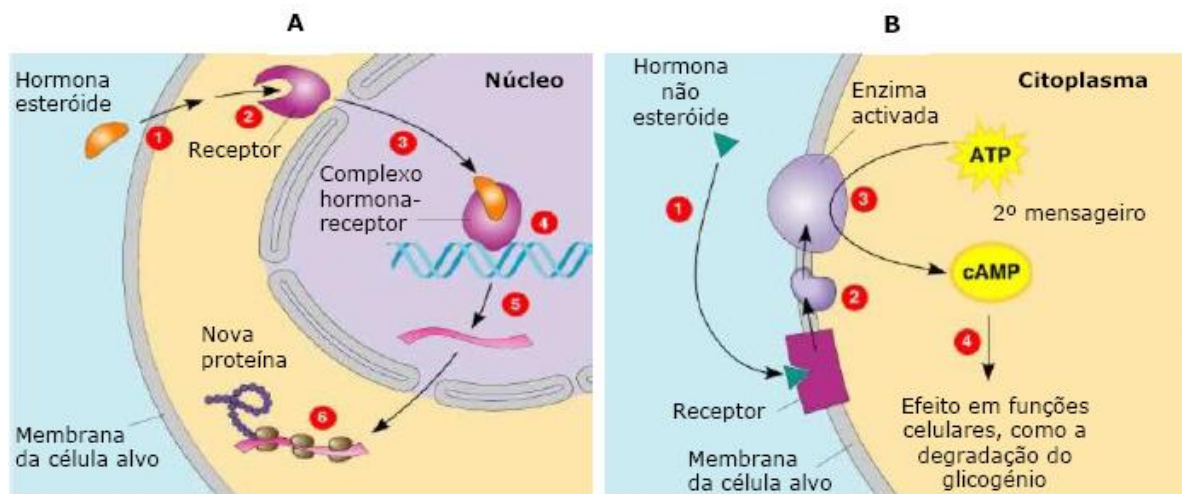


Figura 2 - Mecanismo de ligação ao receptor, sinalização e resposta celular, para os hormônios lipofílicos, representados na imagem pelos hormônios esteroides (A), e para hormônios não-esteroides (B). A. Os hormônios lipossolúveis esteroides atravessam a membrana celular (1) e ligam-se a receptores citoplasmáticos (2). O complexo hormônio-receptor é translocado para o núcleo (3) e liga-se a sítios específicos do DNA nas células alvo (4) e atua como fator de transcrição (5). O gene alvo é transcrito em RNA mensageiro, que por sua vez é traduzido (5) a uma proteína (6) que modifica algum aspecto do fenótipo/função da célula alvo. B. Os hormônios hidrossolúveis ligam-se a receptores na membrana celular e o complexo hormônio-receptor ativa as moléculas intracelulares responsáveis por conduzir o sinal da ação hormonal (3,4) e produzir a resposta celular ao hormônio (4). (RANG & DALE et al., 2011).

Os hormônios são produzidos por glândulas e liberados na corrente sanguínea agindo como mensageiros químicos sobre os órgãos-alvo, atuando sobre a função destes, e levando à regulação e suprimento das necessidades do organismo (GREGORASZCZUK et al., 2013).

Além de controlar as funções de alguns órgãos, os hormônios comandam algumas funções, como as concentrações de alguns componentes no sangue, tais como sais, açúcares e líquidos, controlando também o armazenamento e o gasto energético, reprodução, características sexuais, entre outras atividades (GHISELLI et al., 2007).

De maneira geral, os hormônios, após serem secretados pelas glândulas, vão agir por meio de ligações a receptores específicos em células-alvo, ativando o material genético destas células para a execução de determinada função, como, por exemplo, a síntese de uma proteína (REIS FILHO et al., 2007).

Os desreguladores endócrinos (DE) são capazes de interferir no sistema devido à semelhança entre a sua estrutura química e a dos hormônios endógenos, podendo, assim, manifestar a sua ação em diferentes pontos do funcionamento hormonal, que vão desde a produção de hormônios até a sua excreção e biotransformação, possibilitando o desencadeamento de respostas adversas e alteração da função celular. Por exemplo, existem substâncias cuja estrutura química assemelha-se à do hormônio esteroide estrogênico 17 β -estradiol; dessa forma, tais substâncias se ligam ao receptor do hormônio estrogênico e provocam respostas agonistas ou antagonistas (CRAIN et al., 2000). Por sua semelhança química com hormônios endógenos, os DE conseguem se associar às proteínas que transportam os hormônios, alterando o metabolismo hormonal e, conseqüentemente, desregulando o sistema endócrino (MORAES et al., 2008).

1.1.3 AÇÃO HORMONAL

Os hormônios são tradicionalmente descritos como substâncias químicas liberadas na circulação que atuam em alvos distantes (células, órgãos ou sistemas alvo). No entanto, muitos dos hormônios reconhecidos por atuar desta forma foram identificados como capazes de produzir efeitos em células vizinhas, ou mesmo nas células onde foram produzidas. Desta forma, hoje são reconhecidas quatro formas de ação hormonal: endócrina, parácrina, autócrina e intrácrina. A ação endócrina é aquela em que o hormônio é liberado na circulação e atua em células alvo distantes; a ação parácrina é caracterizada pela ação do hormônio em células alvo na vizinhança da célula que o produziu. A ação autócrina descreve a situação em que o hormônio é liberado pela célula e atua nesta mesma célula que o produziu, ao passo que na ação intrácrina o hormônio é produzido em uma célula e atua nesta mesma célula, sem ter havido sua liberação para o meio extracelular (NELSON et al., 2004).

A ativação do sistema endócrino frente a estímulos externos em geral é resultante de ativação do sistema nervoso que, por sua vez, envia um sinal às glândulas endócrinas. Em resposta a este sinal, as glândulas endócrinas liberam hormônios que se ligam a receptores específicos das células alvo. O mecanismo de sinalização desencadeado pelo receptor resulta em modificação do perfil de expressão gênica da célula e/ou alteração da atividade de proteínas intracelulares. A alteração da atividade de proteínas intracelulares em geral é responsável pelas respostas rápidas à ação hormonal. Sendo assim, os hormônios atuam como uma espécie de mensageiro químico, estabelecendo comunicação com o meio externo e entre diferentes partes do organismo para, então, regular os processos fisiológicos, ou seja, a homeostase (NELSON et al., 2004; MONTGOMERY et al., 1990).

1.1.4 MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO DO SISTEMA ENDÓCRINO

Nas últimas décadas, um dos principais desenvolvimentos em termos de saúde ambiental passou pelo conhecimento de que existem substâncias químicas no ambiente que têm a capacidade interferir com a atividade do sistema endócrino (MOCARELLI et al., 2000). Diante disso, existe grande interesse em conhecer melhor os efeitos causados por essas substâncias (YOUNGLAI et al., 2005). Além do interesse em seus efeitos, ambientalistas e pesquisadores de áreas afins estão também interessados nestas substâncias porque a maior parte delas está incluída na lista dos contaminantes orgânicos persistentes no meio ambiente, como é o caso de alguns pesticidas organoclorados, tensoativos, surfactantes, dioxinas e bifenilas policloradas (MOCARELLI et al., 2008). Este é um dos grandes problemas ambientais e relacionados à saúde humana, de caráter mais urgente a ser enfrentado pela toxicologia ambiental e áreas médicas (HSIEH et al., 2008).

Várias classes de substâncias podem interferir na atividade do sistema endócrino, como os hormônios naturais, hormônios sintéticos e compostos utilizados ou eliminados pela agricultura e indústria e produtos ou bens de consumo (DAMSTRA et al., 2002). A alteração do sistema endócrino pode ocorrer por diferentes mecanismos, relacionados aos vários aspectos da ação hormonal. Entre eles, destaca-se a interação do interferente com os receptores hormonais, que pode resultar em efeito agonista ou antagonista no receptor. No primeiro caso, o interferente liga-se ao receptor hormonal e mimetiza a ação do hormônio endógeno. No segundo caso, o interferente liga-se ao receptor e impede a ligação do hormônio endógeno (NOGUEIRA, 1999; AUGER et al., 1995; GHISELLI et al., 2007).

1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Dados epidemiológicos dos últimos 50 anos demonstraram o aumento na incidência e prevalência de doenças associadas à exposição direta ou indireta a contaminantes ambientais, que podem desencadear diversos efeitos sobre a saúde humana. Entre estes efeitos, destacam-se a desregulação endócrina, que é relacionada à fisiopatologia da obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de neoplasias malignas (DE COSTER et al., 2012a; ROGERS et al., 2013; WORMLEY et al., 2004). Os contaminantes ambientais que interferem com a atividade do sistema endócrino são conhecidos como desreguladores endócrinos (DE), do inglês *endocrine disruptors*. Possuem a capacidade de interferir na síntese, função, armazenamento e/ou metabolismo de hormônios de um organismo intacto e de sua descendência (PETRO et al., 2012). A Agência de Proteção Ambiental dos EUA define DE como “agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais, transportados pelo sangue, presentes no organismo e responsáveis pela homeostase, reprodução e desenvolvimento” (GORE, 2008).

Os DE podem alterar o funcionamento do sistema endócrino por mimetizar a ação de hormônios endógenos em seus receptores, bloquear a ação de hormônios endógenos em seus receptores, estimular ou inibir a síntese e a secreção de hormônios endógenos e/ou estimular a capacidade dos hormônios em interagir com os receptores celulares (DAMSTRA et al., 2002; SODRÉ et al., 2007). Além de apresentarem diversos mecanismos de ação, os DE podem atuar em múltiplos sítios. Esta grande variedade de mecanismos de ação se reflete em grande diversidade de efeitos biológicos, que podem ser diretos ou indiretos, primários ou secundários. Estes aspectos tornam difícil a extrapolação de resultados *in vitro*, em geral menos abrangentes, para contexto *in vivo*. Esta mesma variedade de mecanismos de ação também dificulta a compreensão detalhada dos efeitos *in vivo* dos DE (ALMEIDA, 2003).

Os efeitos *in vivo* da exposição aos DE também variam de acordo com o período de exposição, na vida do organismo. A exposição durante o período de desenvolvimento do sistema endócrino pode conduzir a alterações permanentes da função do sistema ou sensibilidade dos receptores. Diferentemente, as alterações decorrentes da exposição aos DE na vida adulta podem ser compensadas por mecanismos homeostáticos e desta forma pode não conduzir a qualquer efeito significativo ou detectável (AHEL et al., 1993). A complexidade dos efeitos dos DE é ainda maior quando se considera que, em razão da interação do sistema endócrino com outros sistemas, os efeitos observados podem decorrer

não apenas de alterações nos tecidos alvo dos DE como também de alterações em outros tecidos, de modo indireto (PENG et al., 2008).

Os DE compreendem um grupo de substâncias químicas altamente heterogêneo (Quadro 1), que inclui solventes industriais, lubrificantes e seus subprodutos, dioxinas, bisfenol A, bifenilas policloradas, compostos de plástico, plastificantes, pesticidas clorados como inseticidas, agentes farmacêuticos como os imidazóis e triazóis, compostos químicos que são amplamente utilizados em cosméticos, tais como ftalatos, alquilfenóis (octilfenol e nonilfenol) e metais pesados como cádmio, mercúrio, arsênio, chumbo, manganês e zinco (IAVICOLI et al., 2009; DE COSTER et al., 2012a; CASALS-CASAS et al., 2011).

A maioria desses compostos ainda não foi investigada profundamente quanto aos seus efeitos nos seres vivos. Os dados toxicológicos disponíveis para muitos destes compostos químicos são ainda escassos. Por exemplo, dos cerca de três mil compostos químicos produzidos em grande volume (mais de 400 mil toneladas ao ano), apenas 7% passaram por um conjunto de seis testes toxicológicos básicos e 43% não passaram por nenhum deles. Como resultado dos poucos requisitos para a regulamentação do uso destes compostos, os efeitos adversos a eles associados são identificados somente após sua liberação no mercado e ampla utilização (RUDEL et al., 2009; KNEZ, 2013).

Tabela 1 – Relação de alguns compostos classificados como desreguladores endócrinos.

| Classe | Composto |
|---|---|
| Ftalatos | Dimetil ftalato, dietil ftalato, di-iso-butil ftalato, di-n-butil ftalato, dicitcloexilo ftalato, di (2-etil-exil) ftalato, di-n-octil ftalato, diisocetil ftalato |
| Alquifenóis | Nonilfenol, etoxilato de nonilfenol, octifenol, etoxilatos de octilfenol |
| Organoclorados | Dibenzo-p-dioxina, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-dioxina), TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano) |
| Bisfenol | Bisfenol A |
| Parabenos | Benzilparabeno, isobutilparabeno, butilparabeno, n-propilparabeno Etilparabeno, metilparabeno |
| Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos | Naftalina, acenaftileno, criseno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno |
| Metais pesados | Cádmio, mercúrio, chumbo, zinco |
| Pesticidas | Inseticidas: DDT, DDE , deltametrin, carbofurano Herbicidas: atrazina, linuron Fungicidas: vinclozolina, carbendazime, penconazol, procloraz, propiconazol |
| Bifenilas policloradas | 2,4,4'-triclorobifenil, 2,2',5,5'- tetraclorobifenil, 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil, 2,3',4,4',5-pentaclorobifenil, 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil |
| Retardantes de chama bromados | Polibromofenila (PBP) Éter de 2,2',4,4'-tetrabromodifenil (BDE 47) Éter de 2,2',4,4',5-pentabromodifenil (BDE 99) Tetrabromobisfenol A (TBBA) |
| Fitoestrogênicos | Isoflavonas: daidzeína e genistéina Lignanas: metaresinol e enterodiol |
| Medicamentos | Dietilestilbestrol (DES) 17 α -etinilestradiol (EE2) |

Fonte: adaptado de Bila; Dezotti, 2007.

1.2.1 VIAS DE EXPOSIÇÃO HUMANA AOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS

A exposição aos DE pode ocorrer de várias formas, entre elas por contato direto no domicílio e no local de trabalho ou, indiretamente, por ingestão de água ou alimentos

contaminados, ou mesmo inalação de ar contaminado (Figura 3). Sendo a alimentação a principal via de exposição a estes contaminantes, estes compostos são absorvidos principalmente por via digestiva (OHEA et al., 2004; BILA et al., 2007). Além disso, os DE caracteristicamente apresentam persistência na cadeia alimentar, por apresentarem grande afinidade por lipídeos e, assim, acumularem-se no tecido adiposo das espécies animais expostas (BICCHI et al., 2008). A fonte de exposição pode ser não apenas a ingestão de carne de animais contaminados, mas também dever-se a pesticidas residuais muitas vezes acumulados em vegetais e frutas (BACCARELLI et al., 2000; YING, 2011). Podem, ainda, existir vestígios destas substâncias em produtos de higiene, tais como, cremes, géis de banho, entre outros (BILA et al., 2007).

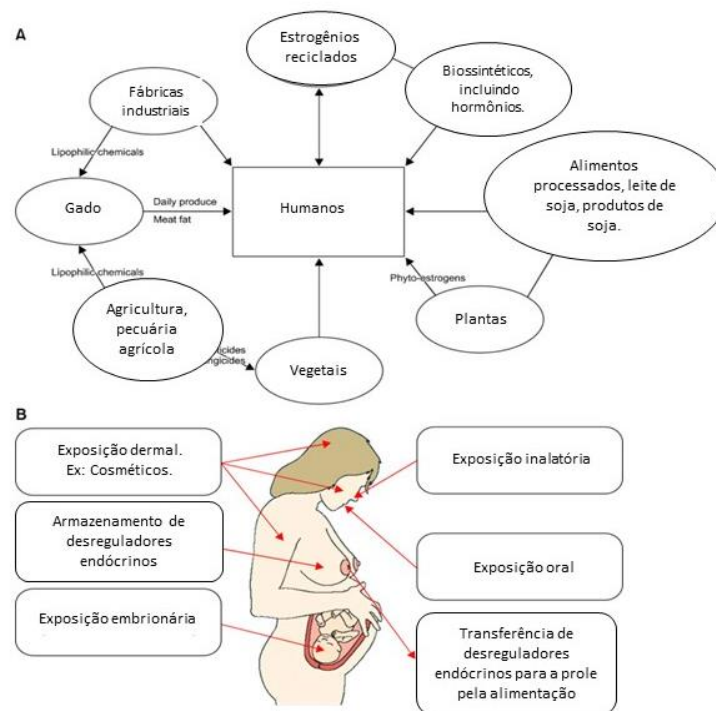


Figura 3 – Fontes de exposição e contaminação com os desreguladores endócrinos. Adaptada de: SHARPS et al., (2004).

Uma característica preocupante dos DE para os ecossistemas é o fato de muitos desses compostos possuírem meia-vida longa, ou seja, serem persistentes no ambiente (BERGERON et al., 1994). Este aspecto contribui para que a exposição direta ou indireta da população a estas substâncias seja ubíqua e inevitável. Além disso, seu impacto sobre a saúde humana devido aos efeitos conhecidos ou desconhecidos destes produtos químicos em sistemas hormonais é grande. Há, assim, necessidade urgente de aumentar os esforços para identificar

os compostos que podem se comportar como DE e estudar os seus mecanismos moleculares de ação (GROSHART et al., 2000; PETERSEN et al., 2007).

1.3 NONILFENOL

O nonilfenol (NP) pertence ao grupo dos alquilfenóis, ao qual pertence também o octilfenol. É produzido pela degradação microbiana do etoxilato de nonilfenol em meio aquoso (SONE et al., 2004) e amplamente encontrado no meio ambiente. Sua produção anual, em 2008, foi estimada em 154.200 toneladas nos Estados Unidos e 73.500 toneladas na União Europeia (SOARES et al., 2008).

Os alquilfenóis são estruturalmente formados por uma cadeia carbônica ligada a um grupo fenólico e pertencem ao grupo dos surfactantes não iônicos. O 4-nonilfenol (C₁₅H₂₄O, Figura 4) é o isômero de NP mais amplamente encontrado, sendo diferenciado dos demais isômeros pela posição do anel fenólico e pela cadeia de carbonos ligada a ele (CWQG, 1999). Os alquilfenóis são hidrofóbicos (valor de partição octanol/água, ou logKow, de 4,48) e, assim, apresentam maior afinidade pela fase orgânica e baixa solubilidade em água (4,90 mgL⁻¹).

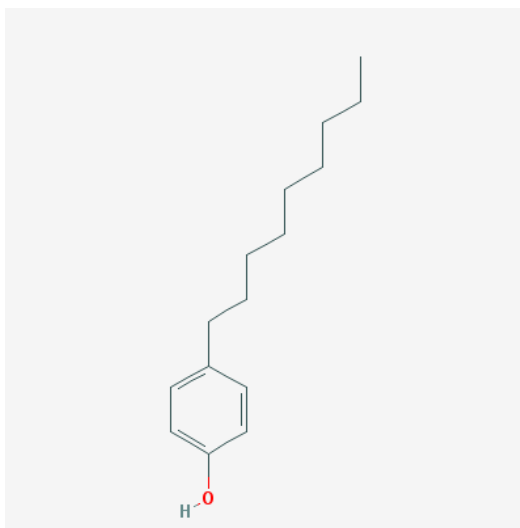


Figura 4 – Estrutura química do 4-nonilfenol. Fonte: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=1752&width=400&height=400>).

Os alquilfenóis são amplamente utilizados na indústria de surfactantes não iônicos, lubrificantes, antioxidantes, detergentes, tintas, inseticidas e herbicidas, além de ser um estabilizador de polímeros plásticos (OLIVEIRA-FILHO et al., 2005; RIVERO et al., 2008).

Devido à ausência de tratamento dos resíduos dessas indústrias, ou dos resíduos domésticos, estes compostos contaminam a água (Maguire, 1999), sendo encontrado em esgotos, sedimentos, águas fluviais e na água potável (TSUDA et al., 2000; BERRYMAN et al., 2004; SHAO et al., 2005). A toxicidade dos alquilfenóis é aumentada após o processo de degradação ambiental, quando são transformados em 4-noctilfenol e 4-n-nonilfenol (KNEZ, 2013). Estes, por sua vez, são detectados não apenas na água mas também no ar, sedimentos, plantas, solos, poeira domiciliar e tecidos animais (MDEP, 2010). A via mais comum de contaminação humana com o NP é a oral, seguida da inalatória e transdérmica (WILSON et al., 2001).

A exposição aos alquilfenóis pode resultar em diversos efeitos adversos, incluindo o efeito DE. Em consequência disso, o NP, em conjunto com outros compostos, encontra-se na lista de substâncias nocivas prioritárias da União Europeia (EC, 2008). Entretanto, assim como outros contaminantes ambientais, o NP não está inserido na legislação brasileira para controle em águas superficiais (Resolução nº 357/2005 do CONAMA, BRASIL, 2005). Em países onde sua quantidade na água é monitorada, como no Canadá, a concentração limite do NP é de $1\mu\text{g.L}^{-1}$, em águas naturais (CWQG, 1999).

Os efeitos adversos descritos do NP em mamíferos e nos demais grupos animais são os tóxicos, carcinogênico e DE (AZEVEDO et al, 2001; SILVA et al., 2007; YANG et al, 2008). A atividade desreguladora endócrina do NP inicialmente identificada foi sua atividade estrogênica. Embora o NP seja de 1.000 a 1.000.000 de vezes menos potente que o 17β -estradiol (estrogênio endógeno), sua ação estrogênica é descrita para diversos grupos animais, como aves (RAZIA *et al.*, 2006), peixes (RIVERO et al., 2008) e mamíferos (CHAPIN et al., 1999; TAGAKI et al., 2004). Isso se deve ao fato de os receptores estrogênicos serem altamente conservados evolutivamente, de modo que um mesmo composto pode agir em diversos táxons (COLBORN et al., 2002). Por exemplo, em hepatócitos de truta em cultura, o NP estimula a produção de vitelogenina, processo dependente de estrogênio (WHITE et al., 1994). Em linhagem celular humana de câncer de mama (MCF-7), o nonilfenol induz proliferação celular e expressão de receptores de progesterona, processos também dependentes do receptor estrogênico (SOTO et al., 1991).

Em humanos, são muitos os efeitos que podem estar relacionados à exposição ao NP. No sexo masculino, são observados redução da espermatogênese e da capacidade de fertilização dos espermatozoides. Em mulheres, são observados aumento da incidência de endometriose e infertilidade. Em ambos os sexos, a exposição pós-natal é associada a

aumento da incidência câncer, hiperatividade, alergias e distúrbios imunológicos (QUEIRÓZ et al., 2006).

A exposição humana ao NP é considerável. Estudo conduzido na Suécia revelou a presença de 4-nonilfenol (NP) em diversos itens de consumo alimentar humano e estimou o consumo diário de NP em 0,37 µg/kg de peso corpóreo (GYLLENHAMMAR et al., 2012). Em Taiwan, a ingestão diária para adultos foi estimada em 31,40 µg/kg (LU et al., 2007). Estudo conduzido na Alemanha, envolvendo crianças, indicou que a ingestão diária de NP variou entre 0,01 a 0,08 µg/kg de peso corpóreo para bebês de até 12 meses de idade e de 0,04 a 0,05 µg/kg de peso corpóreo para crianças de 1 a 3 anos (RAECKER *et al.*, 2011).

Em consistência com as estimativas de exposição considerável ao NP via consumo alimentar, em estudo que investigou a presença de NP no sangue lactantes, este DE foi encontrado em 43% das participantes. Este mesmo estudo detectou o NP no leite materno, na concentração média de 32 ng/mL (LOPEZ-ESPINOSA ET AL., 2009). Considerando a natureza lipofílica do NP e, assim, sua capacidade de acumular-se no tecido adiposo, uma forma de investigar a contaminação humana é a determinação de suas concentrações neste tecido. Com essa abordagem, foi observada, no tecido adiposo, concentração média de NP de 57 ng/g em indivíduos residentes no sul da Espanha e de 122 ng/g em residentes na Itália (FERRARA et al., 2011). Embora a concentração varie de acordo com a região estudada e os hábitos alimentares da população, o NP mostra-se um poluente amplamente presente e frequentemente detectado em humanos (GYLLENHAMMAR et al., 2012; ADEMOLLO et al., 2008; LOPEZ-ESPINOSA et al., 2009; FERRARA et al., 2011).

Estudos envolvendo modelos animais tem contribuído para melhor compreender os efeitos adversos decorrentes da exposição ao NP. Estudos toxicológicos indicaram que a dose letal mediana (DL₅₀, ou dose para determinar a morte de 50% da população) do NP administrado por via intraperitoneal foi de 170 mg/kg de massa corpórea, em camundongos machos adultos (GRUN et al., 2007). Em outro estudo, foi observado que o NP foi capaz de reduzir a expressão do gene que codifica o receptor de estrogênio na placenta e em fetos de camundongos fêmeas expostas a uma dose de 50 mg/kg de peso corpóreo, no período gestacional, tanto por via oral quanto intraperitoneal (VELD et al., 2009; El-DAKDOKY et al., 2007).

Estudos com enfoque na fertilidade de ratos machos mostraram que o tratamento com NP, na dose de 250 mg/kg/d, por via oral, durante 50 dias, resultou em redução da massa

relativa do epidídimo e aumento da massa relativa do rim e do fígado. Neste mesmo estudo, foi observada redução da densidade de espermatozoides na cabeça do epidídimo e da concentração sérica de testosterona, além de aumento da concentração sérica de gonadotrofinas (hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante). Análises histológicas e ultraestruturais de secções do testículo mostraram células menos compactas e arranjo irregular das mesmas, assim como maior presença de vacúolos e lisossomos nas células dos animais tratados. Também foi encontrado maior número de células apoptóticas nos testículos (HAN et al., 2004).

Em estudo semelhante, camundongos machos tratados com dose menor de NP (42,5 mg/kg/d), por via intraperitoneal, durante 35 dias, apresentaram redução na massa do epidídimo e do testículo, além de uma diminuição da contagem de espermatozoides e da motilidade dos mesmos. No mesmo estudo, foram identificados também indicativos de estresse oxidativo e redução das concentrações das enzimas antioxidantes redutase de glutaciona e superóxido dismutase no testículo (EL-DAKDOKY & HELAL, 2007).

Embora os efeitos do NP sobre o sistema reprodutivo sejam bem definidos e, em grande parte, atribuídos aos seus efeitos estrogênicos, pouco se sabe a respeito de seu potencial obesogênico. Foi previamente descrito o efeito adipogênico do NP em baixas concentrações, em cultura de células, e também o aumento da adiposidade em camundongos machos e fêmeas expostos ao NP no período perinatal (HAO et al., 2012). Um aspecto interessante deste último estudo foi que o efeito sobre a massa corporal e adiposidade nos animais diferiu entre machos e fêmeas (HAO et al., 2012). Em outro estudo também foram investigados os efeitos da exposição perinatal ao NP em ratos Wistar e observado que alterações da adiposidade e de variáveis metabólicas ocorriam não apenas na prole das ratas expostas ao NP (geração F1), mas também na prole da geração F1, ou geração F2, sem que a geração F1 tenha sido exposta ao NP durante a gravidez (ZHANG et al., 2014). Para nosso conhecimento, não há estudos que exploraram o efeito da exposição crônica NP sobre a adiposidade e variáveis metabólicas fora do contexto transgeracional, ou seja, exposição durante a gestação e observação dos efeitos sobre a prole.

A obesidade representa um dos maiores desafios de saúde pública para o século 21, com tendências particularmente alarmantes em várias partes do mundo (KELLY, 2008). Dietas pouco saudáveis e o sedentarismo são os principais contribuintes para sobrepeso e obesidade, que estão entre os principais fatores de risco para as principais doenças não transmissíveis. As consequências mais significativas para a saúde do excesso de peso e

obesidade incluem hipertensão, dislipidemia, doenças coronárias, acidente vascular cerebral isquêmico, diabetes tipo 2 e certos tipos de câncer (WHO, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

Os resultados de estudos epidemiológicos obtidos na última década apontam a obesidade como importante condição determinante de morbidade e mortalidade. A prevalência da obesidade vem aumentando em praticamente em todos os países desenvolvidos, com raras exceções, bem como nos países em desenvolvimento (WHO, 2000). Esta condição é resultado da complexa interação entre fatores genéticos, comportamentais e ambientais que resulta em desbalanço energético crônico e aumento da adiposidade corporal. Entre os fatores ambientais, recentemente vem ganhando destaque o papel potencial de compostos químicos com atividade desreguladora endócrina que promovem desregulação da adipogênese e acúmulo lipídico inapropriado, denominados obesogênicos ambientais (GRUN et al., 2007). Entre os compostos desreguladores endócrinos, destacamos o NP, a que os humanos apresentam exposição significativa e que apresenta efeitos sobre a adipogênese em cultura e efeitos desfavoráveis sobre a massa corporal, adiposidade e variáveis metabólicas (glicemia, perfil lipídico, leptinemia) em modelos murinos de exposição transgeracional. Para nosso conhecimento, no entanto, não foram explorados os efeitos da exposição prolongada ao NP, fora do contexto transgeracional ou perinatal.

Desta forma, esta proposta tem como objetivo investigar os efeitos da exposição do NP, tanto desde o desmame até a vida adulta, como também apenas durante a vida adulta, sobre a massa corporal, adiposidade e homeostase da glicose em camundongos *Swiss* machos. A caracterização destes efeitos poderia ampliar os conhecimentos a respeito do papel deste composto no desenvolvimento da obesidade e, assim, não apenas contribuir para maior conhecimento da fisiopatologia desta importante condição, mas também fundamentar estratégias de prevenção na mesma, com base na atenção à exposição a obesogênicos ambientais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do nonilfenol sobre a massa corporal, adiposidade e homeostase da glicose em camundongos *Swiss* machos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos da exposição ao nonilfenol desde o desmame até a vida adulta, ou somente durante a vida adulta, sobre os seguintes desfechos:

- Massa corporal, ganho de massa corporal, ingestão de energia e ingestão hídrica.
- Glicemia de jejum, tolerância à glicose e sensibilidade insulínica.
- Massa do tecido adiposo marrom interescapular, massa de tecido adiposo branco visceral (epididimal e retroperitoneal) e massa de tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal).
- Perfil lipídico e concentração sérica de transaminases.
- Características histológicas do fígado, tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco visceral e subcutâneo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido em camundongos e todos os procedimentos realizados seguiram as recomendações do Guia para Saúde e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (*National Institutes of Health's Guide for the Health and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, 2011*) e da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA 2013). O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, Unb-Doc 118470/2014 (ANEXO A).

4.2 MODELO ANIMAL E DIETA

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 5 semanas de idade, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo. Após sua chegada ao biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, na 4ª semana de vida, os animais passaram por um período de adaptação ao novo ambiente antes do início do estudo, com duração de 1 semana. Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas de plástico, em ambiente com temperatura média de 24°C e com ciclos claro-escuros fixos de 12/12 horas. Foram alimentados com dieta controle padrão (AIN-93G, obtida da empresa Pragsoluções, SP), fornecida na forma de *pellet*; sua composição está descrita no Quadro 2. O fornecimento de dieta e de água potável (filtrada) foi *ad libitum*.

Tabela 2 - Descrição dos componentes da dieta padrão.

| Dieta controle | | |
|----------------------------|----------------|-----------------|
| AIN-93G | | |
| | g (%) | kcal (%) |
| Proteína | 19,2 | 20 |
| Carboidrato | 67,3 | 70 |
| Lipídeo | 4,3 | 10 |
| Total | | 100 |
| (kcal/g) | 3,85 | |
| Ingrediente | g | kcal |
| Caseína | 200 | 800 |
| L-cistina | 3 | 12 |
| Amido de milho | 315 | 1260 |
| Maltodextrina | 35 | 140 |
| Sacarose | 350 | 1400 |
| Celulose | 50 | 0 |
| Oleo de soja | 25 | 225 |
| Banha de porco | 20 | 180 |
| Mistura mineral S10026 | 10 | 0 |
| Fosfato dicálcico | 13 | 0 |
| Carbonato de Cálcio | 5,5 | 0 |
| Citrato de potássio | 16,5 | 0 |
| Mistura de vitamina V10001 | 10 | 40 |
| Bitartrato de colina | 2 | 0 |
| Corante Amarelo | 0,05 | 0 |
| Total | 1055,05 | 4057 |

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 20 camundongos foram divididos, após sua chegada ao biotério, aleatoriamente em quatro grupos cada um contendo 5 animais. Os grupos foram identificados da seguinte forma:

Grupo 1 (controle negativo): camundongos que receberam apenas água.

Grupo 2: camundongos que receberam NP na dose de 0,05 mg/kg de peso corpóreo por dia, da 6^a até a 20^a semana de vida.

Grupo 3: camundongos que receberam NP na dose de 0,25 mg/kg de peso corpóreo por dia, da 6^a até a 20^a semana de vida.

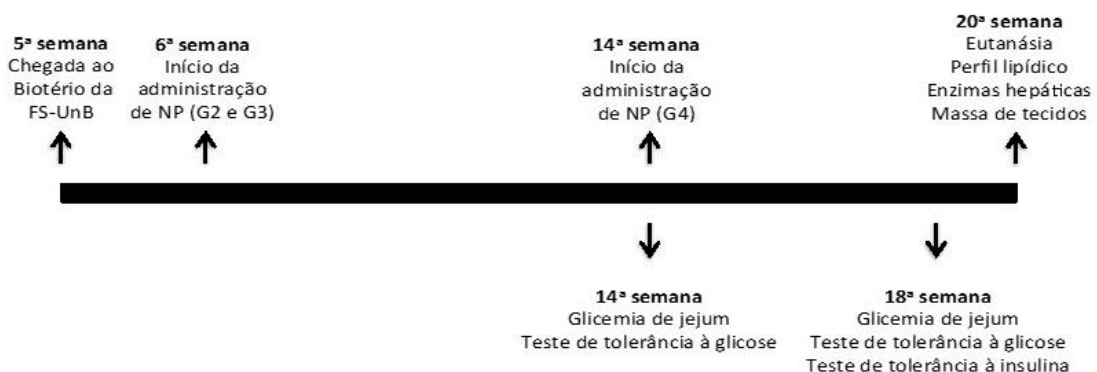
Grupo 4: camundongos que receberam NP na dose de 0,25 mg/kg de peso corpóreo, por dia, da 14^a à 20^a semana de vida.

O NP foi obtido da empresa Sigma-Aldrich e administrado na água de beber. A água de beber foi trocada três vezes por semana e, para determinação da quantidade de NP a ser adicionada à água, foram considerados (i) o peso do animal no dia da troca (em g) e (ii) a ingestão hídrica média diária calculada com os resultados de ingestão hídrica aferidos nos 7 dias anteriores ao dia da troca (em mL). Assim, obteve-se a quantidade de NP (em g) a ser adicionada à água. As doses de nonilfenol utilizadas, de 0,05 e 0,25 mg/kg/d na água de beber, foram selecionadas com base em estudo anterior em que foi descrito o potencial obesogênico da exposição ao nonilfenol na vida intrauterina e neonatal precoce (HAO et al, 2012) e em estudos prévios com este DE que investigaram o efeito de doses superiores sobre outros desfechos e não observaram sinais de toxicidade (NAGAO et al., 2001; GREEN et al., 2003).

Entre a 5^a e a 20^a semanas de vida, o peso corporal (em gramas), a ingestão de dieta (em gramas) e a ingestão de água (em mL) foram avaliados três vezes por semana. A partir dos dados obtidos, foram calculadas as seguintes variáveis:

- (i) Ganho de peso (em g) durante o tratamento: peso ao final do tratamento – peso no dia de início do tratamento.
- (ii) Ingestão hídrica durante o tratamento: expressa como ingestão média (mL) diária (mL/d).
- (iii) Energia ingerida durante o tratamento: soma da energia ingerida durante todo o período de tratamento, considerando a quantidade de energia, em kJ, por grama de dieta.

O esquema a seguir ilustra o delineamento experimental.



Avaliação semanal: peso, consumo de dieta e água

4.3.1 GLICEMIA DE JEJUM, TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

A glicemia de jejum foi aferida na 14^a e na 20^a semana de vida, com a utilização de tiras reativas e glicosímetro (Accucheck Performa, Roche), no período da manhã, após jejum noturno de 12 horas, em amostra de sangue coletada da cauda do animal. Esses períodos foram selecionados para aferição da glicemia por representarem:

- (i) 14^a semana: 9 semanas de tratamento com NP nos grupos 2 e 3; momento anterior ao início do tratamento com NP no grupo 4.
- (ii) 20^a semana: final do tratamento com NP nos grupos 2 e 3 (totalizando 15 semanas de tratamento) e no grupo 4 (totalizando 6 semanas de tratamento).

Na 14^a e 20^a semanas, foi realizado o teste de tolerância à glicose em todos os animais, após jejum diurno de 6 horas, sem restrição de acesso à água. Foi coletada amostra de sangue da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero) e, em seguida, os animais receberam solução de glicose, na dose de 1g/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram então coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção de glicose e analisadas com tiras reativas em glicosímetro (Accucheck Performa, Roche).

Na 18^a semana, foi realizado o teste de tolerância à insulina em todos os animais, após jejum diurno de 6 horas, sem restrição de acesso à água. Foi coletada amostra de sangue da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero) e, em seguida, os animais receberam dose única de solução de insulina regular (Lilly), na dose de 0,5UI/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram então coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção de insulina e analisadas com tiras reativas em glicosímetro (Accucheck Performa, Roche).

4.3.2 EUTANÁSIA, COLETA DE SANGUE E RETIRADA DE AMOSTRAS TECIDUAIS

Ao final do tratamento, na 20^a semana, os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes sugeridas pelo CONCEA e pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida, foi usado uma guilhotina manual para a realização da eutanásia. O sangue do tronco foi coletado em tubo padrão e centrifugado (4000 g durante 15 minutos a 4.000 rpm a 4^o C) e o soro armazenado a -80^o C, para posterior

mensuração da concentração de enzimas hepáticas e avaliação do perfil lipídico. Logo em seguida foram dissecados depósitos de tecido adiposo branco visceral (epididimal e retroperitoneal), branco subcutâneo (inguinal) e marrom (interescapular), além de amostras do fígado. Depois desse procedimento, suas massas foram aferidas e os fragmentos desses tecidos foram armazenados em paraformaldeído a 4% (para posterior análise histológica) ou a -80°C .

A massa de cada depósito de tecido adiposo foi expressa em termos absolutos (g) e também em relação ao peso corporal do animal, aferido no dia da eutanásia (mg de tecido/kg de peso corporal).

4.4 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

A concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), triglicerídeos e HDL colesterol (HDL-c) foi analisada por método enzimático utilizando kits de ensaio (OSR6009, OSR6107, OSR6116, OSR60118, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante, em analisador químico automático (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA).

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica, as amostras de tecidos (adiposo e hepático) fixadas em paraformaldeído (4%) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) foram desidratados em uma série de concentrações crescente de álcool etílico, diafanizado com xilol e incluído em parafina, com o auxílio do histotécnico Oma DM-40 (protocolo apresentado no Anexo B). Foram feitos cortes de 5 μm de espessura, de forma seriada a cada 25 μm de profundidade, no micrótomo Leica Biosystems, modelo RM 2235 (Leica Biosystems, Alemanha). Os mesmos foram corados com hematoxilina-eosina (protocolo apresentado no Anexo C), para análise das amostras teciduais quanto à ocorrência de alterações morfológicas e classificação (Silva, 2010). As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópio de luz Axioskop 2 e as imagens obtidas com o programa Zen lite 2011. Foram observadas um total de 76 amostras de todos os animais inclusos no experimento.

4.6 FIXAÇÃO DO TECIDO ADIPOSE E HEPÁTICO

Fragmentos de tecido adiposo e hepático foram imediatamente armazenados em tubos cônicos contendo solução fixadora (paraformaldeído 4% v/v, recém-preparada) por até 24 h.

Em seguida, os fragmentos de tecido adiposo e hepático foram transferidos para outra solução fixadora, Bouin (75 mL de ácido pícrico, 25 mL de formol, 5 mL de ácido acético) por 4 h, lavados várias vezes em solução de álcool etílico 50% (v/v) e depois conservados em álcool etílico 70% (v/v) até o seu processamento.

4.7 INCLUSÃO EM PARAFINA

Para a realização do processo inclusão, fragmentos de tecido mantidos no álcool etílico 70% foram transferidos para uma caixeta de metal perfurada. Este processo de inclusão do tecido na parafina foi realizado manualmente, como descrito a seguir. Inicialmente os cortes de tecidos conservados foram submetidos a desidratação em álcoois em concentrações progressivas (álcool 70% - v/v, álcool 95% e álcool absoluto [2 banhos]) e diafanização por imersão em solução de álcool absoluto e xilol (v/v) e, por último, foram imersos por uma hora em parafina (Paraplast, Leica Biosystems, Alemanha) fundida na estufa (60°C). Para isso, os cortes de tecidos foram fixados na posição vertical e no fundo da forma, com o auxílio de uma pinça pré-aquecida.

O material parafinado foi mantido em temperatura ambiente até a realização de cortes de tecido no micrótomo.

4.8 CORTE NO MICRÓTOMO

Os tecidos incluídos em blocos de parafina permaneceram durante 30 minutos a -20°C antes da microtomia, para evitar enrugamento do tecido durante o corte. Os blocos foram cortados em micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2235, Leica Biosystems, Alemanha) em espessura de 5 µm e os fragmentos obtidos foram transferidos para banho-maria (40°C), distendidos com o auxílio de uma pinça e aderidos em lâminas. As lâminas foram transferidas para estufa a 60°C por aproximadamente 2 horas e depois armazenadas em temperatura ambiente.

4.9 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. Para a realização desta etapa, elas foram imersas em xilol (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico absoluto (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico a 95% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico a 80% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico a 75% (1 banho por 2 minutos), lavadas em água corrente, lavadas em água destilada por 3 minutos e imersas em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto (5

mg hematoxilina, 50 mL de álcool absoluto, 100 mg de alúmen de potássio, 2,5 g de óxido vermelho de mercúrio, 1000 mL de água destilada). Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente até tirar o excesso de hematoxilina, imersas em ácido clorídrico (1 mL) e álcool a 70% (v/v) e novamente lavadas em água corrente.

Para imersão em eosina, as lâminas foram inicialmente imersas em solução Scott, lavadas em água corrente, lavadas em água destilada, imersas em álcool etílico a 80% (3 banhos) álcool etílico a 95%, álcool etílico absoluto (2 banhos) e imersas em eosina (1 g de eosina em 100 mL de água destilada) por 1 minuto. Para finalização do processo de coloração, as lâminas foram imersas em solução de álcool etílico a 95%, álcool etílico a 100% (2 banhos) e em xilol (2 banhos de 3 minutos).

Para fixação das lamínulas, as lâminas foram cuidadosamente secas com papel absorvente e receberam uma gota de resina líquida Entellan (Entellan new, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sobre o corte histológico. As imagens dos cortes de tecidos foram capturadas por uma câmara digital acoplada a um microscópio de luz (Axio imager A1, Zeiss Inc., Jena, Alemanha) com aumento de 10 vezes.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos relativos ao peso, consumo de água e dieta, teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina foram expressos como média e erro padrão da média de cada grupo de tratamento. Para comparação das medias entre os grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida da comparação múltipla de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows. O critério de significância para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM NONILFENOL SOBRE O PESO CORPORAL, INGESTÃO DE DIETA E INGESTÃO HÍDRICA

Os camundongos incluídos no estudo foram divididos aleatoriamente, ao completarem 6 semanas de idade, em 4 grupos contendo 5 animais cada, descritos da seguinte forma:

Grupo 1 (controle negativo, n = 5): camundongos que receberam apenas água.

Grupo 2 (n = 4): camundongo que receberam NP na dose de 0,05 mg/kg de peso corpóreo por dia, da 6^a até a 20^a semana de vida.

Grupo 3 (n = 5): camundongos que receberam NP na dose de 0,25 mg/kg de peso corpóreo por dia, da 6^a semana até a 20^a semana de vida.

Grupo 4 (n = 5): camundongos que receberam NP na dose de 0,25 mg/kg de peso corpóreo, por dia, da 14^a à 20^a semana de vida.

A avaliação semanal do peso mostrou tendência de redução do peso dos animais tratados com NP, sobretudo na dose de 0,25 mg/kg/d durante 15 semanas (Figura 5A). Entretanto, a diferença do peso entre os grupos não foi significativa.

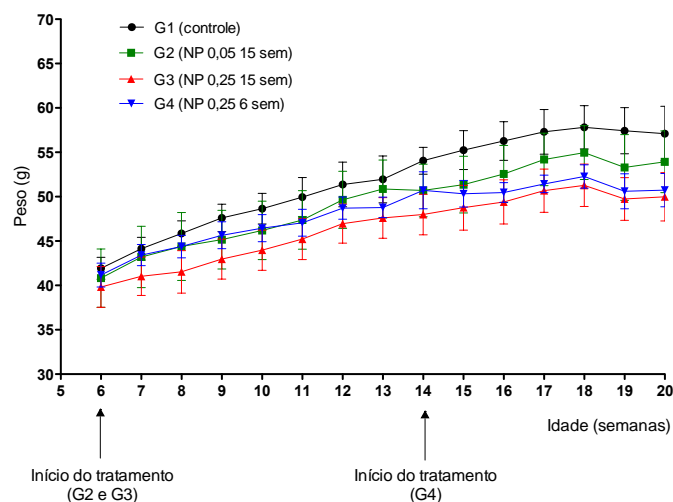
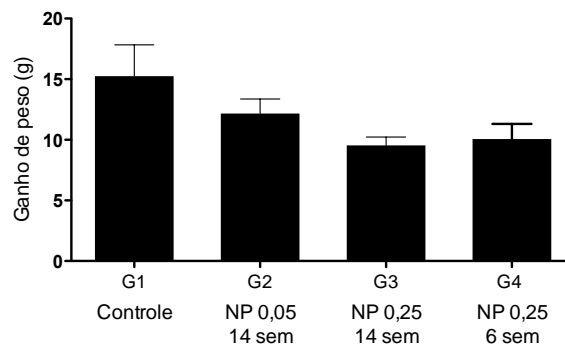


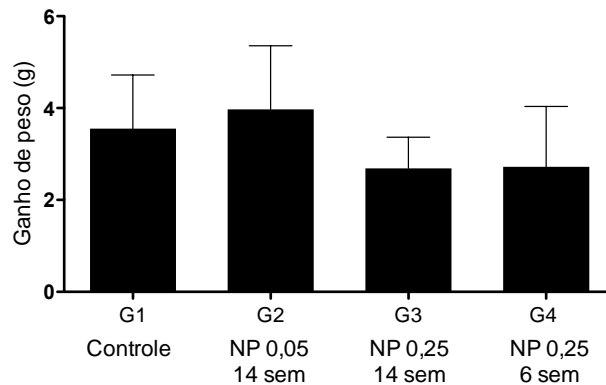
Figura 5 - O NP não modifica o peso corporal de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle. Peso médio (\pm EPM) semanal entre 6 e 20 semanas de vida de camundongos tratados com diferentes doses (0,05 ou 0,25 mg/kg/d) durante 14 ou 6 semanas. Dados analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Também não foi observada diferença entre os grupos quando avaliado o ganho de peso entre 6 e 14 semanas (período de tratamento com NP dos grupos 2 e 3, Figura 6A), entre 14 e 20 semanas (período de tratamento com NP do grupo 4, Figura 6B) e entre 6 e 20 semanas (final do estudo, Figura 6C).

A



B



C

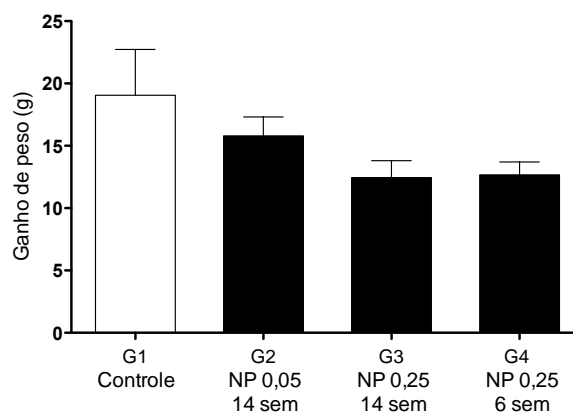
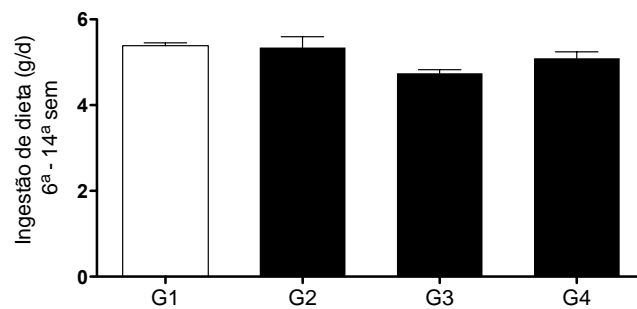


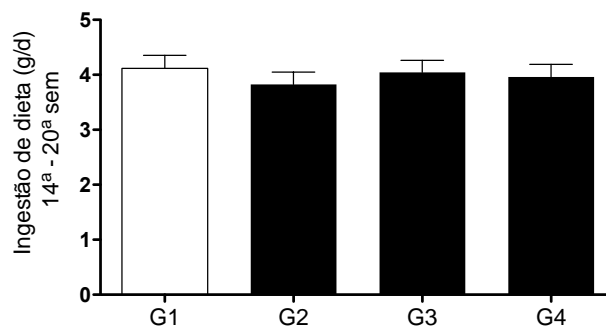
Figura 6 - O NP não modifica o ganho de peso corporal de camundongos Swiss machos alimentados com dieta controle. (A) Ganho de peso médio entre 6 e 14 semanas de vida. (B) Ganho de peso médio entre 14 e 20 semanas de vida. (C) Ganho de peso médio entre 6 e 20 semanas de vida. Camundongos tratados com diferentes doses (0,05 ou 0,25 mg/kg/d) durante 14 ou 6 semanas. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Não foi observada também diferença entre os grupos com relação à ingestão média diária de dieta (Figura 7), nos diferentes períodos de tempo analisados. Não foi observada diferença do consumo hídrico médio diário entre os diferentes grupos analisados da 6^a à 14^a semanas de vida, ou da 14^a à 20^a semanas de vida. Entretanto, quando analisados da 6^a à 20^a semanas, foi observado aumento do consumo hídrico nos animais que receberam a menor dose de NP (0,05 mg/kg/d) durante 14 semanas (Figura 8).

A



B



C

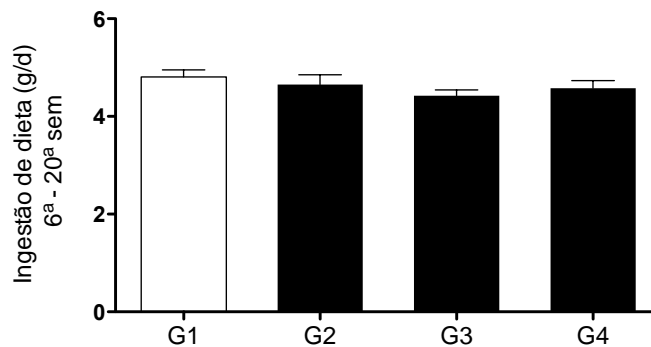
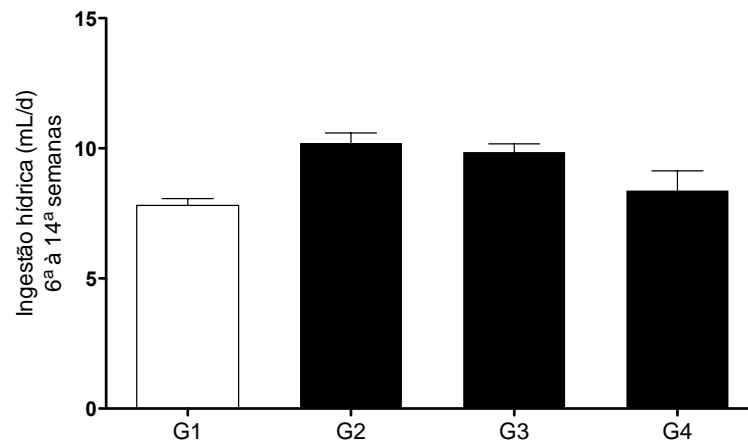
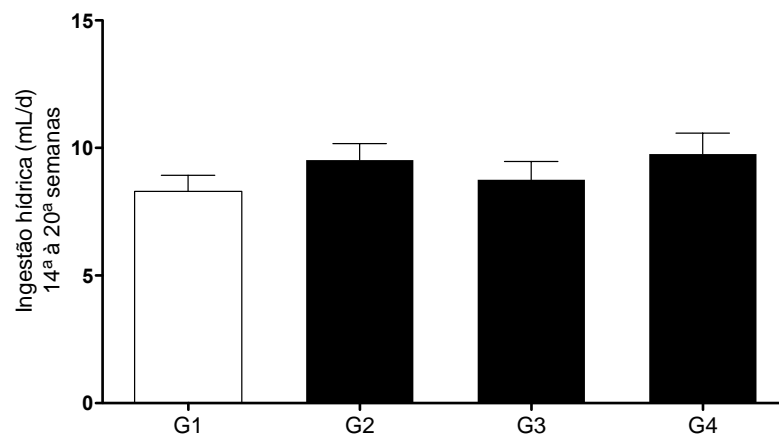


Figura 7 - O NP não modifica a ingestão média diária de dieta de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle. Ingestão média diária de dieta (A) entre 6 e 14 semanas de vida, (B) entre 14 e 20 semanas de vida e (C) entre 6 e 20 semanas de vida. G1: controle (água), G2: NP 0,05 mg/kg/d da 6^a à 20^a semanas de vida, G3: NP 0,25 mg/kg/d da 6^a à 20^a semanas de vida, G4: NP 0,25 mg/kg/d da 14^a à 20^a semanas de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância (ANOVA).

A



B



C

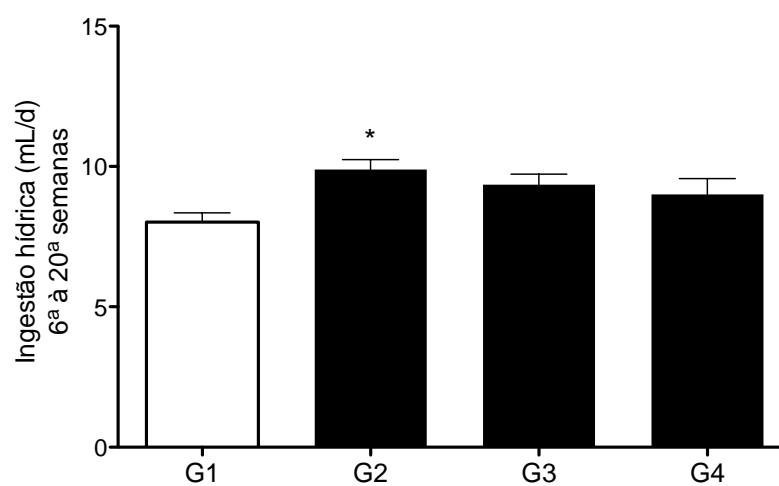


Figura 8 – Efeito do NP sobre a ingestão hídrica média diária de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle. Ingestão hídrica média diária (A) entre 6 e 14 semanas de vida, (B) entre 14 e 20 semanas de vida e (C) entre 6 e 20 semanas de vida. G1: controle (água), G2: NP 0,05 mg/kg/d da 6^a à 20^a semanas de vida, G3: NP 0,25 mg/kg/d da 6^a à 20^a semanas de vida, G4: NP 0,25 mg/kg/d da 14^a à 20^a semanas de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs controle (G1).

6.2 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A HOMEOSTASE DA GLICOSE

Na 14^a semana de vida, após 8 semanas de tratamento com NP (G2 0,05 mg/kg/d, G3 0,25 mg/kg/d), não foi observada diferença da glicemia de jejum nos grupos tratados com veículo (G1 e G4, considerados um único grupo nesta análise) ou NP (Figura 9).

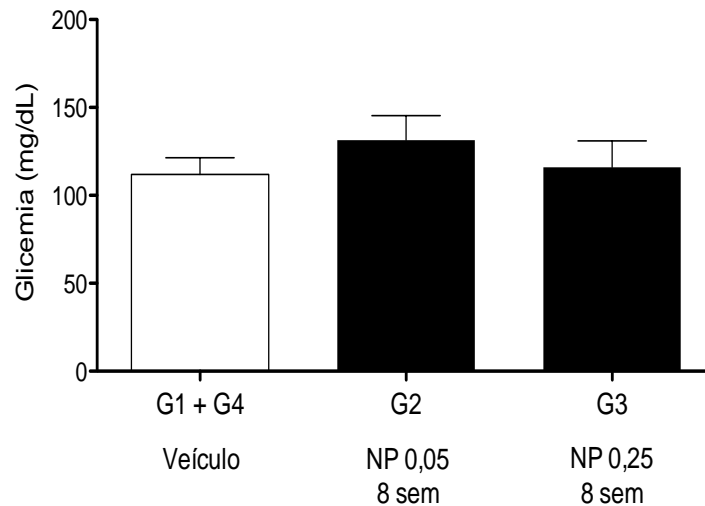
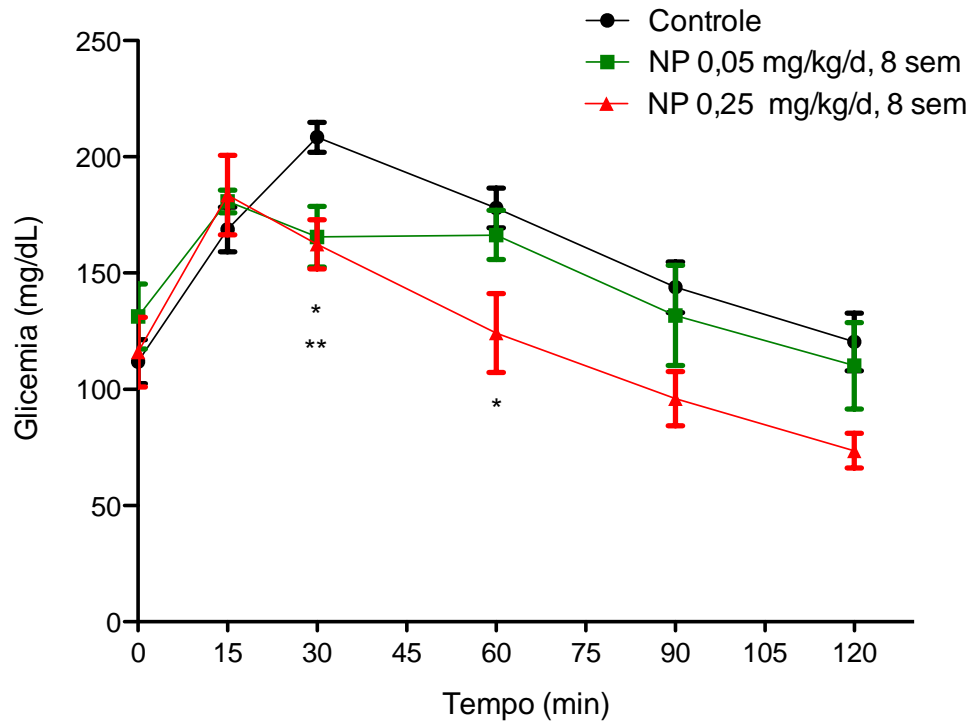


Figura 9 - O NP não modifica a glicemia de jejum de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle. Camundongos tratados com diferentes doses (0,05 ou 0,25 mg/kg/d) de NP durante 8 semanas, da 6^a à 14^a semanas de vida. Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA).

Neste mesmo período (14^a semana de vida), os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal. Após 8 semanas de tratamento com a menor dose de NP (0,05 mg/kg/d), foi observada redução da glicemia 30 minutos após sobrecarga de glicose, em relação ao grupo tratado com veículo. No grupo tratado com a maior dose de NP (0,25 mg/kg/d) durante 8 semanas, foi observada redução da glicemia 30 e 45 minutos após a sobrecarga de glicose, em relação ao grupo controle (Figura 10A). No grupo tratado com NP na dose de 0,25 mg/kg/d, foi observada tendência de redução da área sob a curva da glicemia em função do tempo entre os grupos, após sobrecarga de glicose, embora não estatisticamente significativa (Figura 10B).

A



B

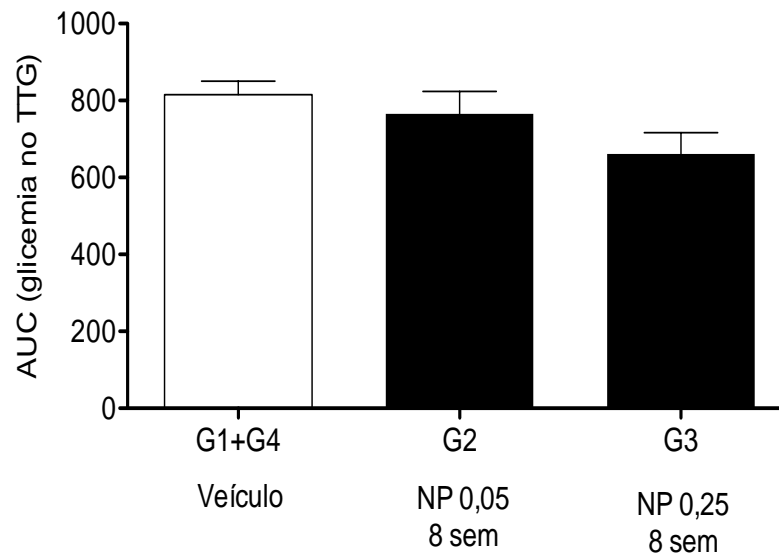


Figura 10 – TTG (Teste de tolerância a glicose): Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de glicose em camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (água, G1+G4) ou diferentes doses (G2 0,05 ou G3 0,25 mg/kg/d) de NP durante 8 semanas, da 6^a à 14^a semanas de vida. Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ G2 vs controle; ** $p < 0,05$ G3 vs controle. AUC: área sob a curva.

A partir da 14^a semana, o grupo tratado com veículo (água) foi dividido em dois grupos contendo 5 camundongos cada. Um dos grupos (G1) continuou a receber veículo e o

outro (G4), NP na dose de 0,25 mg/kg/d. Na 18^a semana de vida, a homeostase da glicose foi novamente avaliada pela determinação da glicemia de jejum e em resposta à sobrecarga intraperitoneal de glicose. Neste período, correspondente a 12 (6^a a 18^a semanas de vida) ou 4 (14^a a 18^a semanas de vida) semanas de tratamento com NP, não foi observada diferença da glicemia em jejum em relação ao grupo tratado com veículo (Figura 11).

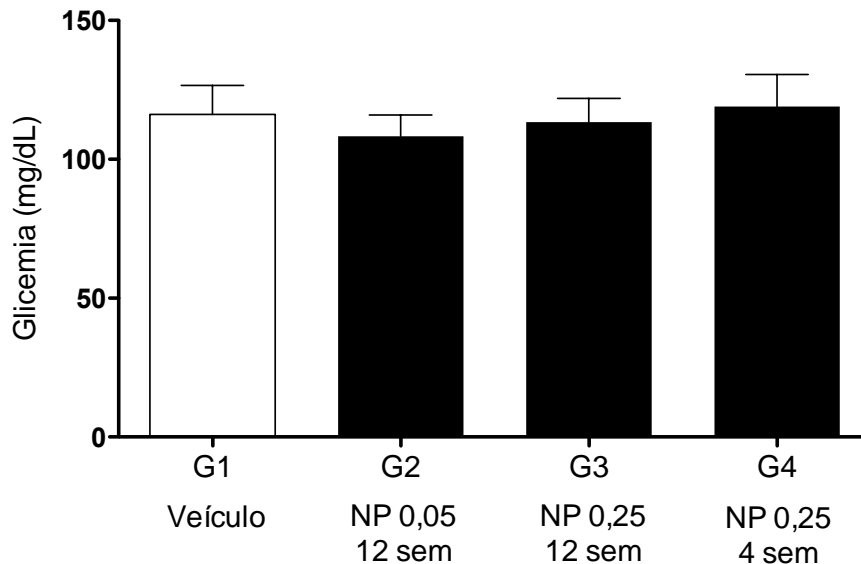
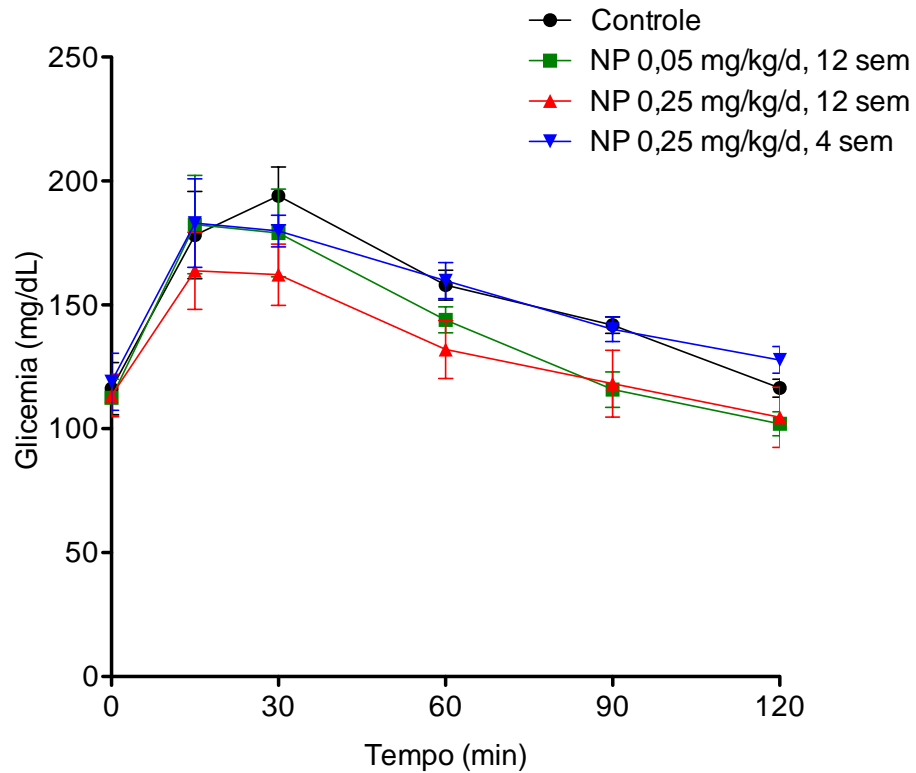


Figura 11 - O NP não modifica a glicemia de jejum de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle. Camundongos tratados com diferentes doses (0,05 ou 0,25 mg/kg/d) de NP durante 12 semanas (G2 e G3), da 6^a à 18^a semanas de vida, ou 4 semanas (G4), da 14^a à 18^a semanas de vida. Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA).

Neste mesmo período, foi observada redução significativa da glicemia em resposta a sobrecarga intraperitoneal de glicose nos camundongos tratados durante 12 semanas com a maior dose de NP (0,25 mg/kg/d), refletida em redução da área sob a curva da glicemia em função do tempo, após administração de glicose por via intraperitoneal (Figuras 12 A e B). O tratamento com NP na menor dose (0,05 mg/kg/d) durante 12 semanas ou com NP na maior dose (0,25 mg/kg/d) durante 4 semanas não modificou a glicemia após sobrecarga de glicose (Figuras 12 A e B).

A



B

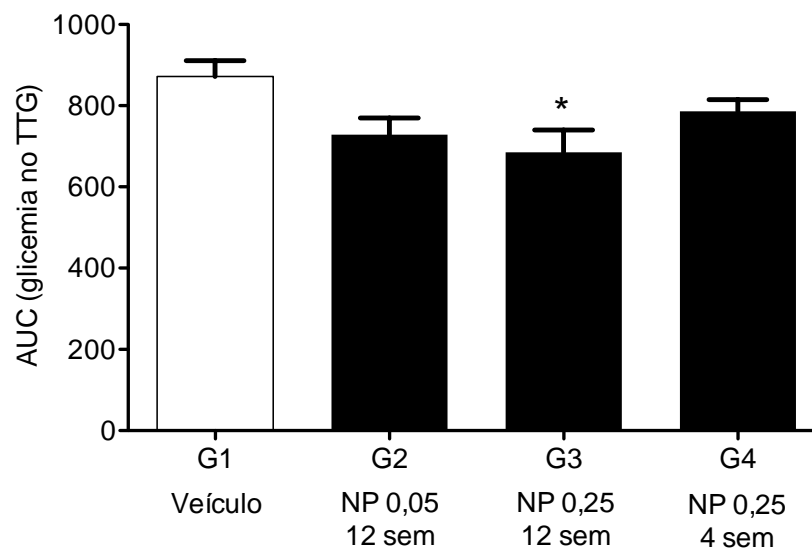


Figura 12 – TTG (Teste de tolerância a glicose): Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de glicose em camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 12 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 12 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 4 semanas), da 6^a à 18^a semanas de vida (G2 e G3) ou da 14^a à 18^a semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs controle. AUC: área sob a curva.

Considerando a redução da glicemia em resposta à sobrecarga de glicose intraperitoneal observada no grupo de camundongos tratados com NP na dose de 0,25 mg/kg/d durante 12 semanas, foi realizado, na 18ª semana de vida, o teste de tolerância à insulina, com o objetivo de investigar possível modificação da sensibilidade insulínica. Entretanto, não foi observada diferença da glicemia em resposta à administração da insulina nos grupos tratados com NP, quando comparados ao grupo tratado com veículo (Figura 13).

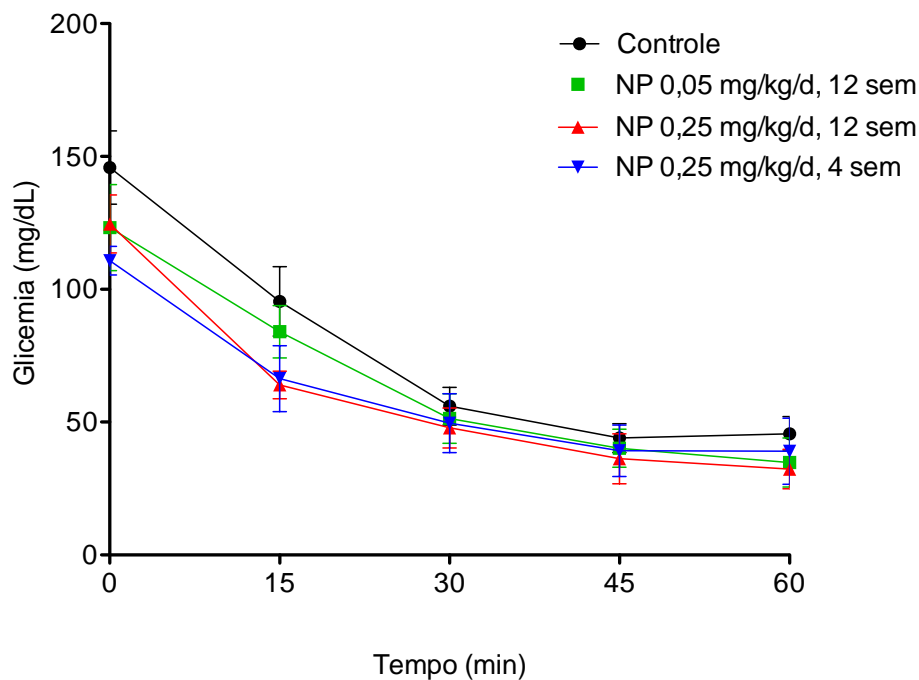


Figura 13 – Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de insulina em camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 12 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 12 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 4 semanas), da 6ª à 18ª semanas de vida (G2 e G3) ou da 14ª à 18ª semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA).

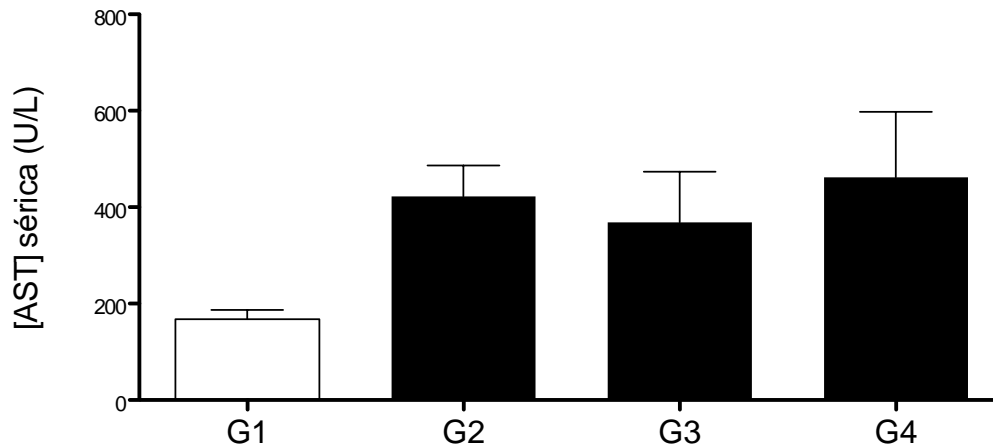
6.3 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TRANSAMINASES E SOBRE O PERFIL LIPÍDICO

Na 20ª semana de vida, após 14 semanas de tratamento com NP nas doses de 0,05 mg/kg/d (G2) ou 0,25 mg/kg/d (G3), ou após 6 semanas de tratamento com NP na dose de 0,25 mg/kg/d, os camundongos foram eutanasiados e foi coletado sangue para avaliação bioquímica.

Foi observada tendência de aumento da concentração sérica de aspartato aminotransferase em todos os camundongos tratados com NP, embora não estatisticamente

significativa (Figura 14A). Também foi observada tendência de aumento da concentração sérica de alanina aminotransferase nos camundongos tratados com NP 0,05 mg/kg/d durante 14 semanas ou NP 0,25 mg/kg/d durante 6 semanas, porém não estatisticamente significativa (Figura 14B).

A



B

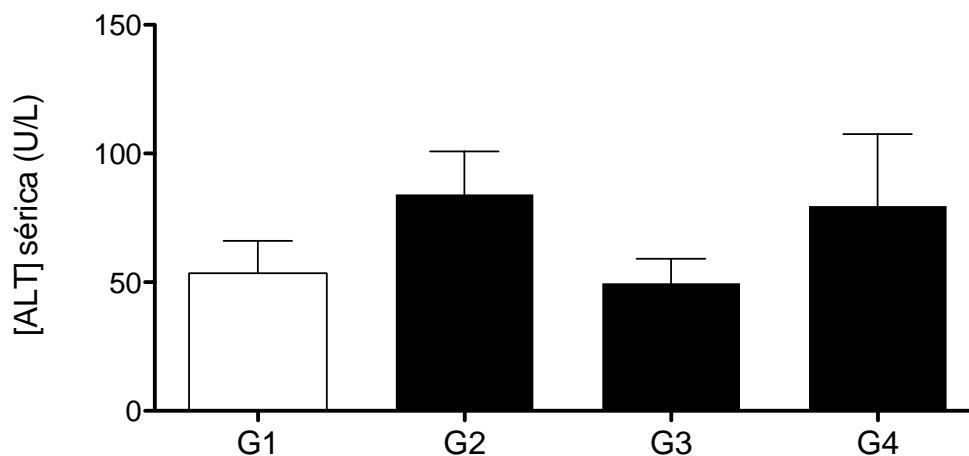


Figura 14 – Efeito do NP sobre a concentração sérica de transaminases de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 14 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 14 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 6 semanas), da 6ª à 20ª semanas de vida (G2 e G3) ou da 14ª à 20ª semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

Não foi observada diferença significativa do perfil lipídico dos animais tratados com NP em relação ao grupo controle (Figura 15).

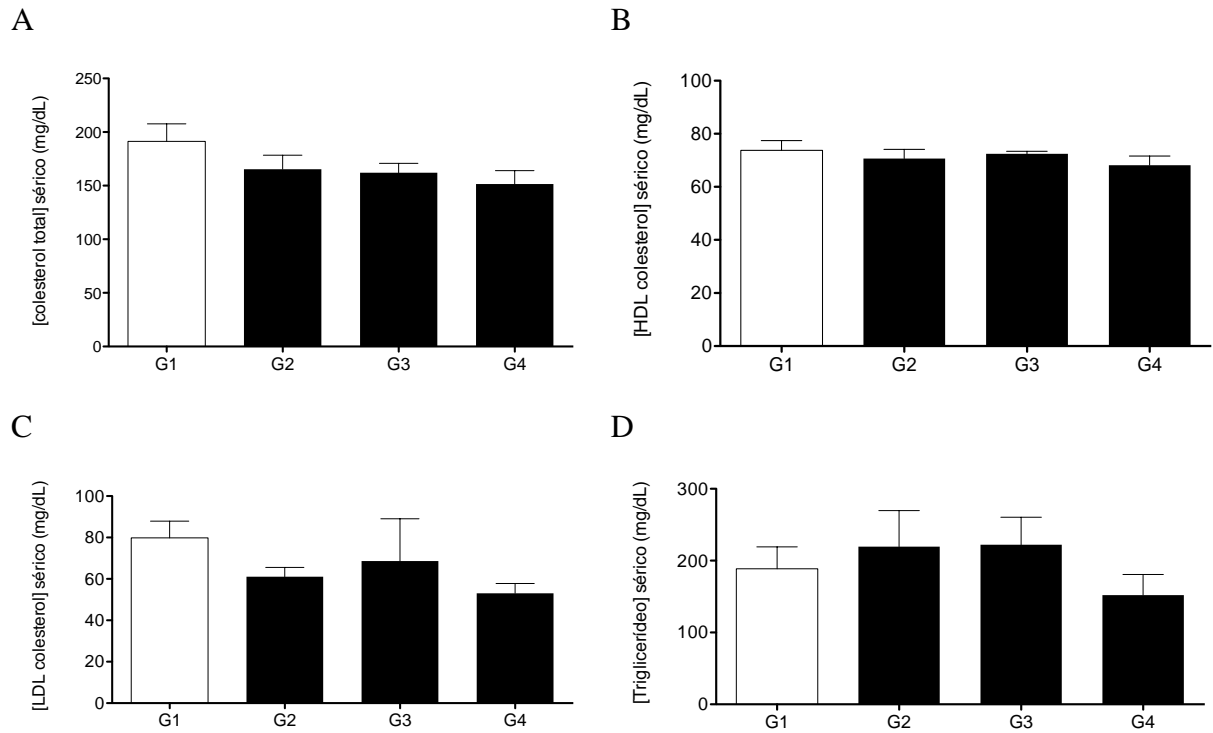


Figura 15 – Efeito do NP sobre o perfil lipídico de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 14 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 14 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 6 semanas), da 6^a à 20^a semanas de vida (G2 e G3) ou da 14^a à 20^a semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA). HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

6.4 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA DE DIFERENTES DEPÓSITOS DE TECIDO ADIPOSO E SOBRE A MASSA DO FÍGADO

Não foi observada modificação da massa adiposa visceral epididimal (Figuras 16A) ou retroperitoneal (Figura 16B) nos camundongos tratados com NP, em relação ao grupo controle.

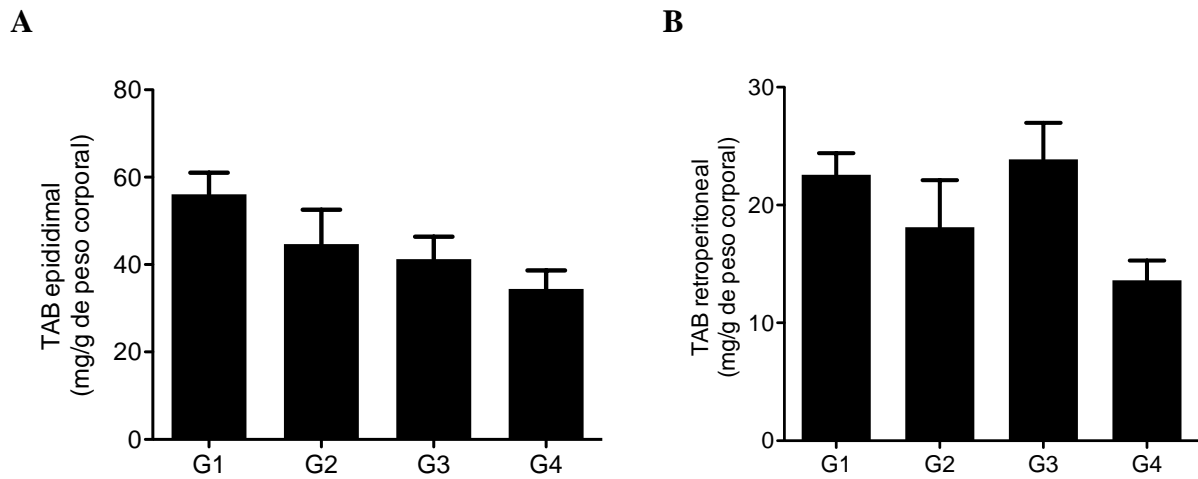


Figura 16 – Efeito do NP sobre a massa de tecido adiposo branco visceral (A) epididimal e (B) retroperitoneal de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 14 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 14 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 6 semanas), da 6^a à 20^a semanas de vida (G2 e G3) ou da 14^a à 20^a semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA). TAB: tecido adiposo branco.

Foi observada redução da massa adiposa subcutânea inguinal nos camundongos tratados com a maior dose de nonilfenol (0,25 mg/kg/d) durante 14 e 6 semanas (Figura 17).

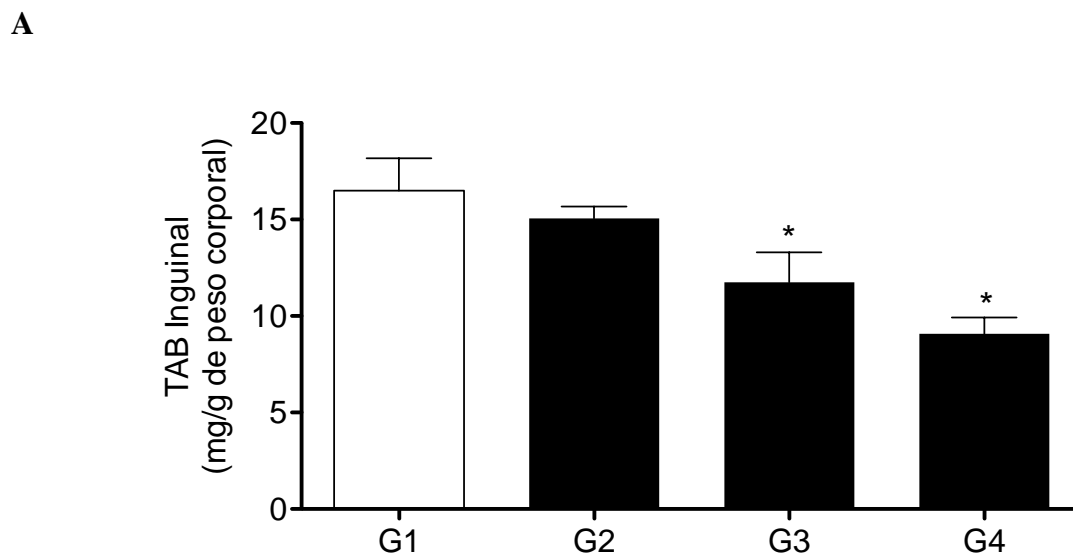


Figura 17 – Efeito do NP sobre a massa de tecido adiposo branco subcutâneo inguinal de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 14 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 14 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 6 semanas), da 6^a à 20^a semanas de vida (G2 e G3) ou da 14^a à 20^a semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs G1 (controle). TAB: tecido adiposo branco.

Foi observada tendência de redução da massa adiposa marrom interescapular nos camundongos tratados durante o maior período de tempo com NP (14 semanas), nas doses de 0,05 e 0,25 mg/kg/d, embora não estatisticamente significativa (Figura 18). A mesma tendência não foi observada nos camundongos tratados durante 6 semanas (Figura 18).

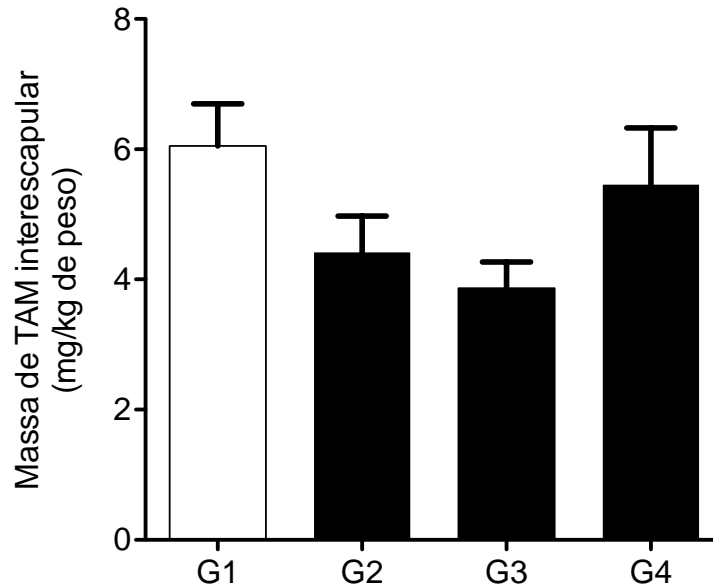
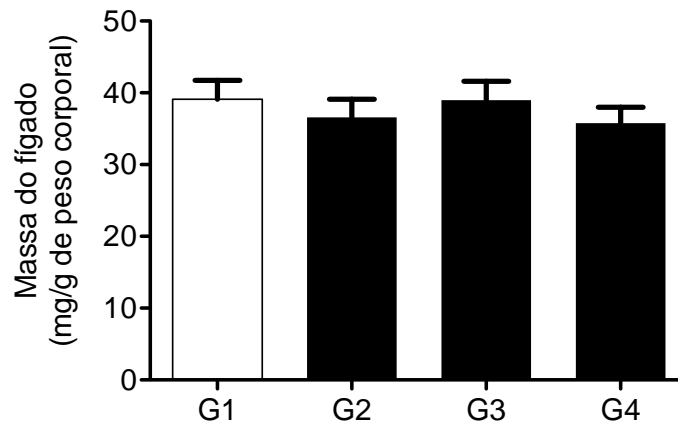


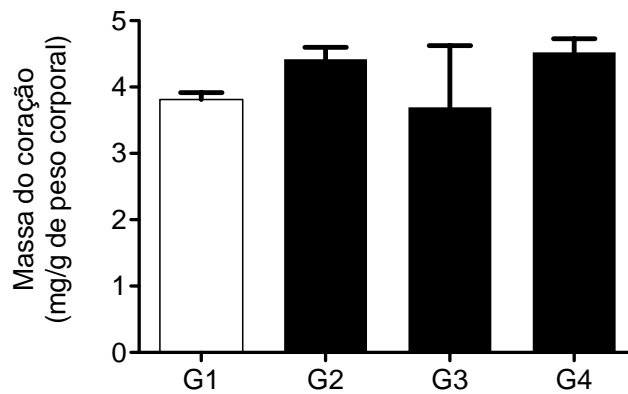
Figura 18 – Efeito do NP sobre a massa de tecido adiposo marrom interescapular de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 14 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 14 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 6 semanas), da 6^a à 20^a semanas de vida (G2 e G3) ou da 14^a à 20^a semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA). TAM: tecido adiposo marrom.

Não foi observada modificação da massa do fígado (Figura 19A), coração (Figura 19B) ou rins (Figura 19C) nos camundongos tratados com NP, quando comparados ao grupo controle.

A



B



C

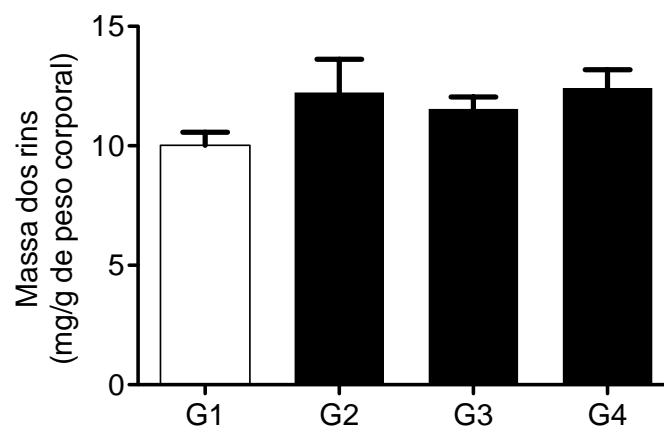


Figura 19 – Efeito do NP sobre a massa de diferentes órgãos. (A) do fígado, (B) do coração e (C) dos rins de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com veículo (G1) ou diferentes doses de NP durante diferentes períodos de tempo (G2 0,05 mg/kg/d, 14 semanas; G3 0,25 mg/kg/d, 14 semanas; G4 0,05 mg/kg/d, 6 semanas), da 6^a à 20^a semanas de vida (G2 e G3) ou da 14^a à 20^a semanas de vida (G4). Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (ANOVA).

6.5 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO TECIDO ADIPOSEO E DO FÍGADO

Foram avaliadas as características histológicas do tecido adiposo marrom, tecido adiposo branco epididimal inguinal e fígado dos camundongos tratados com veículo (grupo controle) ou diferentes doses de NP, durante diferentes períodos de tempo.

A avaliação histológica, qualitativa, foi sugestiva de aumento do conteúdo lipídico no tecido adiposo marrom interescapular dos camundongos tratados com NP nas doses de 0,05 e 0,25 mg/kg/d, durante 14 semanas, quando comparados com os camundongos no grupo controle (Figuras 20B e 20C). Este acúmulo foi menos acentuado nos animais tratados com 0,25 mg/kg/d de NP durante 6 semanas (Figura 20D).

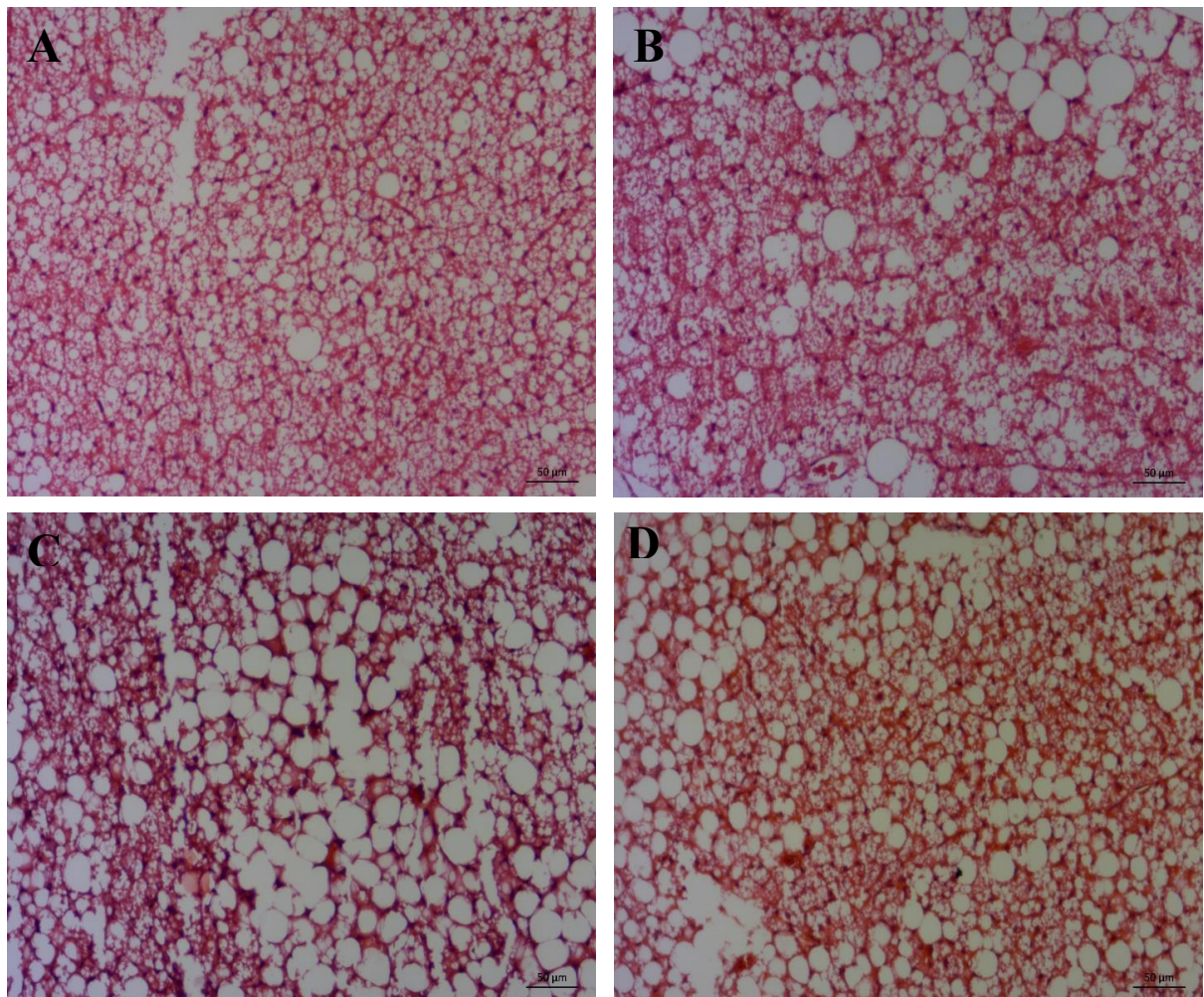


Figura 20 – Efeito do NP sobre características histológicas do tecido adiposo marrom interescapular de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com (A) veículo, (B) NP 0,05 mg/kg/d durante 14 semanas, (C) NP 0,25 mg/kg/d durante 14 semanas ou (D) NP 0,25 mg/kg/d durante 6 semanas. Aumento de 10X e escala de 50 micrometros.

A análise histológica do fígado foi sugestiva de aumento do conteúdo lipídico no fígado dos camundongos tratados com NP em diferentes doses e diferentes períodos de tempo, quando comparados com os camundongos no grupo controle (Figura 21). Este acúmulo pareceu ser mais acentuado nos animais tratados com NP na dose de 0,25 mg/kg/d durante 14 semanas (Figura 21C) e menos acentuado nos animais tratados com esta mesma dose, porém durante apenas 6 semanas (Figura 21D).

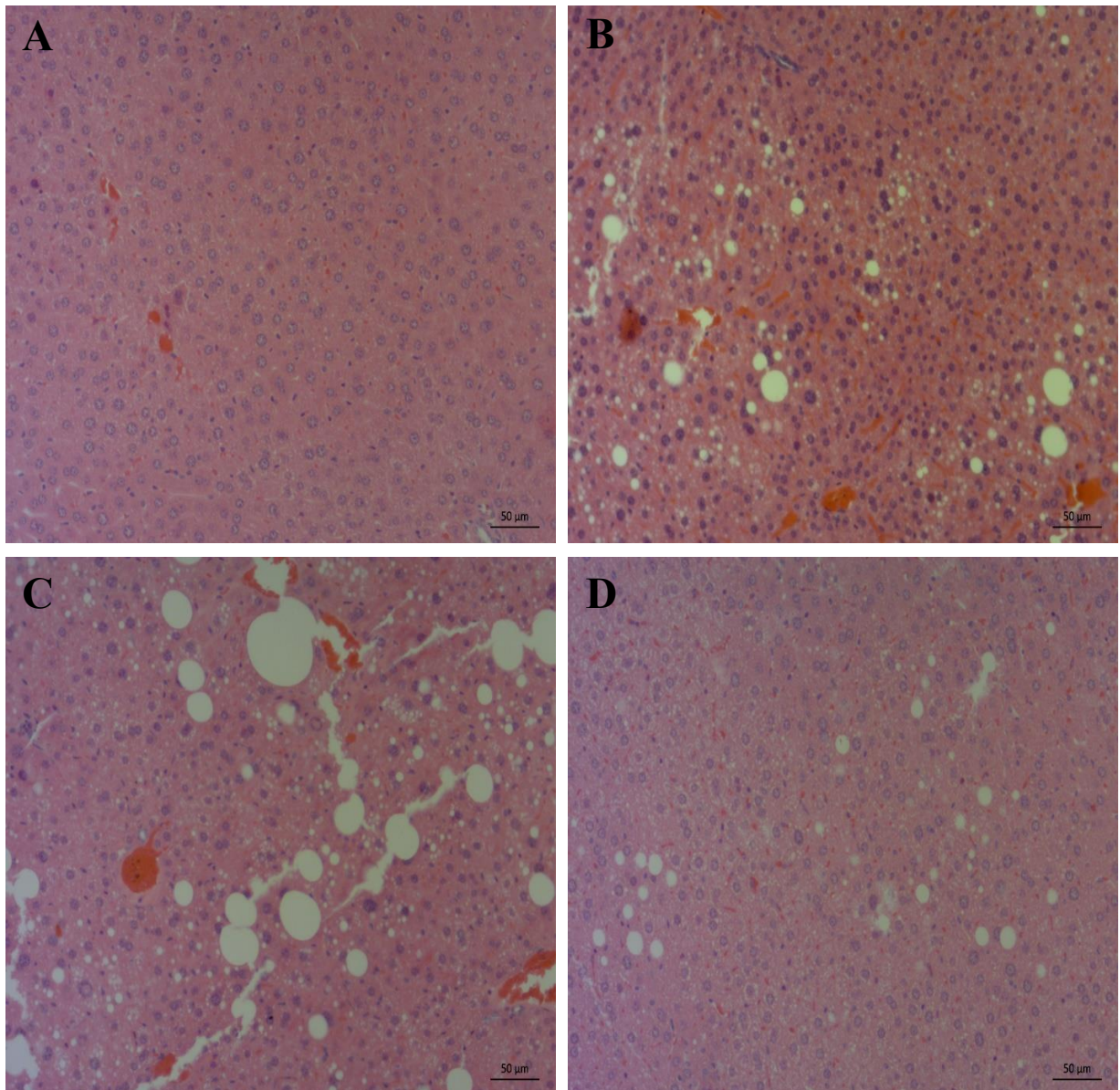


Figura 21 – Efeito do NP sobre características histológicas do fígado de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com (A) veículo, (B) NP 0,05 mg/kg/d durante 14 semanas, (C) NP 0,25 mg/kg/d durante 14 semanas ou (D) NP 0,25 mg/kg/d durante 6 semanas. Aumento de 10X e escala de 50 micrometros.

A análise histológica do tecido adiposo branco inguinal foi sugestiva de aumento do diâmetro dos adipócitos, neste depósito, dos camundongos tratados com a maior dose de NP

(0,25 mg/kg/d) durante 14 (Figura 22B) e 6 (Figura 22C) semanas, quando comparados aos animais no grupo controle (Figura 22A). Esta mesma tendência não foi observada nos animais tratados com a menor dose de NP (0,05 mg/kg/d) durante 14 semanas (Figura 22B).

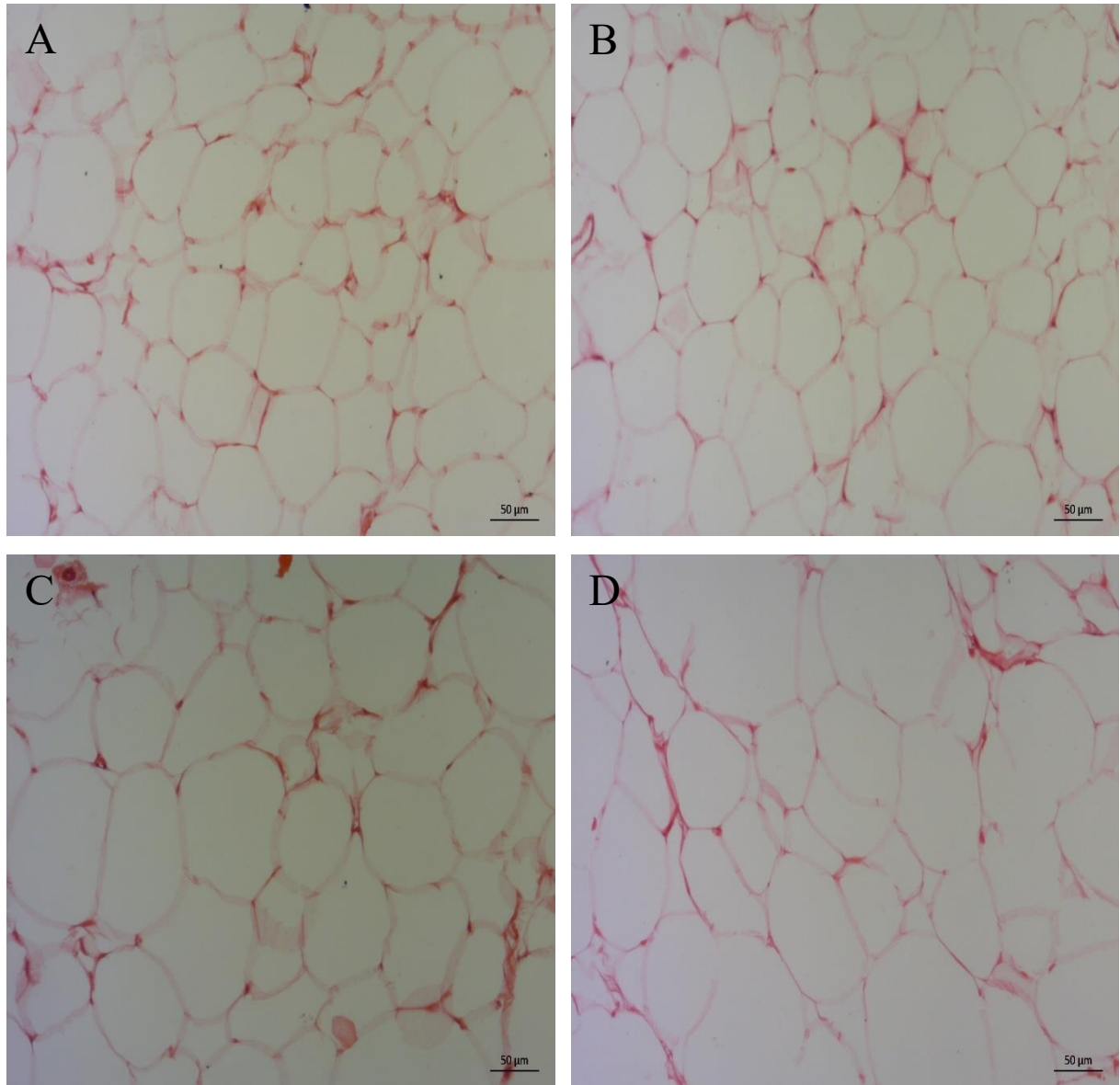


Figura 22 – Efeito do NP sobre características histológicas do tecido adiposo branco inguinal de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com (A) veículo, (B) NP 0,05 mg/kg/d durante 14 semanas, (C) NP 0,25 mg/kg/d durante 14 semanas ou (D) NP 0,25 mg/kg/d durante 6 semanas. Aumento de 10X e escala de 50 micrometros.

Não foi observada diferença do tamanho dos adipócitos brancos viscerais epididimais entre os camundongos tratados com diferentes doses de NP, durante diferentes períodos de tempo, e os animais no grupo controle (Figura 23).

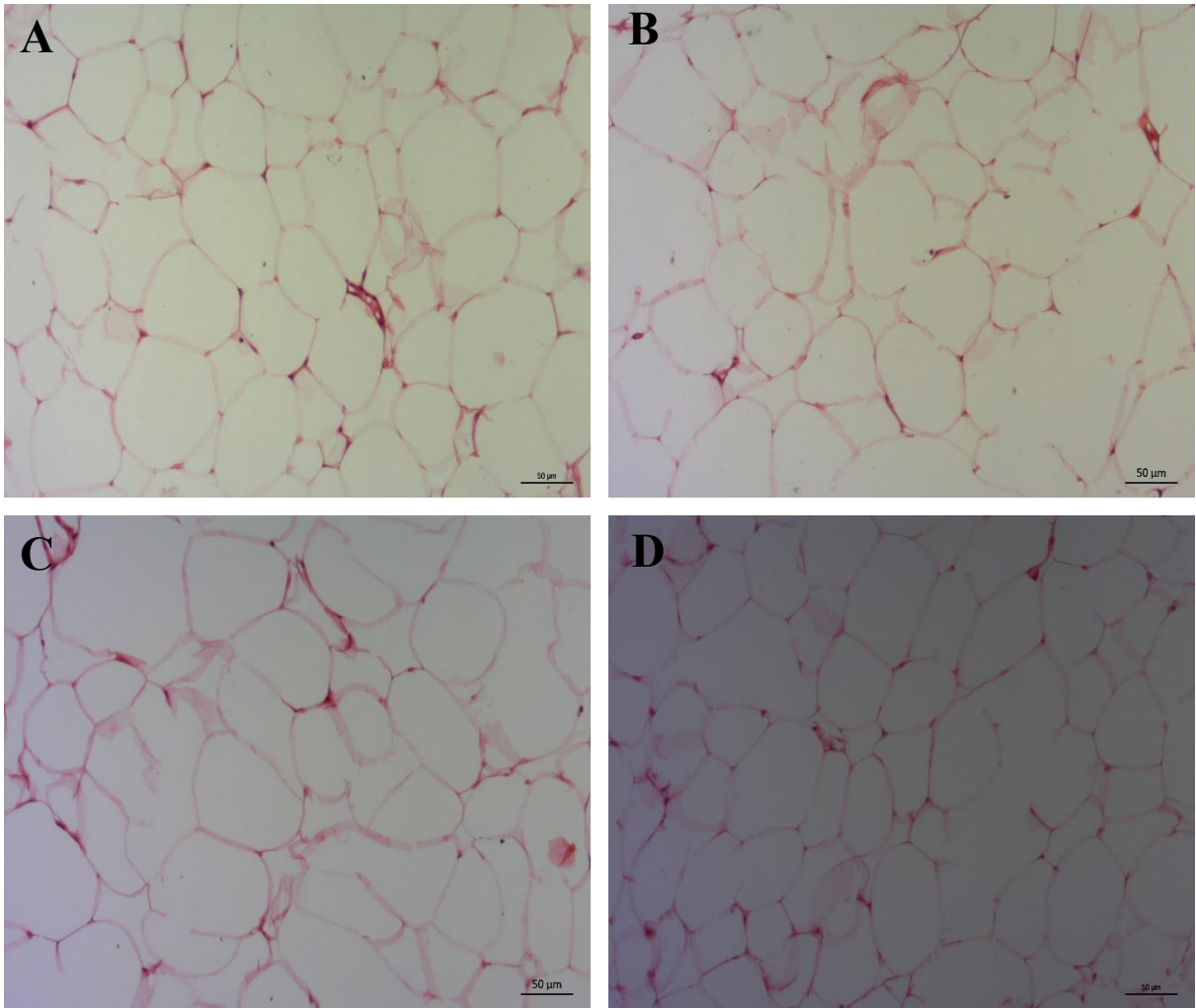


Figura 23 – Efeito do NP sobre características histológicas do tecido adiposo branco epididimal de camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta controle e tratados com (A) veículo, (B) NP 0,05 mg/kg/d durante 14 semanas, (C) NP 0,25 mg/kg/d durante 14 semanas ou (D) NP 0,25 mg/kg/d durante 6 semanas. Aumento de 10X e escala de 50 micrometros.

7 DISCUSSÃO

Todos os anos, toneladas de substâncias sintéticas e naturais são lançadas no meio ambiente e, entre elas, número considerável é de DE. Muitas são também bioacumulativas, persistentes, lipofílicas e têm baixa pressão de vapor, o que facilita a dispersão e difusão no meio ambiente (BILA, 2007). A identificação de seus efeitos em animais é complexa, por diversos aspectos. A exposição aos DE não está limitada a apenas uma substância, mas a uma combinação delas (KNEZ, 2013). Além disso, um DE pode apresentar efeito aditivo ou sinérgico com outro (KORTENKAMP, 2007). Estes aspectos fazem com que os estudos em ambientes controlados, com a exposição a um único DE, sejam essenciais à compreensão dos efeitos de um DE específico.

A atividade desreguladora endócrina destas substâncias inicialmente identificada foi sobre o sistema reprodutivo. Entretanto, recentemente vêm sendo apontadas também como candidatas na fisiopatologia de doenças metabólicas como obesidade e *diabetes mellitus* tipo 2 (CASALS-CASAS et al., 2011; HECTORS et al., 2011). A associação entre DE e doenças metabólicas se deu a partir de estudo que mostrou o potencial adipogênico do DE tributilestano em cultura de células e, também, a associação entre a exposição a este DE na vida intrauterina e o desenvolvimento de obesidade no período pós-natal (GRÜN et al., 2006). A partir destes dados, foi formulada a hipótese obesogênica, segundo a qual a exposição a poluentes ambientais no início da vida ou ao longo da vida teria papel no desenvolvimento da obesidade (GRÜN et al., 2006). Estudos posteriores confirmaram esta hipótese e associaram, em humanos, a exposição aos DE a distúrbios metabólicos relacionados à obesidade, como resistência à insulina, *diabetes mellitus* tipo 2 e síndrome do ovário policístico (CASALS-CASAS et al., 2011; HATCH et al., 2010; NEWBOLD, 2010; BEN-JONATHAN N et al., 2009).

O nonilfenol pertence ao grupo dos etoxilatos de alquilfenóis, utilizados na produção de tintas, cosméticos, pesticidas, surfactantes e detergentes industriais (GHISELLI e JARDIM, 2007). Uma série de efeitos adversos da exposição ao nonilfenol já foi descrita em mamíferos e outros grupos animais, incluindo efeitos estrogênicos, tóxicos e carcinogênicos (SPADOTO, 2013; LAWS, 2000; WATANABE et al., 2004). Mais recentemente, foi associado também a distúrbios metabólicos, na medida em que foi identificado seu potencial de induzir estresse oxidativo (PALERMO, 2012), adipogênese (HAO et al., 2012) e comprometimento da sinalização insulínica (JUBENDRADASS, 2012).

O potencial adipogênico do nonilfenol foi investigado previamente em cultura e *in vivo*. Em linhagens celulares induzidas a se diferenciar em adipócitos em cultura, seu potencial adipogênico não está completamente definido, uma vez que alguns estudos conduzidos em condições semelhantes mostram resultados conflitantes. Alguns indicam sua capacidade de estimular a adipogênese (HAO et al., 2012), ao passo que outros indicam efeito supressor sobre a adipogênese (MASUNO et al., 2003; MASUNO et al., 2005; PEREIRA-FERNANDES et al., 2013). *In vivo*, foi observado que a exposição aguda (24 horas) de camundongos ao nonilfenol induz a expressão de genes relacionados à adipogênese e lipogênese no fígado e tecido adiposo (HAO et al., 2012) e que a exposição de camundongos a este DE na vida intrauterina induz obesidade no período pós-natal (HAO et al., 2012).

Para nosso conhecimento, não havia estudos prévios que avaliaram o efeito da exposição concorrente e crônica ao nonilfenol, fora do período de desenvolvimento (vida intrauterina e período neonatal), sobre o peso corporal e variáveis metabólicas. Desta forma, o presente estudo visou analisar se a exposição de camundongos machos ao nonilfenol (NP), desde o desmame até a vida adulta, ou somente durante a vida adulta, acarreta modificações do peso corporal, de depósitos específicos de gordura e da homeostase da glicose. As doses de nonilfenol utilizadas, de 0,05 e 0,25 mg/kg/d na água de beber, foram selecionadas com base em estudo anterior em que foi descrito o potencial obesogênico da exposição ao nonilfenol na vida intrauterina e neonatal precoce (HAO et al., 2012) e em estudos prévios com este DE que investigaram o efeito de doses superiores sobre outros desfechos e não observaram sinais de toxicidade (NAGAO et al., 2001; GREEN et al., 2003). Assim, as doses utilizadas foram consideradas seguras para a exposição crônica.

Para avaliar o efeito da exposição ao nonilfenol desde o desmame até a vida adulta, um grupo de camundongos recebeu 0,05 mg/kg/d do DE na água de beber, a partir da 6^a semana de vida até a vigésima semana de vida, e outro grupo, 0,25 mg/kg/d, no mesmo período. Para investigar o efeito da exposição ao nonilfenol apenas na vida adulta, um grupo recebeu o DE, na dose de 0,25 mg/kg/d, entre a 14^a e a 20^a semana de vida. Não foi observada modificação significativa do peso corporal dos animais tratados com nonilfenol, independentemente da dose e do tempo de exposição, embora tenha sido verificada tendência de menor peso em todos os grupos tratados com o DE. Estes resultados diferem daqueles descritos em estudos que investigaram o efeito da exposição ao nonilfenol na vida intrauterina sobre o desenvolvimento de obesidade (HAO et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Esta divergência sugere que o efeito adipogênico mais expressivo do nonilfenol, traduzido em

aumento da quantidade de tecido adiposo, ocorra apenas quando da exposição na vida intrauterina, um período crítico do desenvolvimento do deste tecido (NEWBOLD, 2010). Este efeito poderia, assim, não ser observado quando a exposição se dá depois do completo desenvolvimento do tecido.

Depois de completar o seu desenvolvimento, o tecido adiposo mantém-se altamente dinâmico, em um processo de remodelamento constante caracterizado pela morte de adipócitos e sua reposição por células recém-diferenciadas (LEE et al., 2010). Este processo pode ser influenciado por diversos fatores fisiológicos e patológicos (LEE et al., 2010). É possível que, fora do período crítico de desenvolvimento, a exposição ao nonilfenol influencie o remodelamento do tecido adiposo e resulte em efeitos menos pronunciados sobre a quantidade de tecido adiposo ou mesmo sobre sua função. De fato, embora não tenha sido observada diferença de peso corporal nos camundongos tratados com nonilfenol em relação aos que receberam veículo, foi observada redução da massa adiposa subcutânea inguinal nos animais tratados com a dose de 0,25 mg/kg/d do DE, durante 14 e 6 semanas. Nestes grupos, observou-se também tendência de aumento do diâmetro dos adipócitos neste depósito de tecido adiposo. Estes resultados poderiam sugerir efeito remodelador do nonilfenol sobre o tecido adiposo branco subcutâneo. Em concordância com esta possibilidade, está a descrição prévia do efeito remodelador sobre o tecido adiposo de alguns DE que modificam atividade dos esteroides sexuais (GRUN E BLUMBERG, 2009). Sendo o nonilfenol um DE com atividade estrogênica bem estabelecida (WATANABE et al., 2004), este aspecto poderia explicar seu efeito sobre a massa adiposa inguinal e suas características histológicas.

Os outros depósitos de tecido adiposo analisados, visceral epididimal e retroperitoneal, e marrom interescapular, não tiveram sua massa modificada em resposta ao nonilfenol. Entretanto, é importante destacar que no tecido adiposo marrom interescapular foi observado aumento do acúmulo intracelular de lipídeos, à semelhança do que foi observado no tecido adiposo inguinal (tendência de aumento do diâmetro das células, que traduz aumento do acúmulo lipídico). O aumento do acúmulo lipídico nestes depósitos, na ausência de aumento de sua massa (ou mesmo redução, no caso da massa adiposa inguinal), poderia sugerir redução concomitante do número de células nestes sítios. Entretanto, estes aspectos não foram analisados no presente estudo.

A exposição aos DE é associada também a aumento do risco de diabetes em algumas populações, independentemente da presença de obesidade (LEE et al., 2006; NING et al., 2011; SUN et al., 2012). Estudos em modelos animais e *in vitro* vêm sugerindo possíveis mecanismos para explicar esta associação. Muitos estudos em cultura de células indicam que

os DE podem comprometer a secreção ou ação da insulina (RUZZIN et al., 2010; HURST et al., 2003; NOVELLI et al., 2005). Em estudos *in vivo*, foi observado que a exposição de camundongos a DE compromete a função secretória da célula beta pancreática e a sinalização insulínica (ALONSO-MAGDALENA et al., 2006; BATISTA et al., 2012). Outro estudo envolvendo exposição concorrente a uma mistura de DE, no entanto, mostrou melhora da sensibilidade insulínica e da tolerância à glicose de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (IBRAHIM et al., 2012).

Para nosso conhecimento, o efeito da exposição concorrente crônica ao nonilfenol sobre a homeostase da glicose não foi previamente analisado. No presente estudo, foi avaliada a glicemia de jejum e a tolerância a glicose de camundongos alimentados com dieta normolipídica e que receberam nonilfenol desde o desmame até a vida adulta ou somente durante a vida adulta.

Nos grupos de camundongos expostos ao nonilfenol nas doses de 0,05 ou 0,25 mg/kg/d durante 8 semanas, a partir do desmame (6^a semana), não foi observada alteração da glicemia de jejum ou da área sob a curva da tolerância à glicose, embora no grupo que recebeu a maior dose de nonilfenol a glicemia 30 e 60 min após a administração de sobrecarga intraperitoneal de glicose tenha sido significativamente inferior à dos animais no grupo controle. Uma possível explicação é que a exposição ao nonilfenol, nas doses testadas e durante o período de tempo analisado, não cause efeitos adversos sobre os tecidos chave envolvidos na homeostase da glicose, a saber pâncreas, fígado, tecido adiposo e músculo esquelético. É possível, ainda, que a exposição ao nonilfenol, na maior dose testada (0,25 mg/kg/d) apresente efeito positivo sobre a tolerância à glicose, uma vez que os animais tratados com esta dose apresentaram tendência de glicemias menores após a sobrecarga oral de glicose.

A avaliação da homeostase da glicose, realizada após 12 semanas de exposição ao nonilfenol nas doses de 0,05 e 0,25 mg/kg/d, a partir da 6^a semana de vida, não mostrou modificação da glicemia de jejum ao grupo controle, porém mostrou melhora da tolerância à glicose, indicada por menor área sob a curva da glicemia após sobrecarga intraperitoneal de glicose, nos camundongos tratados com 0,25 mg/kg/d de nonilfenol. Estes resultados confirmaram a tendência observada após exposição a esta dose do nonilfenol durante 8 semanas. A discrepância entre o efeito do nonilfenol sobre a glicemia de jejum e sobre a glicemia após sobrecarga de glicose pode refletir seu efeito diferencial sobre os mecanismos envolvidos na determinação da glicemia nestas duas situações, jejum e pós-sobrecarga de glicose.

Para investigar o efeito do nonilfenol, administrado em diferentes doses e durante diferentes períodos, sobre a sensibilidade à insulina, foi realizado o teste de tolerância insulínica. Não houve diferença da glicemia dos animais nos diferentes grupos, em resposta à insulina, sugerindo que o nonilfenol não modificou a ação da insulina em promover a captação de glicose nos tecidos chave de ação da insulina. A observação de melhora da tolerância à glicose na ausência de alteração da sensibilidade à insulina poderia sugerir efeito favorável do nonilfenol sobre a função secretória da célula beta pancreática.

Não foram observadas também modificações do perfil lipídico, em particular da concentração sérica de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos. Esses resultados sugerem que o nonilfenol, nas doses e períodos de tempo testados, não influencia o metabolismo lipídico analisado por estes marcadores, e é consistente com a ausência de alterações observadas no peso corporal e na glicemia de jejum, além da ausência de impacto negativo sobre a tolerância à glicose.

A determinação da concentração sérica de enzimas hepáticas transaminases (ALT e AST) não evidenciou alterações significativas nos grupos tratados com nonilfenol em relação ao grupo controle, embora tenha sido observada tendência de aumento da concentração de AST em todos os grupos tratados com o DE estudado. Também não foi observada alteração da massa do fígado, em relação ao peso corporal, nos grupos tratados com nonilfenol. As enzimas hepáticas representam importantes indicadores de dano hepatocelular (MARTIN et al., 1981; MILLER & GONÇALVES, 1999; ALHABORI et al., 2002), de modo que a tendência de aumento da concentração sérica de AST nos grupos que receberam o nonilfenol pode sugerir efeito hepatotóxico, ainda que discreto. Em concordância com este achado, a análise histológica do fígado sugeriu aumento do acúmulo lipídico. Embora a causa mais comum de deposição hepática de lipídeos seja a síndrome metabólica, que inclui a obesidade e o *diabetes mellitus* tipo 2 (ambos não observados neste estudo), pode ser também secundária a fatores ambientais tóxicos (KNEEMAN et al., 2012), como é o caso do nonilfenol.

Em um estudo prévio, foi observado que o nonilfenol, administrado nas doses de 2, 10 e 50 mg/kg/d, durante 30 dias, a ratos Sprague-Dawley machos, induziu esteatose hepática, acompanhada de aumento da concentração sérica de enzimas hepáticas e perfil de expressão gênica no fígado indicativo de acúmulo lipídico, apoptose e estresse oxidativo (KOUROUMA et al., 2015). Embora os dados do presente estudo tenham sugerido também que o nonilfenol é capaz de induzir esteatose hepática, não foi observado aumento significativo da concentração

sérica de transaminases. É possível que esta diferença entre o presente estudo e o estudo de (KOUROUMA ET AL., 2012) se deva às diferentes doses de nonilfenol administradas (0,25 mg/kg/d vs 2, 10 e 50 mg/kg/d), ou mesmo às diferenças do período do tratamento.

Estudos prévios sugeriram o potencial nefrotóxico do nonilfenol. Foi observado que o nonilfenol (2 mg/kg/d, por 24 semanas) foi capaz de acentuar as lesões renais induzidas por adenina em ratos Wistar (YEN et al., 2012A; YEN et al., 2012B), e que este DE (25 mg/kg/d, 50 dias), administrado também a ratos Wistar, foi capaz de induzir estresse oxidativo renal (KORKMAZ et al., 2011). O presente estudo não foi desenhado para avaliar o efeito do nonilfenol sobre o rim e as doses utilizadas foram consideravelmente inferiores às utilizadas nos estudos prévios descritos. Não foi observada alteração da massa renal, sugerindo ausência de dano renal crônico significativo. Entretanto, esta conclusão é limitada pela ausência de outras avaliações relacionadas à função renal.

Não foram observadas alterações da massa cardíaca no presente estudo, que também não foi desenhado para avaliar potenciais efeitos do nonilfenol sobre o coração. Não foram encontrados estudos prévios, *in vivo*, que avaliassem o efeito deste DE sobre a estrutura ou função cardíacas. Estudos *ex vivo*, envolvendo cultura de miócitos (GAO et al., 2015) ou corações isolados (WANG et al., 2013), entretanto, descreveram efeitos cardiotoxicos do nonilfenol.

A ausência de efeitos do nonilfenol sobre a massa de órgãos e tecidos analisados no presente estudo, assim como a observação de que os animais tratados com este DE não apresentaram redução do consumo de dieta ou água, sugerem que o tratamento durante 14 semanas (com as doses de 0,05 e 0,25 mg/kg/d) ou 6 semanas (com a dose de 0,25 mg/kg/d) não tenha apresentado toxicidade significativa. É pouco provável, assim, que a ausência do efeito obesogênico do nonilfenol observada no presente estudo tenha sido devida a sua toxicidade. Como mencionado anteriormente, as doses utilizadas foram selecionadas a partir de estudo prévio em que camundongos fêmeas foram expostas ao nonilfenol desde o 12º dia de gestação até o 7º dia de lactação (HAO et al., 2012), e foram inferiores às utilizadas em estudos que investigaram a toxicidade do nonilfenol (NAGAO et al., 2001; GREEN et al., 2003). Além disso, embora não avaliado objetivamente, não foram observadas características que sugerissem comprometimento dos animais.

Em síntese, nossos dados sugerem que a exposição ao nonilfenol fora do período de desenvolvimento não apresente efeito obesogênico. O nonilfenol não induziu ganho de peso

de camundongos tratados com as doses de 0,05 e 0,25 mg/kg/d desde o desmame até a vida adulta (por um total de 14 semanas), ou com a dose de 0,25 mg/kg/d durante a vida adulta por um total de 6 semanas). O tratamento com a maior dose (0,25 mg/kg/d) induziu, após 12 semanas, melhora da tolerância à glicose administrada por via intraperitoneal, em animais alimentados com dieta normolipídica, sem modificar a sensibilidade insulínica avaliada pelo teste de tolerância à insulina e sem modificar o perfil lipídico. Além disso, o tratamento com 0,25 mg/kg/d de nonilfenol foi capaz de reduzir a massa adiposa subcutânea inguinal e, independentemente da dose ou período de tratamento, o nonilfenol foi capaz de induzir acúmulo lipídico no fígado e tecido adiposo marrom.

A redução da massa adiposa subcutânea, além do acúmulo lipídico no fígado (esteatose hepática) e também no tecido adiposo marrom, são associados a obesidade visceral, resistência insulínica, dislipidemia e hiperglicemia (WAJCHENBERG, 2010). Embora, no presente estudo, tenha sido observada redução da massa adiposa inguinal (subcutânea) e acúmulo lipídico no fígado e tecido adiposo marrom interescapular, não foram observadas alterações metabólicas desfavoráveis. De forma inesperada, foi observada melhora da tolerância à glicose após 12 semanas de tratamento com nonilfenol na dose de 0,25 mg/kg/d. A ausência de alterações metabólicas significativas pode ser devida às baixas doses utilizadas em um modelo animal alimentado com dieta normolipídica, sem a presença de condições adicionais que determinem alterações metabólicas. É possível, assim, que a administração destas mesmas doses de nonilfenol a modelos murinos de obesidade e síndrome metabólica resulte em impacto metabólico desfavorável.

Existe grande preocupação quanto à exposição humana a DE ambientais e à contribuição destes para o desenvolvimento de doenças humanas. A identificação destas substâncias, de seus efeitos e de seus mecanismos de ação é fundamental para que se elaborem estratégias efetivas para minimizar seus efeitos sobre a saúde humana visto que é impossível não ter contato com essas substâncias desreguladoras endócrinas. Quanto ao nonilfenol, os dados do presente estudo são insuficientes para elucidar seu efeito sobre a homeostase metabólica. Estudos futuros são necessários para melhor explorar os efeitos do nonilfenol. Idealmente, estes estudos devem investigar os efeitos de diferentes doses e períodos de exposição, em modelos de animais saudáveis ou com situações que predisponham à obesidade, à semelhança do que ocorre em humanos.

8 CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo permitem concluir que o nonilfenol, administrado nas doses de 0,05 mg/kg/d ou 0,25 mg/kg/d, da 6^a à 20^a semanas de vida, ou na dose de 0,25 mg/kg/d, da 14^a à 20^a semanas de vida, em relação ao grupo controle:

- Não modificou a massa corporal ou o ganho de massa corporal.
- Não modificou a ingestão de energia.
- Aumentou o consumo hídrico no grupo que recebeu NP na concentração de (0,05 mg/kg/d) durante 14 semanas, e não nos demais grupos.
- Não modificou a glicemia de jejum.
- Na dose de 0,25 mg/kg/d, administrada da 6^a à 20^a semanas, aumentou a tolerância à glicose, e não modificou esta variável nos grupos que receberam a outra dose testada ou que foi tratado somente durante a vida adulta.
- Não modificou a sensibilidade insulínica.
- Não modificou a concentração sérica de AST e ALT, embora tenha havido tendência de aumento em todos os grupos tratados com nonilfenol.
- Não modificou o perfil lipídico.
- Não modificou a massa de tecido adiposo branco visceral epididimal ou retroperitoneal.
- Na dose de 0,25 mg/kg/d, administrada do desmame à vida adulta ou somente durante a vida adulta, reduziu a massa de tecido adiposo branco subcutâneo inguinal.
- Não modificou a massa de tecido adiposo marrom interescapular.
- Não modificou a massa do fígado, rins e coração.
- Aumentou o acúmulo lipídico no tecido adiposo marrom interescapular, fígado e tecido adiposo branco subcutâneo inguinal.

REFERÊNCIAS

ADAMS, L.A. ET AL. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. **J Hepatol**, v.1, p. 132-8, 2005.

ADEMOLLO, N.; FERRARA, F.; DELISE, M.; FABIETTI, F.; FUNARI, E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. **Environment International**, v. 34, p. 984–987. 2008.

AL-HABORI M, AL-AGHBARI A, AL-MAMARY M, BAKER M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol**, v. 3, p. 209-17, 2002.

AHEL M., GIGER W. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. **Chemosphere**, v. 26, p. 1461–1470, 1993.

ALMEIDA, CRISTINA M. M.; Desreguladores Endócrinos, Congresso Nacional dos Farmacêuticos, **Centro de Congressos de Lisboa**, 27 a 29 de novembro, 2003.

ALONSO-MAGDALENA P, MORIMOTO S, RIPOLL C, FUENTES E, NADAL A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. **Environ Health Perspect**, v.6, n. 114, p. 106–12, 2006.

ALVES, CRÉSIO; FLORES, LINDIANA CHAGAS; CERQUEIRA, TAÍS SOUZA; TORALLES, MARIA BETÂNIA P.; Exposição Ambiental a Interferentes Endócrinos com Atividade Estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças, **Cad. Saúde Pública**, v.23, n. 5, p. 1005-1014, 2007.

ANA M. SOTO, HONORATO JUSTICIA, JPNATHAN W. WRAY, CARLOS SONNENSCHNEIN. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. **Endocrinology Environmental Health**, v. 135, n.1, p. 175-182, 1994.

AUGER, JACQUES ET AL; Decline in Semen Quality Among Fertile Men in Paris During the Past 20 Years, **New England Journal of Medicine**, v.332, p. 281-285, 1995.

BACCARELLI A., PESATORI A.C., BERTAZZI P.A. Occupational and environmental agents as endocrine disruptors: Experimental and human evidence **J. Endocrinol. Invest.** v. 23, p. 771–781, 2000.

BATISTA TM, ALONSO-MAGDALENA P, VIEIRA E, AMARAL ME, CEDERROTH CR, NEF S, ET AL. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. **PloS One**, v. 7, 2012.

BERGERON, J. M.; CREWS, D.; MCLACHLAN, J. A. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 9, p. 780-781, 1994.

BERRYMAN, D.; HOUDE, F.; DEBLOIS, C.; O'SHEA, M. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. **Chemosphere**, v. 56, p. 247–255, 2004.

BICCHI C., SCHILIRÒ T., PIGNATA C., FEA E., CORDERO C., CANALE F. AND GILLI G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 1842-51, 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.3, p.651-666, 2007.

BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge** Campbell, Neil; Reece, Jane; —Hormones and the Endocrine System. Powerpoint Lectures for Biology, 7th Edition, Pearson Education, Inc publishing as Benjamin Cummings, 2005.

CAIRNS, S.R. & PETERS, T.J. Biochemical analysis of hepatic lipid in alcoholic and diabetic and control subjects. **Clin Sci (Lond)**, v.6, p.645-52, 1983.

CAMPOS, LUÍS; Entender a Bioquímica, **Escolar Editora**, 1998.

CANADIAN ENVIRONMENTAL QUALITY GUIDELINES. **Canadian Water Quality Guidelines for the protection of aquatic life: Nonylphenol and its ethoxylates**. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, Canada, 1999.

CASALS-CASAS C, DESVERGNE B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annu Rev Physiol**, v.73: p.135-162, 2011.

CASALS-CASAS C., DESVERGNE B. Endocrine disruptors: From endocrine to metabolic disruption **Annu. Rev. Physiol**, v. 73, p. 135–162, 2011.

CHAPIN, R. E.; DELANEY, J.; WANG, Y.; LANNING, L.; DAVIS, B.; COLLINS, B.; MINTZ, N.; WOLFE, G. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. **Toxicological Sciences**. v. 52, p. 80–91, 1999.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O Futuro Roubado**. Porto Alegre: L&PM, p. 354, 2002.

CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; ORLANDO, E. F.; GUILLETTE. L. JR. Endocrinedisrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. In: GUILLETTE, L. J. JR; CRAIN, D. A. (Eds.). **Environmental endocrine disruptors: an evolutionary perspective**. Philadelphia, PA: Taylor & Francis, Inc., p. 1-21, 2000.

DAMSTRA, TERRI; BARLOW, SUE; BERGMAN, AAKE; KAVLOCK, ROBERT; DER KRAAK, GLEN VAN; International Program on Chemical Safety; Global Assessment of the State of the science of Endocrine Disruptors , **WHO, pcs, edc, 02.2 World Health Organization**, 2002.

DE COSTER S., VAN LAREBEKE N. Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action **J. Environ. Public Health**. V. 2012, p 713-696, 2012.

DEVLIN, THOMAS M.; Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 6th Edition, **Wilwy-Liss publication**, 2006.

DUART A.C.G.O et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas v. 19 n 3, p. 341-348, 2006.

EL-DAKDOKY, M. H.; HELAL, M. A. M. Reproductive toxicity of male mice after exposure to nonylphenol. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 79: 188–191, 2007.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n.2, p. 218-224, 2004.

FELIX GRÜN, BRUCE BLUMBERG. Endocrine disrupters as obesogens. **Mol Cell Endocrinol**, 2009.

FERRARA, F.; ADEMOLLO, N.; ORRÙ, M. A.; SILVESTRONI, L.; FUNARI, E. Alkylphenols in adipose tissues of Italian population. **Chemosphere**, v. 82, p. 1044–1049, 2011.

FLIER JS, COOK KS, USHER P, SPIEGELMAN BM. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. **Science**, v.237, p.405, 1987.

GAO Q, LIU S, GUO F, LIU S, YU X, HU H, SUN X, HAO L, ZHU T. Nonylphenol affects myocardial contractility and L-type Ca (2+) channel currents in a non-monotonic manner via G protein-coupled receptor 30. **Toxicology**, v.6, n. 9, p. 334:122, 2015.

GHISELLI, GISLAINE; JARDIM, WILSON F.; Interferentes Endócrinos no Ambiente, **Quim. Nova**, v.30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GORE, A. C. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, p. 358–374, 2008.

GREEN, T.; SWAIN, C.; VAN MILLER, J. P.; JOINER, R. L. Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.38, p. 43–51, 2003.

GREGORASZCZUK, E. L.; KOVACEVIC, R. The impact of endocrine disruptors on endocrine targets. **International Journal of Endocrinology**, 2013.

GROSHART C., OKKERMAN P.C. Towards the Establishment of a Priority List of Substances for Further Evaluation of Their Role in Endocrine Disruption—Preparation of a Candidate List of Substances as a Basis for Priority Setting. BKH Consulting Engineers for **European Commission Directorate-General for the Environment; Delft, the Netherlands** p. 1–29, 2000.

GRÜN F, WATANABE H, ZAMANIAN Z, MAEDA L, ARIMA K et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Mol Endocrinol**, v. 20, p. 2141-2155, 2006.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8^a ed. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies, National Academy of Sciences, 2011.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier, p.1128, 2006.

GYLLENHAMMAR, I.; GLYNN, A.; DARNERUD, P. O.; LIGNELL, S.; VAN DELFT, R.; AUNE, M. 4-Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. **Environment International**, v. 43, p. 21– 28, 2012.

HAGIWARA MK. Leptospirose canina. **Vet News**, v.11, p.7-8, 2004.

HAN, X. D.; TU, Z. G.; GONG, Y.; SHEN, S. N.; WANG, X. Y.; KANG, L. N.; HOU, Y. Y.; CHEN, J. X. The toxic effects of nnylphenol on the reproductive system of male rats. **Reproductive Toxicology**. v. 19, p. 215–221, 2004.

HAO, C.-j *et al.* The endocrine disruptor 4-nonylphenol promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 382, 2012.

HECTORS TLM, VANPARYS C, VAN DER VEN K, MARTENS GA, JORENS PG et al. Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of mechanisms that can disrupt beta cell function. **Diabetology**, v.54: p.1273-1290, 2011.

HSIEH, MH; BREYER, BN; EISENBERG, ML; BASKIN, LS.; Associations among Hypospadias, Cryptorchidism, Anogenital Distance, and Endocrine Disruption, **Curr. Urol. Rep**, v. 9, n. 2, p. 137-42, 2008.

HURST CH, WAXMAN DJ. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate. **Toxicol Sci**, v. 74, n. 2, p. 297-308, 2003.

IAVICOLI I., FONTANA L., BERGAMASCHI A. The effects of metals as endocrine disruptors **J. Toxicol. Environ. Health B.** v. 12, p. 206–223, 2009.

IBRAHIM MM1, FJÆRE E, LOCK EJ, FRØYLAND L, JESSEN N, LUND S, VIDAL H, RUZZIN J. Metabolic impacts of high dietary exposure to persistent organic pollutants in mice. **Toxicol Lett**, v. 23, n.1, p. 8-15, 2012.

JACOB M. KNEEMAN, JOSEPH MISDRAJI, KATHLEEN E. COREY. Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease. **Therap Adv Gastroenterol**, v. 5. N. 3, p. 199–207, 2012.

JUBENDRADASS, R.; D'CRUZ, S. C.; MATHUR, P. P. Long-term exposure to nonylphenol affects insulin signaling in the liver of adult male rats. **Human & experimental toxicology**, v. 31, n. 9, p. 868, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004.

KNEZ, J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 26, p. 440–448, 2013.

KELLY T, YANG W, CHEN CS, REYNOLDS K, HE J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes (Lond)**, v.32, p.1431–1437, 2008.

KORKMAZ A, AYDOĞAN M, KOLANKAYA D, BARLAS N. Vitamin C co administration augments bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol induced oxidative damage on kidney of rats. **Environ Toxicol**, v.26, n. 4, p. 325-37, 2011.

KORTENKAMP, A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. **Environmental Health Perspectives**. v.115 (supl.1): n.98, p. 105, 2007.

KOUROUMAA ANSOUMANE, HADY KEITAB, PENG DUANC, CHAO QUANA, KOIKOI KEBE BILIVOGUIC, SUQIN QIA, NDJIEMBI ADJONGA CHRISTIANED, AIDOGIE OSAMUYIMEND, KEDI YANGA. Effects of 4-nonylphenol on oxidant/antioxidant balance system inducing hepatic steatosis in male rat. **Toxicology Reports**. Available online 19 October 2015.

LAFONTAN M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p.119-46, 2005.

LAWS, Susan C. et al. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. **Toxicological Sciences**, v. 54, n. 1, p. 154, 2000.

LEE DH, LEE IK, SONG K, STEFFES M, TOSCANO W, BAKER BA, ET AL. A strong dose response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002. **Diabetes Care**, v. 29, n. 1638, p. 44, 2006.

LEE MJ 1, WU Y, FRIED SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 2010.

LOPEZ-ESPINOSA, M. J.; FREIRE, C.; ARREBOLA, J. P.; NAVEA, N.; TAOUFIKI, J.; FERNANDEZ, M. F., BALLESTEROS, O.; PRADA, R; OLEA, N. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. **Chemosphere**, v. 76, p. 847–852, 2009.

LOZANO, J.A. et al.; Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud. 2ª Edição, Madrid: **McGraw Hill – Interamericana de España**, S.A.U, 2000.

LU, Y.; CHEN, M.; SUNG, F.; WANG, P. S.; MAO, I. Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. **Environment International**. v. 33, p. 903 – 910, 2007.

MARTIN DW, MAYES PA, RODWELL YW. HARPER'S. Review of Biochemistry. Califórnia: **Lange Medical**; p. 688, 1981.

MDEP. MAINE DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL PROTECTION (2010). **Basis statement for chapter 883, designation of the chemical class nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as a priority chemical and safer chemicals program support document for the designation as a priority chemical of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates**. Disponível em: http://www.maine.gov/dep/oc/safechem/nonylphenol%20_support_document_final.pdf, v. 138, p. 228–236. 2004. Acesso em: 15 de outubro de 2015.

MILLER O, GONÇALVES RR. Laboratório para o clínico. 8. ed. São Paulo: **Editora Arheneu**; p. 607, 1999.

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos, CONCEA 2013.

MOCARELLI, P. et al.; Paternal Concentrations of Dioxin and Sex Ratio of Offspring, **Lancet**, v. 355, p. 1858-63, 2000.

MOCARELLI, PAOLO et al.; Dioxin Exposure, from Infancy through Puberty, Produces Endocrine Disruption and Affects Human Semen Quality, **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 1, 2008.

MONTGOMERY, REX; CONWAY, THOMAS W.; SPECTOR, ARTHUR A.; **Biochemistry: A Case Oriented Approach, 5th Edition**, C.V. Mosby Company, 1990.

MORAES, N. V.; GRANDO, M. D.; VALERIO, D. A. R.; OLIVEIRA, D. P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2008.

NAGAO, T.; WADA, K.; MARUMO, H.; YOSHIMURA, S.; ONO, H. Reproductive effects of nonilfenol in rats after gavage administration: a two-generation study. **Reproductive Toxicology**. v.15, p. 293–315, 2001.

NASSIF, MELISSA ET AL.; Estrógeno versus Isquemia Cerebral: Hormônio Feminino como Agente Neuroprotector, **informa**, v. 17, n. 3/4, p. 57-60, 2005.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M.; **Lehninger Principles of Biochemistry**, W. H. Freeman; 4th Edition, 2004.

NEWBOLD RR. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. **Hormones (Athens)**, 2010.

NING G, BI Y, WANG T, XU M, XU Y, HUANG Y, ET AL. Relationship of urinary bisphenol A concentration to risk for prevalent type 2 diabetes in Chinese adults: a cross-sectional analysis. **Ann Intern Med**, v. 155, n. 368, p. 74, 2011.

NOGUEIRA, J.M.F.; Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos, **Projecto PDCTMP/MAR/15283/1999**.

NOVELLI M, PIAGGI S, DE TATA V. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin- induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. **Toxicol Lett**, v. 14, p. 156:307, 2005.

NUSSEY, S.S.; Whitehead S.A. Endocrinology, an Integrated Approach, **BIOS Scientific Publishers, Ltd.**, 2001.

OHEA T., WATANABEB T. & WAKABAYASHIC K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**. v. 567, p. 109–149, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; GERALDINO, B. R.; GRISOLIA, C. K.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, p. 1185 – 1190, 2005.

ONEYEOL Y, HYE L K, JONG-IL W, YOUNG R S. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis **J Cancer Prev**. v. 20, n. 1, p. 12–24, 2015.

ORLICKY, D. J. et al. Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties. **Alcohol Clin Exp Res**, v.6, p. 1020-33, 2011.

PALERMO, Francesco Alessandro *et al.* Cortisol response to waterborne 4-nonylphenol exposure leads to increased brain POMC and HSP70 mRNA expressions and reduced total antioxidant capacity in juvenile sole (*Solea solea*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 156, n. 3, p. 135, 2012.

PER-ERIK, OLSSON; BERTIL, BORG; BRUNSTRÖM, BJÖRN; HAKANSSON, HELEN; KLASSONWEHLER, EVA; Endocrine Disrupting Substances – Impairment of

Reproduction and Development, **Swedish Environmental Protection Agency**, Stockholm, Sweden, 1998.

PENG X.Z., YU Y.J., TANG C.M., TAN J.H., HUANG Q.X., WANG Z.D. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **Sci. Total Environ**, v. 397, p.158–166, 2008.

PETERSEN G., RASMUSSEN D., GUSTAVSON K. Study on Enhancing the Endocrine Disrupter Priority List with a Focus on Low Production Volume Chemical **DHI water & environment for European Commission Directorate-General for the Environment; Hørsholm, Denmark**, p. 1–249, 2007.

PETRO, E. M. L.; LEROYA, J. L. M. R.; VAN CRUCHTENB, S. J. M.; COVACIC, A.; JORSSENA, E. P. A.; BOLS, P. E. J. Endocrine disruptors and female fertility: focus on (bovine) ovarian follicular physiology **Theriogenology**. v. 78, n. 9, p. 1887–1900, 2012.

QUEIRÓS, J.; MAGALHÃES, A.; MEDINA, J.L. Disruptores endócrinos: sinais do tempo. **Rev. Port. Endocrin. Diab. e Metabol**, n.1, p.31-36, 2006.

RAECKER, T.; THIELE, B.; BOEHME, R. M.; GUENTHER, K. Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. **Chemosphere**, v. 82, p. 1533–1540, 2011.

RANG HP, DALE MM. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**; 2011.

RAZIA, S.; MAEGAWA, Y.; TAMOTSU, S.; OISHI, T. Histological changes in immune and endocrine organs of quail embryos: Exposure to estrogen and nonylphenol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 364-371, 2006.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

RIVERO, C. L. G.; BARBOSA. A. C.; FERREIRA, M. F. N.; DOREA, J. G; GRISOLIA, C. K. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). **Ecotoxicology**. v.17, p. 732 – 737, 2008.

ROGERS J.A., METZ L., YONG V.W. Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms **Mol. Immunol**, v. 53, p. 421–430, 2013.

RUDEL, R. A.; PEROVICH, L. J. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 170–181, 2009.

RUZZIN J, PETERSEN R, MEUGNIER E, MADSEN L, LOCK EJ, LILLEFOSSE H, ET AL. Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. **Environ Health Perspect**, v.118, n. 465, p. 71, 2010.

SHAO, B.; HU, J.; YANG, M.; AN, W.; TAO, S. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, p. 467–473, 2005.

SHARPE RM, IRVINE DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health **BMJ**, v. 328, p. 447–51, 2004.

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J. N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**. v. 34, p. 1033–1049, 2008.

SODRÉ, FERNANDO F.; LOCATELLI, MARCO A.F.; MONTAGNER, CASSIANA C., JARDIM WILSON F.; Origem e Destino de Interferentes Endócrinos em Águas Naturais, **caderno temático**, v. 6, 2007.

SONE, K.; HINAGO, M.; KITAYAMA, A.; MOROKUMA, J.; UENO, N.; WATANABE, H.; IGUCHI, T. Effects of 17 β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. **General and Comparative Endocrinology** v. 138, p. 228–236, 2004.

SOTO, A. M.; JUSTICIA, H.; WRAY, J. W.; SONNENSCHNEIN, C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. **Environmental Health Perspectives**, v. 92, p. 167-173, 1991.

SPADOTO, Mariângela. Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos de água doce. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2013.

SUN Q, CORNELIS MC, TOWNSEND MK, TOBIAS DK, ELIASSEN AH, FRANKE AA, ET AL. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses Health Study (NHS) and NHSII cohorts. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 616, p.23, 2014.

TAGAKI, H.; SHIBUTANI, M.; MASUTOMI, N.; UNEYAMA, C.; TAKAHASHI, N.; MITSUMORI, K.; HIROSE, M. Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. **Archives of Toxicology**, v. 78, p. 97-105, 2004.

TSUDA, T.; TAKINO, A.; KOJIMA, M.; HARADA, K.; MURAKI, T.; TSUJI, M. 4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into lake Biwa. **Chemosphere**, v. 41, p. 757–762, 2000.

VELD M. G. R.; ZAWADZKA, E.; RIETJENS, I. M. C. M.; MURK, A. J. Estrogenicity of food-associated estrogenic compounds in the fetuses of female transgenic mice upon oral and IP maternal exposure. **Reproductive Toxicology**. v. 27, p. 133–139, 2009.

WAJCHENBERG BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Rev**; v. 21, n.6, p. 697-738, 2000.

WANG Y, HU H, ZHAO M, ZHAO J, YIN D, SUN X, LIU S, GAO Q, YU L, HAO L. Nonylphenol disrupts the cardio-protective effects of 17 β -estradiol on ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of guinea pig. **J Toxicol Sci**; v. 38, n. 5, p. 731-40, 2013.

WATANABE, H. et al. Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. **Journal of molecular endocrinology**, v. 33, n. 1, p. 243, 2004.

WHITE, R.; JOBLING, S.; HOARE, S. A.; SUMPTER, J. P.; PARKER, M. G. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. **Endocrinology**, v. 135, n. 1, p. 175-182, 1994.

WILSON, N. K.; CHUANG, J. C.; LYU, C. Levels of persistent organic pollutants in several child day care centers. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v. 11, n. 6, p. 449-458, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO) Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. **World Health Organization; Geneva, Switzerland**, v.1, p. 3, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 1, p. 253, 2000.

WORMLEY D.D., RAMESH A., HOOD D.B. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity and behaviour **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 197, p. 49–65, 2004.

YEN CH, LIN KC, LEU S, SUN CK, CHANG LT, CHAI HT, CHUNG SY, CHANG HW, KO SF, CHEN YT, YIP HK. Chronic exposure to environmental contaminant nonylphenol exacerbates adenine-induced chronic renal insufficiency: role of signaling pathways and therapeutic impact of rosuvastatin. **Eur J Pharm Sci**. v. 15, n.5, p. 455-67, 2012.

YEN CH, SUN CK, LEU S, WALLACE CG, LIN YC, CHANG LT, CHEN YL, TSA TH, KAO YH, SHAO PL, HSIEH CY, CHEN YT, YIP HK. Continuing exposure to low-dose nonylphenol aggravates adenine-induced chronic renal dysfunction and role of rosuvastatin therapy. **J Transl Med**, v. 19, n. 10, p. 147, 2012.


YING G.G. Endocrine Disrupting Chemicals. What? Where? In: Nollet L.M.L., editor. Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food **Wiley-Blackwell**; Oxford, UK: p. 3–17, 2011.

YOUNGLAI, EDWARD V.; HOLLOWAY, ALISON C.; FOSTER, WARREN G.; Environmental and Occupational Factors affecting Fertility and IVF Success, **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 1, p. 43–57, 2005.

ZHANG, H. Y. ET AL. Perinatal exposure to 4-nonylphenol affects adipogenesis in first and second generation rats offspring. **Toxicol. Lett**. v. 225, n. 2, p. 325-32, 2014.


ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL, UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA




Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de outubro de 2014.




DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS SWISS.", UnBDoC n.º 118470/2014, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO B

Histologia

Preparo de lâminas histológicas

Fixação de tecidos

Fragmentos de tecido adiposo branco visceral (epididimal), tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) e tecido adiposo marrom (interscapular) coletados foram imediatamente armazenados em tubos contendo solução fixadora (paraformaldeído 4% v/v em PBS, recém-preparada) até o seu processamento.

Fragmentos de fígado foram mantidos no paraformaldeído 4% por 24 horas e então foram transferidos para outra solução fixadora, Bouin (75 mL de ácido pícrico, 25 mL de formol, 5 mL de ácido acético) por 4 h, lavados várias vezes em solução de álcool etílico 50% (v/v) e depois conservados em álcool etílico 70% (v/v) até o seu processamento.

Desidratação e inclusão em parafina

Este processo de inclusão do tecido na parafina foi realizado manualmente, como descrito a seguir. Para a realização do processo inclusão, fragmentos de fígado mantidos no álcool etílico 70% foram transferidos para cassetes tradicionais de histologia. Inicialmente os cortes de tecidos conservados foram submetidos a desidratação em álcoois em concentrações progressivas 1 hora em cada álcool (álcool 70% - v/v, álcool 80%-v/v, álcool 90% -v/v e álcool absoluto [2 banhos]). Os fragmentos de tecido adiposo foram transferidos para cassetes tradicionais de histologia e antes do banho no álcool 70% (v/v) passaram por banhos de 1 hora em álcoois de 30% (v/v) e 50% (v/v) respectivamente.

Após a desidratação os tecidos passam pela diafanização por imersão em solução de álcool absoluto e tolueno (v/v) por 1 hora, seguido por dois banhos de 1 hora em tolueno absoluto, um banho de 30 minutos em tolueno e parafina a 60°C (v/v) e por último, foram feitos 3 banhos por uma hora em parafina (Paraplast, Leica Biosystems, Alemanha) fundida na estufa (60 °C). Após os 3 banhos de parafina, os cortes de tecidos foram fixados na parafina em posição vertical e no fundo da forma, com o auxílio de uma pinça pré-aquecida.

O material parafinado foi mantido em temperatura ambiente até a realização de cortes de tecido no micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha).

ANEXO C

Coloração com hematoxilina-eosina

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. Para a realização desta etapa, elas foram imersas em xilol (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico absoluto (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico 95% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico 80% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico 70% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico 50% (1 banho por 2 minutos), lavadas em água corrente por 3 minutos, lavadas em água destilada e imersas em solução de hematoxilina de Harris por 2 minutos as amostras de fígado e 5 minutos as de tecido adiposo (5 mg hematoxilina, 50 mL de álcool absoluto, 100 mg de alúmen de potássio, 2, 5 g de óxido vermelho de mercúrio, 1000 mL de água destilada). Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente até tirar o excesso de hematoxilina, mergulhadas em água destilada, imersas rapidamente em álcool ácido (ácido clorídrico 1% em álcool 70%) e novamente lavadas em água destilada.

Para imersão em eosina, as lâminas foram inicialmente imersas em solução Scott, lavadas em água corrente, lavadas em água destilada, retirou-se o excesso de água destilada e então as lâminas foram imersas em eosina alcoólica 1% por 1 minuto. Em seguida as lâminas foram imersas em álcool etílico 95%-v/v (3 banhos sendo 1 minuto cada), álcool etílico absoluto (6 banhos de 1 minuto cada). Para finalização do processo de coloração, as lâminas foram imersas em xilol (3 banhos de 1 minuto cada). No tecido adiposo, a eosina utilizada é a eosina aquosa 1% com 0,05 mg de ácido fosfotúngstico (banho de 5 minutos), lava as lâminas com água destilada, coloca-as para secar em temperatura ambiente e já é feita a montagem das lâminas.

Para a montagem das lâminas, após estarem secas as lâminas, usou-se meio sintético Entellan (Entellan new, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e lamínula para finalização da mesma e posterior análise microscópica.

As imagens dos cortes de tecidos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz (Axio imager A1, Zeiss Inc., Jena, Alemanha) com aumento de 10 vezes.