

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

BÁRBARA MENDES RODRIGUES

**EXPOSIÇÃO COMBINADA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS:
EFEITOS DO BISFENOL A EM CAMUDONGOS SENSITIZADOS POR 4-
NONILFENOL NA FASE PERINATAL**

BRASÍLIA-

DF 2016

BÁRBARA MENDES RODRIGUES

**EXPOSIÇÃO COMBINADA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS:
EFEITOS DO BISFENOL A EM CAMUNDONGOS SENSITIZADOS POR 4-
NONILFENOL NA FASE PERINATAL**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal como parte dos
requisitos necessários para
obtenção do título de mestre.**

Orientadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

BRASÍLIA-DF

2016.

Dissertação de Mestrado
BÁRBARA MENDES RODRIGUES

**EXPOSIÇÃO COMBINADA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS:
EFEITOS DO BISFENOL A EM CAMUNDONGOS SENSITIZADOS POR 4-
NONILFENOL NA FASE PERINATAL**

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos
Presidente/Orientador
UnB

Prof. Dr. José Garrofe Dórea
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
Faculdade de Ciências da Saúde - UnB

Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
Instituto de Ciências Biológicas - UnB

Brasília, 22 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar e me dar capacidade de alcançar meus objetivos.

Agradeço a minha família pelo apoio dispensado, em especial ao meu pai, pelo exemplo de determinação e garra. Aos meus avós maternos Francisca e Agostinho e minha tia Raimunda, porque sempre estiveram ao meu lado me ajudando e me apoiando incondicionalmente.

À professora Maria de Fátima Menezes Almeida Santos, pela oportunidade, orientação e incentivo e por acreditar no meu trabalho, e principalmente pela paciência nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Prof^a Silene, pela excelente contribuição, apoio e pelos conselhos nos momentos difíceis e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos estagiários Fernando Magela e Tayane Schimicoscki pela ajuda nos experimentos.

Ao amigo e parceiro, Mateus C. Gianizeli pelo incentivo, amizade e apoio.

À bióloga Sarah Py, bioterista pelos ensinamentos no trato com os animais, pelo carinho e amizade ao longo da minha jornada.

**Ao Sabin Laboratório Clínico pelo auxílio das análises bioquímicas,
À Dra Ana Paula Bastos, pela contribuição nas análises de imuno-histoquímica.**

**Aos professores Dra. Izabel Silva e Dr. João Paulo Longo pela
contribuição nas análises estatísticas, pelo apoio e disponibilidade.**

**Ao amigo Prof. Dr. César Romero pelos ensinamentos com os animais,
pelo apoio logístico e principalmente pelo carinho e amizade.**

**Aos colegas do laboratório Karen Py-Daniel, Janaína, Paolin Cáceres,
Nayara, Fred, Mayara, Mosar, Ana Lygia, Sebastian, Djalma, Laise,
Raphael Bonadio, Gisele Lorranna, Márcia Cristina e Rachel Arcanjo por
fazerem do laboratório um ótimo ambiente de trabalho, pela convivência
amigável e pelos ensinamentos.**

**A Sra. Zélia pelo apoio logístico nas compras de materiais e suprimento
necessários ao projeto, por sempre estar disponível e ajudar no que for
necessário.**

**À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação Biologia
Animal pela oportunidade.**

A todos que de alguma forma contribuíram com este estudo.

**À minha filha Ana Clara, motivo da minha força
e determinação em alcançar meus sonhos.**

Desreguladores endócrinos são substâncias capazes de interferir na síntese, na secreção e no metabolismo de hormônios. Dentre elas destacam-se o 4-Nonilfenol (NP) e o Bisfenol A (BFA) conhecidos por ligarem-se aos receptores de estrógenos e assim interferir nas suas ações. Por isso, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do BFA em camundongos sensibilizados por NP durante a fase perinatal. Para tal, camundongas Balb/C receberam diariamente, durante a gravidez e a lactação, água, óleo de milho ou NP (50 mg/Kg). A prole das fêmeas que receberam água ou óleo de milho, após o

desmame até aos 59^o dia de vida, recebeu o mesmo que as mães, constituindo os grupo Água/Água e Óleo/Óleo, respectivamente. Já a prole das fêmeas que receberam NP passou a receber, água, óleo de milho ou BFA (25µg/kg) constituindo, respectivamente, os grupos NP/Água, NP/Óleo e NP/BFA. O NP e o BFA foram solubilizados em óleo de milho. Inicialmente avaliou-se se a exposição ao NP durante a gestação afetava a relação macho/fêmea entre os nascidos. Depois se avaliou a possível toxicidade do BFA nos animais sensibilizados por NP dosando-se os níveis séricos de Fosfatase alcalina, Gama glutamiltransferase, Aspartato aminotransferase, Alanina aminotransferase, creatinina, ureia e progesterona, além de ter-se analisado a morfologia do fígado, rins e baço. Já o efeito do BFA nos tecidos mamário e endometrial foi avaliado por meio de análises morfológicas e determinação do nível do antígeno nuclear de proliferação celular. A exposição ao NP durante a fase perinatal não afetou a relação machos/fêmea entre os nascidos. Não foram observadas alterações morfológicas no fígado e no baço dos animais da geração F1, porém foram observadas pequenas gotas hialinas no citoplasma de células de túbulos contorcidos de animais do grupo NP/BFA. Em todos os

grupos os níveis de enzimas hepáticas, ureia e creatinina estavam dentro dos valores de referência. As fêmeas do grupo NP/BFA apresentaram atrofia dos ductos galactóforos e excesso de tecido adiposo nas glândulas mamárias, além de espessamento do endométrio, embora a proliferação celular não tenha aumentado. Os resultados deste estudo sugerem que a exposição crônica a baixas doses de BPA afeta a estrutura das glândulas mamárias e do endométrio na idade adulta jovem.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos, 4-Nonilfenol; Bisfenol A; toxicidade; glândula mamária; endométrio.

Endocrine disruptors are substances capable of affecting the reproductive systems, the secretion and the hormones metabolism through the effects on the synthesis. Among these disruptors, it can be highlighted the 4-Nonylphenol (NP) and the bisphenol A (BFA), they are known for binding to the estrogen receptors and for interfering on these hormones synthesis and also on the progesterone synthesis. Since the estrogen and the progesterone are involved on the cell proliferation on the mammary gland and endometrium tissues, this research aimed to evaluate the effects of the exposure to low doses of 4-nonyphenol and Bisphenol A in breast and endometrial tissue of mice. For such, Balb/C female mice received daily, by gavage, during pregnancy and lactation, NP solubilized in corn oil at a concentration of 50 mg/Kg or else corn oil or water. The offspring of females that received water or corn oil, after weaning, started receiving the same as their mothers, constituting the Water/Water and Oil/Oil group, respectively. The offspring of females that received NP, after weaning, started to receive water, corn oil or Bisphenol A solubilized in corn oil at a concentration of 25mcg/Kg, thus constituting, respectively, the NP/Water, NP/Oil and NP/BFA groups. Initially, it was evaluated whether the exposure to Nonyphenol affected the fertility rate and the male/female ratio among newborns. Thereafter, it was evaluated in the offspring the possible toxicity of NP and BFA dosing to the serum levels of the enzymes alkaline phosphatase, gamma glutamyltransferase (γ GT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and creatinine levels, urea, and hormones involved in reproduction regulation. The determination of toxicity also involves morphological examination of organs such as liver, kidney and spleen. The effect of exposure to Nonylphenol and to Bisphenol A in breast and endometrial tissues was evaluated by morphological

analysis and determination of nuclear antigen expression level of cellular proliferation (PCNA) in these tissues. Exposure to NP during pregnancy did not affected litter size or the male/female ratio of the offspring. Morphological changes weren't observed in the liver nor in the spleen of F1 generation of animals, but were observed hyaline droplets in the cytoplasm of distal convoluted tubule cells of the NP/BFA group. The Oil/Oil, NP/Oil and NP/BFA groups showed serum FAL lower than the Water/Water group while the Oil/Oil group had a higher serum level of GT than the other groups. The NP/Water group showed increased levels of SGOT and the NP//BFA group increased the TGP. In all groups whose mothers received 4-nonylphenol, the urea levels were lower than in the Water/Water group, but still within the reference values. The NP/Water group showed higher progesterone level than the other groups; while the Oil/Oil, NP/Oil and NP/BFA groups showed lower levels compared to the Water/Water group. The NP/BFA group females showed atrophy of duct mammary and excess of adipose tissue, and endometrium spacing, although cell proliferation was not enhanced. The results of this research suggest that exposure to BPA, when administered chronically, alter the reproductive cycle of the female during young adulthood.

Figura 1.	Representação esquemática da biossíntese de estrógenos a partir do colesterol por uma sequencia de reações enzimáticas dentro do folículo ovariano em desenvolvimento. A enzima aromatase citocromo P450 é responsável pela conversão da testosterona em estradiol (adaptado de Osterlund & Hurd, 2001)	3
Figura 2.	Representação esquemática dos domínios funcionais dos receptores de estrógenos (RE e RE) O domínio N-terminal (A/B), domínio de ligação ao DNA (C), domínio de ligação ao hormônio (E) e o domínio C-terminal (F) (adaptado de Osterlund & Hurd, 2001).....	5
Figura 3.	(A) Competição entre o Nonilfenol e o 17 - estradiol para a ligação ao receptor de estrogênio em uma célula. (B) Representação esquemática das estruturas químicas do hormônio 17 - estradiol e do Nonilfenol (Adaptado de Warhurst, 1995).....	8
Figura 4.	Representação esquemática da estrutura química do hormônio 17 - estradiol e da molécula de Bisfenol A (Steinmetz et alli, 1997).....	11
Figura 5.	Grupos experimentais utilizados para avaliar os efeitos da exposição a baixas doses de 4-nonifenol, durante a vida perinatal e a lactação, e ao Bisfenol A após o desmame, efeitos biológicos na geração F1.*Geração F1: camundongos filhos das dez fêmeas que receberam tratamento durante a gestação e a lactação.....	18

- Figura 6. Porcentagem relativa de filhos nascidos de fêmeas que receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a prenhez.)..... 25**
- Figura 7. Proporção de machos e fêmeas entre a prole de fêmeas que receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4- Nonilfenol durante a prenhez 26**
- Figura 8. Peso médio em gramas, dos animais cujas mães receberam, por gavagem, água, óleo de molho ou 4-Nonilfenol aos 21 dias, fim do desmame. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p < 0,05$ 27**
- Figura 9. Peso médio de camundongo Balb/c- cujas mães receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, água, óleo de milho ou Bisfenol A. 42 dias – fim da puberdade; 60 dias - início da maturidade sexual (60 dias) . Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo controle no mesmo tempo..... 28**
- Figura 10. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de fígado de camundongo Balb/c, corados com H&E. (a) e (b) Fígado de animal cuja mãe recebeu, por gavagem, água, durante a sua gestação e enquanto o amamentava e que durante a sua puberdade recebeu, também por gavagem, água, grupo controle negativo - Água/Água. * capilar sinusóide; hepatócito binucleado circulado 29**
- Figura 11. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de baço, corados com H&E, de camundongo Balb/c, cuja mãe recebeu, por gavagem, água, durante a sua gestação e enquanto o**

amamentava e que durante a sua puberdade recebeu,
também por gavagem, água, grupo controle negativo -
Água/Água. (a) polpa branca – tecido linfoide 30

Figura 12. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de rim, corado com H&E, de camundongo Balb/c- cujas mães receberam, por gavagem, 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, Bisfenol A. (a-b) região cortical; (c, d) região medular. Setas- gotas hialinas no citoplasma de células de túbulos contorcidos distais 30

Figura 13. Fotomicrografia do endométrio, corado com H&E, de camundongas Balb/c cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a puberdade foram expostas, também por gavagem, a Água, ao Óleo de milho ou ao Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c) animal do grupo NP/Água; (d) animal do grupo NP/BFA, estroma rico em células com núcleos volumosos e eucromáticos. Asterisco (*) – glândulas; Ep – tecido epitelial superficial; setas apontam fina vacuolização em célula epitelial; seta larga aponta neutrófilos no lúmen do útero 34

Figura 14. Fotomicrografia de tecido mamário, corado com H&E, de camundongas Balb- cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a puberdade foram expostas, também por gavagem, a Água, ao Óleo de milho ou ao Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c, d) animal do grupo NP/BFA. Círculos – ductos glandulares; Setas apontam células achatadas na camada interna do epitélio glandular 35

Figura 15. Fotomicrografia de tecido mamário com marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) de camundongos Balb/c fêmeas cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c) animal do grupo NP/Óleo; (d) animal do grupo NP/BFA. Setas apontam células positivas (núcleos marrons) para o antígeno PCNA 36

Figura 16. Expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em tecido mamário de camundongos Balb/C fêmeas cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A..... 37

Figura 17. Fotomicrografia de tecido endometrial com marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) de camundongos Balb/c fêmeas cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c) animal do grupo NP/Água; (d) animal do grupo NP/Óleo; (e, f) animal do grupo NP/BPA. Núcleos marrons mostram células positivas para o antígeno PCNA..... 38

Figura 18. Expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no endométrio de camundongos Balb/C fêmeas cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A39

Tabela 1 Número de filhos nascidos de cada uma das mães que durante a gestação receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4-Nonilfenol	24
Tabela 2 Níveis séricos de Fosfatase alcalina, Gama glutamiltransferase, Aspartato aminotransferase, Alanina aminotransferase, Ureia, Creatinina e Progesterona em camundongas Balb/c expostos a baixas doses do 4-Nonilfenol durante o período perinatal e lactação e ao Bisfenol A durante a puberdade	33

1. Introdução.....	1
2. Justificativa.....	14
3. Objetivos.....	15
4. Material e Métodos.....	16
4.1. Modelo Animal.....	16
4.2. Grupos eperimentais e delineamento experimental.....	17
4.2.1. Adimintração de xenosestrógenos a fêmes em gestação.	17
4.2.2. Administração de xenosestrógenos a geração F1 após o desmame	17
4.3. Determinação da proporção de machos e fêmeas nascidos de mães expostas ao 4-Nonilenol durante a prenhez	19
4.4. Determinação do peso corpóreo dos animais nascidos de mães expostas ao 4 – Nonifenol durante a prenhez e expostos diretamente ao Bisfenol após o desmame	19
4.5. Coleta de sangue e de órgãos da prole de mães expostas ao 4-Nonilenol durante a prenhez.....	19
4.5.1. Ensaio bioquímico.....	20
4.5.2. Avaliação histopatológica.....	21
4.5.3. Expressão do antígeno de proliferação celular (PCNA) em células das glândulas mamárias e do endométrio.....	22
4.6. nálise estatística.....	23
5. Resultados.....	24
6. Discussão.....	40
7. Conclusões.....	50
8. Referências Bibliográficas.....	51
9 _____	63

1. INTRODUÇÃO

Desde o século passado, principalmente a partir dos anos quarenta, o desenvolvimento da indústria química tem criado e produzido, em larga escala, substâncias que têm se tornado indispensáveis ao estilo de vida moderno. Atualmente, muitas dessas substâncias, como resultado da produção e do uso maciço, podem ser encontradas em diferentes ambientes (HU et alli, 2014). Embora tragam benefícios incalculáveis, algumas delas podem interferir na síntese, na secreção e no transporte de hormônios, ou até mesmo mimetizar ou inibir a atividade de hormônios naturais no organismo (LV et alli, 2016). Por possuírem propriedades suscetíveis de desequilibrar os sistemas hormonais (PETRO et alli, 2012), essas substâncias são denominadas de desreguladores endócrinos (PETRO et alli, 2012; BIRNBAUM, 2013; MACON & FENTON, 2013). Assim, a partir de uma perspectiva fisiológica, desregulador endócrino é toda substância que mostra ação sobre o sistema endócrino, desencadeando perturbações em cada um dos aspectos controlados por esse sistema, incluindo a homeostase que é fundamental para manutenção do equilíbrio metabólico dos organismos, além de permitir ao organismo se comunicar e responder ao seu meio ambiente.

O Sistema Endócrino é constituído por um conjunto de glândulas e tecidos localizados em diferentes áreas do corpo e pelos hormônios por elas sintetizados. A ação de um determinado hormônio inicia-se por meio da sua ligação a um receptor específico presente na membrana celular ou no interior da célula alvo. Os desreguladores endócrinos que mimetizam ou inibem a atividade de hormônios naturais no organismo o fazem ligando-se ao receptor de um hormônio natural. Eles podem exercer as suas ações via receptores de neurotransmissores tais como os receptores de serotonina, dopamina e

noradrenalina, receptores de hormônios esteroides, nucleares e de membrana (THOMAS et alli, 2005), por meio de vias enzimática envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo de esteroides, e outros mecanismos que convergem sobre o sistema endócrino (DIAMANTI-KANDARAKIS et alli, 2009).

Os desreguladores endócrinos que agem via receptores de hormônios esteroides como os estrógenos induzem ou inibem ações que envolvem a fisiologia dos sistemas reprodutores, pois os estrógenos constituem um grupo de hormônios requeridos para a maturação sexual feminina; eles promovem o desenvolvimento e a diferenciação das glândulas mamárias, do útero, das tubas uterinas, da vagina e da genitália externa (CARR, 1998). Além disso, os estrógenos são responsáveis por outras características relacionadas ao fenótipo feminino, tais como a configuração de ombros estreitos e quadris largos, a distribuição de tecido adiposo na região do quadril e nas mamas, o tom de voz agudo, além da distribuição dos pelos pubianos. Nos rins, os estrógenos promovem a reabsorção de sódio. No esqueleto inibem a reabsorção óssea, consequentemente a liberação local de fatores de crescimento, e induzem a formação de tecido ósseo. No fígado, os estrógenos induzem a síntese de diversas proteínas tais como globulinas, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de alta densidade (HDL), embora reprimam a síntese de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). De acordo com O'Connell & Hofmann (2011), os estrogênios também exercem efeitos importantes sobre uma variedade de comportamentos sociais, principalmente os relacionados ao comportamento sexual. Esses hormônios também estão relacionados a comunicação e a aprendizagem (CALDWELL et alli, 2004).

O hormônio estrogênico mais potente nas fêmeas em idade reprodutiva é o 17 - estradiol, embora níveis baixos de estrona e estriol estejam presentes em mulheres não grávidas na pré-menopausa (OSTERLUND & HURD, 2001). Esses hormônios são produzidos pelos ovários e pela placenta, e em menores quantidades pelos testículos, córtex das supra-renais, cérebro, tecido adiposo, glândulas mamárias, pele, vasos sanguíneos, osso e cartilagem (SIMPSON, 2003).

Nos ovários, a síntese dos estrógenos tem início nas células da teca interna de folículos ovarianos em desenvolvimento quando essas células, a partir do colesterol, sintetizam um hormônio esteroide – androstenediona. Esse esteroide é então transferido para a camada granulosa dos folículos onde, por indução do hormônio folículo estimulante, FSH, ocorre síntese da enzima aromatase citocromo P450 que converte a androstenediona em estrona e estradiol (YARAK et alli, 2005), conforme esquema ilustrado na Figura 1.

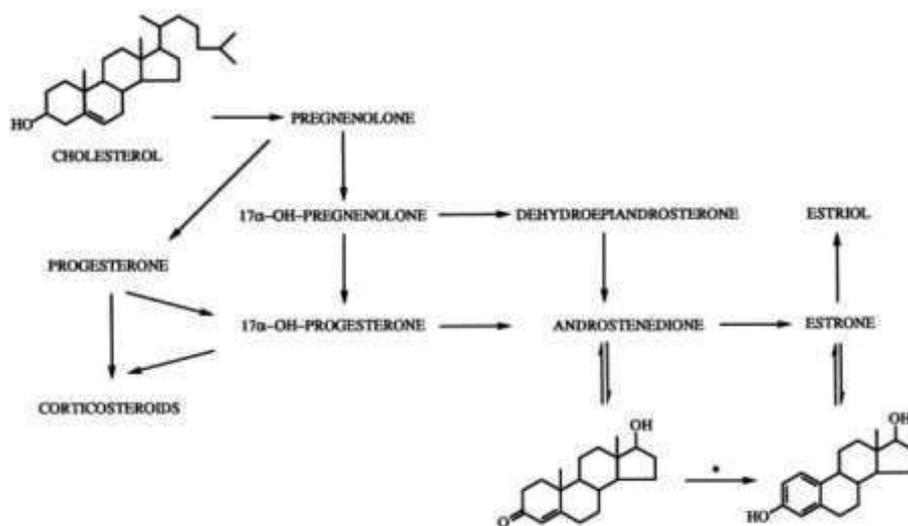


Figura 1. Representação esquemática da biossíntese de estrógenos a partir do colesterol por uma sequência de reações enzimáticas dentro do folículo ovariano em desenvolvimento. A enzima aromatase citocromo P450 é responsável pela conversão da testosterona em estradiol (adaptado de OSTERLUND & HURD, 2001).

Uma vez secretados, os estrógenos são drenados para a circulação sanguínea e transportados no plasma, quase sempre, associados a proteínas. A maioria do estradiol plasmático (68%) está ligada a proteína albumina, 38% deles estão associados à globulina ligadora de hormônios sexuais, SHBG, e 2-3% está livre. Ao serem liberados da sua proteína transportadora, os estrógenos difundem-se através das membranas plasmáticas das células alvo e uma vez no interior da célula ligam-se ao seu receptor intracelular. Em função dessa ligação com o estrógeno, o receptor sofre dimerização, recruta proteínas co-ativadoras e o complexo é transportado para o núcleo onde se liga a regiões do DNA, mais especificamente a uma região reguladora de DNA a montante de um gene, que fornece um ponto de controle para a transcrição desse gene (DAHLMAN-WRIGHT et alli, 2006). Desse modo, os receptores de estrógenos regulam a transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas entre outros ao crescimento e proliferação celular.

Os estrógenos interagem com dois receptores, ESR1 e ESR2, também conhecidos como ER e ER , respectivamente. ER e ER possuem uma estrutura funcional que consiste de seis diferentes domínios (A-B-C-D-E-F), Figura 2. O domínio amino-terminal (A/B) com função de ativação da transcrição gênica 1 (TAF-1); o domínio C, domínio de ligação ao DNA; o domínio D envolvido na dimerização do receptor; o domínio carboxi-terminal E, domínio de ligação ao hormônio responsável pela função de ativação da transcrição gênica 2 (TAF-2) e o domínio F, presente na extremidade carboxi-terminal, envolvido na modulação da ativação da transcrição gênica (OSTERLUND & HURD, 2001; SHAO & BROWN, 2003). Além dos efeitos transcricionais, os estrógenos induzem efeitos rápidos mediados pelo receptor

de estrógeno acoplado à proteína G, GPER, também conhecido como GPR30 (LAZARI et alli, 2009).

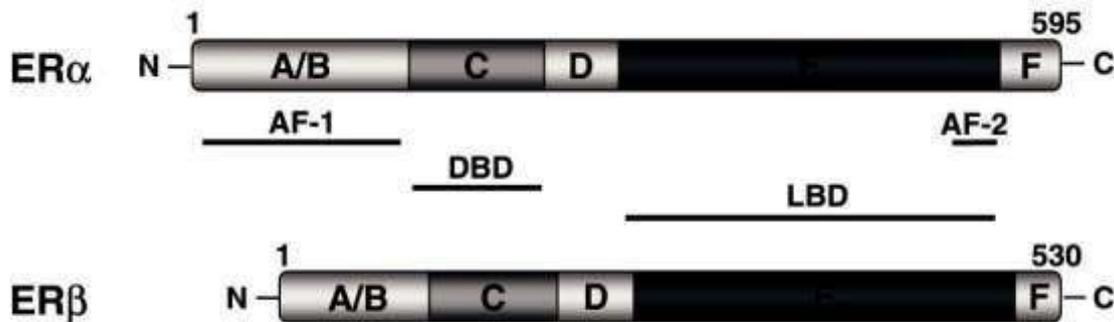


Figura 2. Representação esquemática de dois receptores de estrógeno humanos (RE e RE). Ambos os receptores consistem de seis domínios funcionais, incluindo o domínio de ligação a DNA (DBD), o domínio de ligação ao hormônio (LBD), a função de ativação independente do ligando de AF-1, e a função de ativação dependente do ligando de AF-2 (SHAO & BROWN, 2003).

Embora os receptores hormonais possuam apurada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico, eles podem ligar-se a outras substâncias, o que explica o fato de determinados desreguladores endócrinos presentes no organismo, mesmo em baixíssimas concentrações, serem capazes de gerar uma resposta, algumas vezes diferente daquela induzida pelo hormônio produzido pelo organismo. Talvez por isso, os desreguladores endócrinos que exercem as suas ações via receptores de hormônios estrogênicos desencadeiam alterações na reprodução e na ontogênese de seres vivos tais como: anormalidades no sistema reprodutor de peixes, de reptéis e de mamíferos (VETILLARD & BAILHACHE, 2006); diminuição na eclosão de ovos de peixes, de reptéis e de aves (BILA & DEZOTTI, 2007); feminização de peixes machos (KRAUGERURS et alli, 2012). Em seres humanos os desreguladores endócrinos são relacionados, globalmente, à queda no número de espermatozoides e a alterações no comportamento sexual, a depleção imunológica, a deformidades genitais, a cânceres de órgãos

dos sistemas reprodutores, feminino e masculino. Quando a exposição ocorre durante a vida perinatal, via placenta, pode resultar em mudanças duradouras não só na prole diretamente exposta, como também nas gerações subseqüentes (NEWBOLD, 2004).

Os desreguladores endócrinos estão presentes no ambiente em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} (BILA & DEZOTT, 2007) e são utilizados por populações humanas de maneira generalizada, pois são encontrados em medicamentos, alvejantes domésticos, desodorizantes de ar, perfumes, sabonetes, pastas dentífricas, higienizadores bucais, agrotóxicos, herbicidas e em plásticos existentes em mamadeiras, brinquedos infantis, alimentos e garrafas de água mineral (ZOELLER et alli, 2012). De acordo com Bila e Dezotti (2007), os desreguladores endócrinos sintéticos podem ser agrupados em três classes: (a) compostos farmacêuticos, como o dietilestilbestrol e o 17 -etinilestradiol; (b) substâncias utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; (c) substâncias utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, policlorados, compostos orgânicos de estanho, retardante de chama bromados, parabenos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ftalatos alquilfenóis, Bisfenol A, metais pesados, entre outros. Dois desreguladores endócrinos que mimetizam os estrógenos amplamente encontrados no ambiente são o 4-Nonilfenol (NP) e o Bisfenol A (BFA) que por interagirem com receptores de estrogênio podem interferir nas vias de sinalização celular desencadeadas pelos estrógenos (GAN et alli, 2015).

O NP é originado, principalmente, por meio da degradação do Nonilfenol etoxilado (KIM et alli, 2014), que é comumente utilizado na fabricação de tintas,

detergentes líquidos, cosméticos, pesticidas e outros produtos para uso industrial (ZHANG et alli, 2008; HENRIQUES et alli, 2012), além de ser utilizado como agente plastificante e antioxidante em plásticos e resinas. O NP chega a redes de tratamento de esgoto em quantidades significativas onde é biodegradado em muitos subprodutos, incluindo o Nonilfenol (SOARES et alli, 2008). Devido a suas características físico-químicas, como baixa solubilidade e alta hidrofobicidade, o NP acumula-se em determinados locais no ambiente (SOARES et alli, 2008). Ele se degrada lentamente, espalhando-se na natureza e, ao integrar aos tecidos vivos de animais, continuará a existir por décadas e décadas, pois grandes volumes desse composto se biomagnificam na cadeia alimentar, sendo as concentrações mais altas encontradas no seu topo, onde estão os seres que se alimentam de outros animais, como os humanos e outros mamíferos. A ocorrência do Nonilfenol no ambiente também tem sido claramente correlacionada com a atividade humana, como em tratamentos de esgoto (LV et alli, 2016). Além disso, o NP é usado na preparação de óleos aditivos lubrificantes, plastificantes, surfactantes e é encontrado no cloreto de polivilina (PVC), que é utilizado no processamento de alimentos e embalagens industriais.

De maneira geral, a exposição humana ao NP ocorre após o contato com água contaminada e alimentos como hortaliças, leite e carne ou durante a exposição ocupacional (CHERRY et alli, 2001; GAN et alli, 2015). A contaminação por NP por meio de alimentos deve-se principalmente a utilização de agentes de limpeza nas indústrias de processamento de alimentos, aplicação de pesticidas em vegetais e de material de embalagem de alimentos que foram contaminados por NP (GUENTHER et alli, 2002).

O efeito estrogênico do NP está relacionado ao fato de, devido à semelhança estrutural com o hormônio natural 17 -estradiol, esse desregulador endócrino competir com o hormônio natural 17 -estradiol pelos receptores ER e ER (ver Figura 3). A posição do grupamento OH fenólico e a da cadeia lateral alifática ramificada no NP parecem ser determinantes para sua atividade estrogênica (ODUM et alli, 1997; TABIRA et alli, 1999; KIM et alli, 2004), pois nem todos os isômeros de NP são capazes de induzir atividade estrogênica.

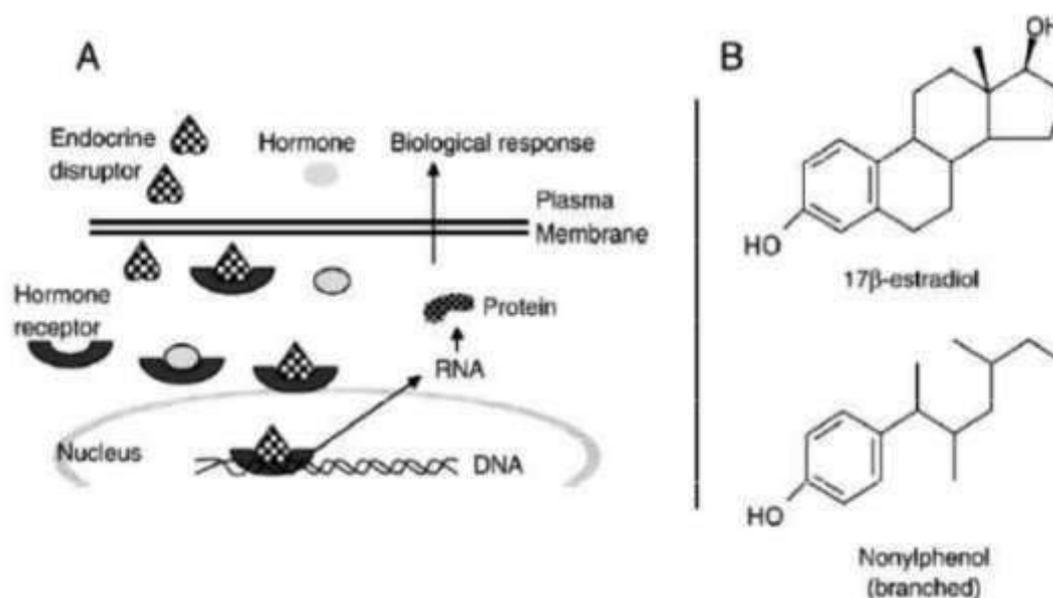


Figura 3. (A) Competição entre o Nonilfenol e o 17-estradiol para a ligação ao receptor de estrogênio em uma célula. (B) Representação esquemática das estruturas químicas do hormônio 17-estradiol e do Nonilfenol (Adaptado de WARHURST, 1994).

Essa atividade estrogênica do NP tem sido demonstrada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Em 1991, por exemplo, Soto e colaboradores mostraram que em células de tumor da mama, células MCF7, o NP liga-se a receptores de estrogênio induzindo essas células à proliferação e, segundo Amaro e colaboradores (2014), nessas células o NP induz a expressão da maioria dos genes regulados por 17-estradiol se ligando ao receptor de

estrogênio ER . O NP também desregula, *in vitro*, a atividade das células de Sertoli (HU et alli, 2014). Em ratos, o NP também pode acelerar o início da puberdade e alterar o ciclo estral de fêmeas na pré-puberdade (KIM et alli, 2002). Em 2004, Watanabe e colaboradores mostram que os efeitos do NP podem ser tecido específico, uma vez que a expressão dos genes induzidos por ele foram os mesmos induzidos pelo 17 -estradiol no útero, mas não no fígado. Em 2006, Bechi e colaboradores demonstraram que o NP age sobre o trofoblasto - camada externa do embrião que, após a sua implantação no útero, proporciona a formação da placenta - induzindo a diferenciação e apoptose de células dessa estrutura. Em tecidos dos fetos de ratas expostas ao NP durante a gravidez o NP parece reduzir a expressão de receptores de estrógenos (EL-DAKDOK & HELAL, 2007), o que explica as alterações observadas em estruturas do sistema reprodutor de indivíduos expostos ao NP ainda no útero e nas dos seus descendentes (KIMURA et alli, 2006). Além dos efeitos no sistema reprodutor, o NP também afeta o equilíbrio das citocinas na placenta humana (BECHI et alli, 2010) e promove a progressão de doenças autoimunes tais como: a doença inflamatória intestinal, em que macrófagos atacam o revestimento intestinal equivocadamente, causando inflamação crônica (KIM et alli, 2014). Vale ressaltar que, além da exposição ao NP durante a fase fetal, indivíduos podem ser expostos ao NP durante a lactação, pois o NP já foi detectado no plasma de mulheres em período de lactação (DARBRE & HARVEY, 2008; GYLLENHAMMAR et alli, 2012) e no leite materno em concentração de 32 ng/mL (ADEMOLLO et alli, 2008).

O NP também se liga aos receptores de hormônios androgênicos, hormônios esteroides críticos na expressão do fenótipo masculino Em 2003,

Lee e colaboradores demonstraram que o NP é capaz de interferir no funcionamento dos androgênios por meio da ativação de várias etapas do receptor de andrógeno e não é por concorrência direta. Em 2004, Han e colaboradores mostraram que ratos machos expostos ao NP apresentam alterações nos níveis de testosterona e em órgãos do sistema reprodutor como o epidídimo. Essas alterações no sistema reprodutor masculino também foram observadas por El-Dakdoky & Helal (2007). Esses autores demonstraram redução da massa do epidídimo e dos testículos em ratos tratados com NP, além de diminuição na contagem de espermatozoides e na motilidade dos mesmos.

Assim como o NP, o BFA, como citado anteriormente, é um desregulador endócrino capaz de se ligar a receptores de estrógenos (BRANISTE et alli, 2010; KENDZIORSKI & BELCHER, 2015). O BFA (Figura 4) é uma molécula preparada pela condensação da acetona, daí o sufixo A no final do nome. O BFA foi desenvolvido como um estrogênio sintético na década de 1890, mostrando-se capaz de estimular o sistema reprodutor feminino. Muito mais tarde, o BFA começou a ser utilizado como monômero na fabricação de policarbonato, um tipo de resina usada na produção da maioria dos plásticos. O BFA também está presente na resina epóxi, utilizada na fabricação de revestimento interno de latas que acondicionam alimentos e bebidas de modo a evitar a ferrugem e prevenir a contaminação externa. Essa molécula é também utilizada na produção de mamadeiras e selantes dentários (GEENS et alli, 2011; ROCHESTER, 2013; ACCONCIA et alli, 2015). A partir do revestimento das latas de alimentos foi detectada liberação de BFA em alimentos e constatou-se, também, que o BFA escapa dos dentes tratados com

resinas para a saliva. Além desses, os seres humanos estão expostos ao BFA por meio da inalação de poeira doméstica e por exposição cutânea. Um total de 3,8 milhões de toneladas de BFA é produzido anualmente no mundo (MICHAŁOWICZ, 2014) e uma parte do BFA, por ser amplamente empregado em produtos de uso doméstico e em indústrias de plásticos e resinas, pode ser detectada no esgoto sanitário e em ambientes aquáticos.

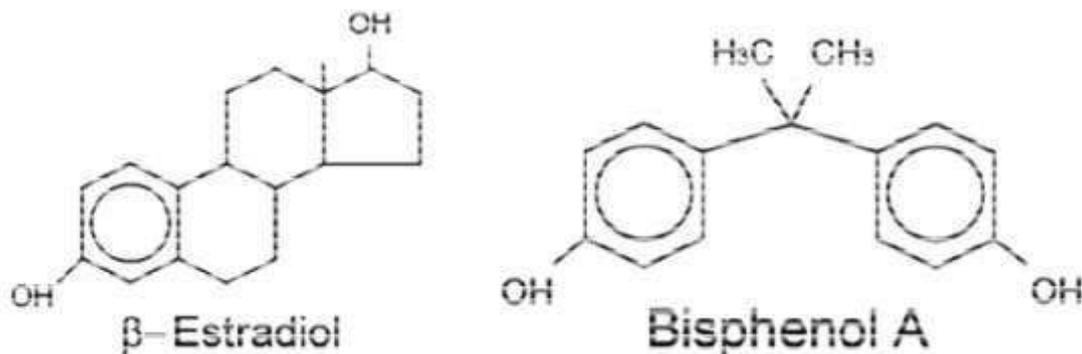


Figura 4. Representação esquemática da estrutura química do hormônio 17 - estradiol e da molécula de Bisfenol A (STEINMETZ et alli, 1997).

Diversos estudos realizados em laboratório têm mostrado que, embora o BFA tenha menor afinidade pelos RE e RE do que o 17 -estradiol, a sua potência estrogênica é semelhante às respostas mediadas pelo hormônio 17 -estradiol (VINAS et alli, 2012). O BFA mostrou-se capaz de induzir a proliferação de células MCF7 (KRISHNAN et alli, 1993) e de células LNCaP, células humanas de adenocarcinoma de próstata (WETHERILL et alli, 2002), além de estimular a produção do hormônio prolactina (STEINMETZ et alli, 1997). Camundongos expostos ao BFA ainda no útero apresentam maturação sexual precoce (HOWDESHELL et alli, 1999), além de alterações no desenvolvimento das glândulas mamárias, com aumento permanente no número de ductos e botões terminais (MARKEY et alli, 2001). Esse efeito parece estar relacionado ao fato de o BFA interferir nas interações entre o

tecido mesenquimal e o epitelial (SOTO et alli, 2013), interações essas que são necessárias para o desenvolvimento normal das glândulas mamárias. Em ratos Sprague-Dawley, o BFA em doses baixas não só altera o desenvolvimento de glândulas mamárias como também induz tumores mamários (SOTO et alli, 2013).

O BPA já foi encontrado no soro de mulheres grávidas (SCHONFELDER et alli, 2002), bem como no leite materno (YE et alli, 2006); ele pode ser transferido aos fetos e alterar o desenvolvimento embrionário. Segundo Benachour & Aris (2009), mesmo em doses muito baixas, comparável às detectadas no soro de mulheres grávidas, o BFA é tóxico para as células de placenta humana, induzindo-as a apoptose e a necrose, além de aumentar o nível do fator de necrose tumoral (TNF-). De acordo com esses autores o BFA pode afetar o crescimento do feto ou induzir a prematuridade do mesmo, ou ainda, provocar aborto em seres humanos.

Em camundongos, além de cânceres de mama, o BFA induz também câncer de próstata (KÉRI et alli, 2007), de testículos (HUFF, 2001), redução da produção diária de esperma (TOYAMA et alli, 2004) e alterações morfológicas nas células de Sertoli (FIORINI et alli, 2004). Esses efeitos mostram que o BFA também pode se ligar aos receptores de andrógenos, mimetizando ou bloqueando a ação dos hormônios androgênicos. Kéri e colaboradores (2007) sugerem que o BFA induz câncer de mama e próstata, atuando na metilação do DNA e na remodelação da cromatina durante o desenvolvimento embrionário. Essas alterações permanentes nos padrões de metilação do DNA de múltiplos genes de sinalização identificadas em próstatas expostos ao BFA

tem sido postulada como sendo a causa subjacente de desenvolvimento neoplásico mais tarde na vida (DOHERTY et alli, 2010).

O BFA também tem mostrado ser capaz de se ligar a receptores na Tireoide (MORIYAMA et alli, 2002), afetando sistemas fisiológicos diferentes do sistema reprodutor, incluindo o sistema imunológico (ROGERS et alli, 2013), o sistema nervoso (LING et alli, 2016) e o pâncreas endócrino (WHITEHEAD et alli, 2016). Inclusive em humanos, o BFA tem sido associado a maior incidência de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares (MELZER et alli, 2010), hepáticas (BINDHUMOL et alli, 2003) e diabetes (ROPERO et alli, 2008).

Vale ressaltar que a exposição à desreguladores endócrinos raramente envolva envolve um único composto, mas sim a misturas deles (VILAHUR et alli, 2014), cujos efeitos podem ser aditivos ou mesmo sinérgicos. Nesse sentido, a que se considerar como uma abordagem mais realista estudar o impacto da co-exposição à desreguladores endócrinos. Nesse sentido, considerando os dados da literatura a respeito dos efeitos isolados do NP e do BFA e que os principais estudos sobre o fenômeno da desregulação endócrina associam os efeitos adversos à exposição de um único desses desreguladores endócrinos, é plausível acreditar que a exposição combinada a baixas doses desses dois desreguladores, NP e BPA, possa fornecer dados para aumentar a compreensão dos efeitos da exposição a misturas de substâncias químicas específicas, incluindo questões como a dose e o tempo de exposição, e ainda os efeitos sinérgicos.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que xenoestrógenos podem ligar-se aos receptores de estrógenos, e que esses hormônios estão envolvidos na proliferação de células dos ductos das glândulas mamárias e do endométrio, camada mucosa do útero, e ainda, que a proliferação celular aumentada pode estar envolvida na iniciação de um tumor, este estudo se justifica pelo fato de procurar verificar os efeitos da exposição combinada a baixas doses de diferentes xenoestrógenos, do período perinatal até o início da maturidade sexual na estrutura de glândulas mamárias e do endométrio.

3. OBJETIVOS

Diante do exposto anteriormente, o objetivo geral deste estudo consistiu em verificar os efeitos do Bisfenol A na estrutura de histológica das glândulas mamárias e do endométrio, de camundongos sensibilizados ao 4-Nonilfenol durante a vida perinatal.

Para tal foram realizadas as seguintes etapas:

- (1) determinação da relação machos/fêmeas entre os nascidos da prole de fêmeas submetidas ao 4-Nonilfenol durante a prenhez;
- (2) avaliar o efeito do Bisfenol A no crescimento da prole de fêmeas submetidas ao 4-Nonilfenol durante a prenhez, por meio da determinação do peso corporal ao longo do tratamento e;
- (3) determinar a toxicidade do Bisfenol A em indivíduos nascidos de fêmeas submetidas ao 4-Nonilfenol durante a prenhez, por meio de ensaios que mediam os títulos séricos de Fosfatase alcalina, Aspartato aminotransferase, Alanina aminotransferase, Gama glutamil transferase, Creatinina e Ureia e por meio da análise morfológica em microscopia de luz do fígado, rins e baço;
- (4) avaliar o efeito do Bisfenol A na estrutura histológica das glândulas mamárias e do endométrio de indivíduos nascidos de fêmeas submetidas ao 4-Nonilfenol durante a prenhez, por meio de microscopia de luz;
- (5) avaliar o efeito do Bisfenol A sobre a proliferação de células dos tecidos mamário e endometrial de indivíduos nascidos de fêmeas submetidas ao 4-Nonilfenol durante a prenhez, por meio da determinação da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo Animal

O modelo animal utilizado neste estudo é constituído de camundongos da linhagem BALB/c (geração F1), filhos de dez fêmeas e três machos (geração parental). Os animais da geração parental foram obtidos, com idade de 34 dias e massa corporal média em torno de 20 gramas, do biotério do Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares IPEN/CNEN, São Paulo-SP.

A escolha de camundongos Balb/c como modelo animal a ser utilizado neste estudo se deve, principalmente, ao fato de que dentre todos os organismos modelos conhecidos atualmente, o camundongo é bastante prolífico, as fêmeas podem carregar muitos embriões por gestação e a possível morte de algum deles não compromete o desenvolvimento dos outros e não põe fim à gravidez. Além disso, esses animais aos 60 dias de idade tornam-se aptos a reprodução, apesar de os efeitos hormonais nos dois sexos já serem percebidos em torno de 30 dias de idade (CHORILLI et alli, 2007).

Todos os animais foram mantidos no alojamento de animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB. A acomodação se deu em fotoperíodo de igual duração de dia e noite, com temperatura controlada e livre acesso à água e à ração, conforme guia de cuidados e utilização de animais de laboratório (NAP, 2011).

Este estudo foi aprovado em 19 de agosto de 2014 pelo Comitê de Ética de Uso Animal – CEUA/UnB sob o documento UnB DoC nº 62918/2014 aprovado (em anexo).

4.2. Grupos experimentais e delineamento experimental

4.2.1 Administração de 4-Nonifenol a fêmeas em gestação

Depois de vinte e seis dias de ambientação, as fêmeas da geração parental então com 60 dias de idade foram divididas em três grupos: grupo Água - fêmeas que receberam água (n=3); grupo 4-Nonifenol - fêmeas que receberam NP solubilizado em óleo de milho (n=4); grupo Óleo de milho - fêmeas que receberam óleo de milho (n=3). No segundo dia após o início do tratamento, essas fêmeas foram colocadas em coabitação com machos da mesma idade, duas ou três fêmeas do mesmo grupo experimental com um macho na mesma gaiola durante quinze dias. Os tratamentos foram administrados até o 15^o dia após o nascimento da geração F1, data que corresponde ao desmame. Assim, as mães receberam, por via oral, por meio de gavagem, diariamente às 10h00min, durante a gravidez e a lactação, 30µl de água, de óleo de milho ou de NP (50mg/kg). A dose de NP administrada às fêmeas em gestação corresponde à metade da dose utilizada por Moon e colaboradores em 2007, quando esses autores relatam na prole os efeitos da exposição perinatal ao NP no desenvolvimento das glândulas mamárias. Os animais do grupo Água receberam 30 µl de água de modo a serem submetidos ao mesmo estresse a que foram submetidos os animais dos demais grupos.

4.2.2 Administração de Bisfenol A aos indivíduos da geração F1 após o desmame

Após o desmame, animais da geração F1 cujas mães receberam NP durante a sua gestação e enquanto os amamentavam foram separados em três subgrupos: prole que recebeu água, grupo NP/Água (n=5); prole que recebeu

óleo de milho, grupo N P/Óleo (n=6); prole que recebeu BFA s olubilizado em óleo de milho, grupo NP/BFA (n=6). A prole das mães que receberam água (n=21) e óleo de milho (n=17), após o desmame, receberam, respectivamente, água e óleo de milho.

Desse modo, a amostra deste estudo é constituída de animais da geração F1 divididos em cinco grupos experimentais conforme Figura 5.

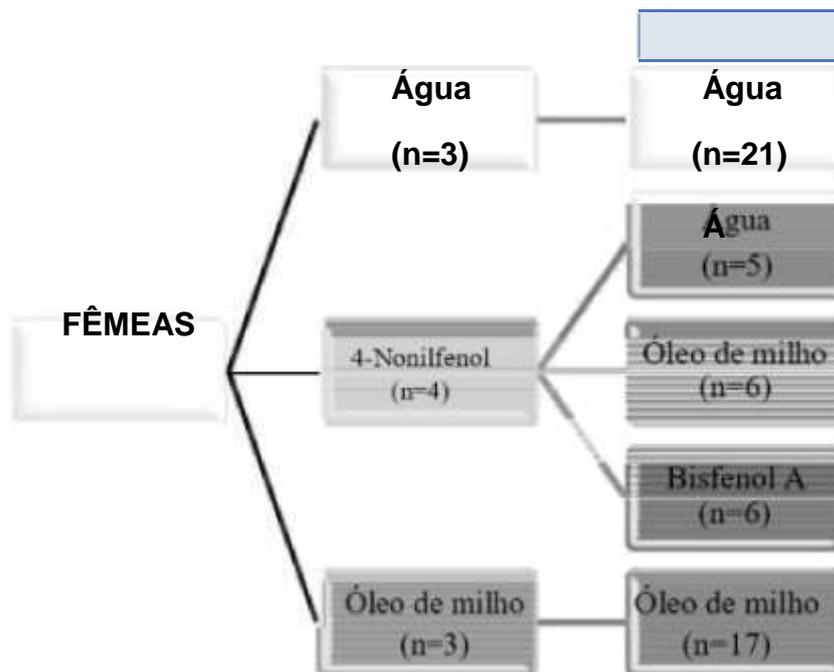


Figura 5. Grupos experimentais utilizados para avaliar os efeitos da exposição ao Bisfenol A após o desmame em camundongos Balb/c sensibilizados por 4-Nonilfenol durante a vida perinatal *Geração F1: camundongos filhos das dez fêmeas que receberam 4-Nonilfenol durante a gestação e a lactação.

Os animais da geração F1 receberam, por via oral, por meio de gavagem, diariamente às 10h00min, 30µl de água, óleo de milho ou BFA na concentração de 25µg/kg ou de óleo de milho ou de água, após o desmame. O tratamento ocorreu até 24 horas antes da eutanásia, quando os animais tinham 59 dias de vida, idade que corresponde ao início da maturidade sexual. A concentração de BFA corresponde à metade da dose referência para

camundongos definida pela Agencia de Proteção Ambiental dos EUA,

(KELLY et alli, 2014).

4.3. Determinação da proporção de machos e fêmeas nascidos de mães expostas ao 4 – Nonifenol durante a prenhez

A determinação do gênero da prole foi realizada no momento do desmame, quando os animais foram sexados, conforme descrito por Chrill e colaboradores (2007). Até esta etapa do estudo a amostra era constituída de 55 animais.

4.4. Determinação do peso corpóreo dos animais nascidos de mães expostas ao 4 – Nonifenol durante a prenhez e expostos diretamente ao Bisfenol após o desmame.

A determinação do peso da prole foi realizada no 21º dia de vida, quando os mesmos foram desmamados e nos 42º e 60º dias de vida, quando já recebiam diretamente o BFA. Nesta etapa a amostra era constituída de 55 animais, pois um dos nascidos morreu 24 horas após o nascimento.

4.5. Coleta de sangue e de órgãos da prole de mães expostas ao 4 – Nonifenol durante a prenhez

Os animais da geração F1 foram eutanasiados quando completaram 60 dias de vida, como citado anteriormente. Para tal, eles foram devidamente anestesiados com uma solução de ketamina (80 mg/kg de massa corpórea) e

xilazina (10 mg/kg de massa corpórea), por via intraperitoneal, e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca, logo em seguida as glândulas mamárias, o útero, o fígado, os rins e o baço foram coletados e preparados para a análise histopatológica.

4.5.1. Ensaio Bioquímicos

Para determinar se a exposição ao BFA induziria alterações bioquímicas nos animais sensibilizados pelo NP durante o período perinatal (geração F1) foram avaliadas por meio de ensaios que mediam os títulos séricos das enzimas Fosfatase alcalina (FAL), Gama glutamiltransferase (GT), Transaminase glutâmica oxalacética (TGO), Transaminase glutâmico pirúvica (TGP), além dos níveis de Creatinina, Ureia e Progesterona.

Para tanto, do sangue coletado de cada animal separou-se o plasma, por centrifugação a 3.000 rpm por cinco minutos, que foi armazenado a 0 °C até o momento das análises bioquímicas. Essas análises foram executadas no analisador químico automatizado ADVIA 2400 (Siemens), utilizando os reagentes químicos adequados Advia e protocolos estipulados pelo fabricante. As dosagens de FAL, GT, TGO, TGP, foram realizadas por métodos cinéticos otimizados e as de ureia, creatinina e progesterona foram determinadas por métodos colorimétricos. Todas as dosagens foram realizadas no Sabin Laboratório de Análises Clínicas e os resultados foram liberados pelo Dr. Maurício Farnese CRBM –DF 4406. Ressalta-se o fato de que dos 55 animais da amostra somente em 49 foi possível realizar todas as análises.

4.5.2. Avaliação histopatológica

Este ensaio foi realizado de modo a verificar possíveis alterações morfológicas em órgãos dos animais sensibilizados pelo NP durante o período perinatal e expostos ao BFA durante a puberdade (geração F1).

Para tal, fragmentos de glândulas mamárias, útero, fígado, rins e baço foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado, durante quatro horas, a temperatura ambiente para serem submetidos à técnica de rotina para inclusão em histosec®. Desse modo, fragmentos desses órgãos foram desidratados por meio de imersão sequencial em soluções alcoólicas, com percentual crescente de álcool, ou seja, 70%, 80%, 99,8%. Em seguida os fragmentos dos órgãos foram emersos em uma solução de álcool e xilol (1:1) durante 45 minutos, depois submetidos a três banhos de uma hora de xilol 100% e então embebidos em parafina.

Uma vez embebidos em parafina, os fragmentos dos órgãos foram seccionados em cortes histológicos semi-seriados de cinco (5) µm de espessura utilizando-se um micrótomo Leica RM2145. Os cortes foram então montados em lâminas de microscopia que foram mantidas em estufa a 37 °C durante um período mínimo de 12 horas para melhor aderência dos cortes. Em seguida os cortes foram hidratados a temperatura ambiente trocando-se a resina paraplástica por xileno, e depois o xileno por concentrações decrescentes de álcool (99,8%, 80%, 70%). Uma vez hidratadas, as secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

O padrão histológico dos tecidos foi analisado em microscópio de luz Zeiss Axioskop (100x, 200x e 400x). Micrografias ilustrativas foram obtidas pela

captura das imagens utilizando o programa AxioVison40v 4.6.1.0

Copyring© 2002-2004.

4.5.3. Expressão do antígeno de proliferação celular (PCNA) em células das glândulas mamárias e do endométrio

A quantificação do antígeno de proliferação celular (PCNA) em células de glândulas mamárias e do endométrio foi realizada de modo a determinar a taxa de proliferação celular nesses tecidos.

Para tal, cortes de glândulas mamárias e de úteros com espessura de três (3) μm , previamente fixados em paraformaldeído a 4% e emblocados em parafina foram montadas em lâminas pré-tratadas com silane. A exposição antigênica foi obtida por tratamento por 20 min em panela a vapor com “targetretrieval system” (DAKO, CARPENTERIA, CA, USA). O bloqueio de peroxidase endógena, por sua vez, foi realizado utilizando incubação em metanol (50%)/H₂O₂ (3%). Para a redução de sinais inespecíficos na reação, foi realizada incubação com leite em pó desnatado 6% em PBS (pH 7,4) por 30 minutos. A incubação com anticorpo primário foi realizada a 4 °C por 18 h, utilizando-se o anticorpo monoclonal IgG2 anti-PCNA (Dako, EUA), utilizado na diluição de 1:1300 em secções seriadas dos tecidos. A incubação com anticorpo secundário foi feita com EnVision-HRP (DAKO, CARPENTERIA, CA, USA), seguindo as especificações do fabricante. A revelação com substrato cromogênico foi feita utilizando diaminobenzidina (0,6% em PBS com H₂O₂ 1%, filtrado) para anticorpos conjugados a peroxidase, por 30 minutos. A contra-coloração foi realizada utilizando-se hematoxilina de Carazzi para anticorpos com peroxidase. Após as reações, as lâminas foram lavadas, desidratadas em

bateria de etanol (50%, 80%, 95% e 99,8%) e montadas com Entellan (EMS, Hatfield, PA, EUA). A exposição ao cromógeno foi monitorada em todos os experimentos, sendo interrompida simultaneamente no fragmento incubado com o anticorpo específico e em seu respectivo controle.

A análise de PCNA foi realizada em microscopia de luz sob o aumento de 400X. Para a contagem e registro das células positivas para o PCNA foram analisadas mil células em campos consecutivos. O índice de positividade foi calculado de acordo com fórmula a seguir:

$$IP = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células positivas}}{1.000 \text{ células aleatoriamente}} \times 100$$

4.6. Análise estatística

As análises dos dados relativos à proporção de machos e fêmeas ao nascimento e ao peso dos animais da geração F1 foram realizadas fazendo-se comparações com o grupo controle negativo, grupo Água/Água. Os dados relativos à proporção de machos e fêmeas foram submetidos à análise estatística utilizando o teste do Qui quadrado (χ^2). Já os dados relativos ao peso dos animais da geração F1 foram submetidos à análise estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Para análise dos ensaios bioquímicos e da intensidade da expressão do PCNA os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e nos casos em que foram detectadas diferenças entre os grupos experimentais foi aplicado um pós-teste de Tukey ao nível de significância $p < 0,05$, utilizando-se o software GraphPadPrism® 5. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média.

5. RESULTADOS

No presente estudo, avaliou-se primeiramente se a exposição ao 4-Nonilfenol durante a gestação afetava a fecundidade das fêmeas, os dados estão ilustrados na Tabela 1 e na Figura 6.

A Tabela 1 mostra o número de filhos nascidos de cada uma das fêmeas em cada grupo experimental. Nela pode-se observar que uma fêmea do grupo tratado 4-Nonilfenol não teve filhos, mesmo após dois ciclos de coabitação. Além disso, considerando que o menor número de filhos que uma fêmea pudesse ter seja igual a quatro, pois foi esse o menor número de filhos tidos por uma fêmea do grupo que recebeu somente água, no grupo que recebeu 4-Nonilfenol, duas delas (mães H e I) tiveram menos de quatro filhos e no grupo que recebeu óleo, uma das mães (mãe E) teve menos de quatro filhos.

Tabela 1. Número de filhos nascidos de cada uma das mães que durante a gestação receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4-Nonilfenol.

Tratamento geração Mãe n de filhos machos/fêmeas parental (grupo)			
	B	04	01/03
	C	08	04/04
	Total	21	09/12
Óleo de milho	D	09	06/03
	E	02	01/01
	F	06	03/03
	Total	17	10/07
4-Nonilfenol	G	12	04/08
	H	03	01/02
	I	03	02/01
	J	-	-
	Total	18	07/11

Considerando com o 100% a média de filhos tidos pelas fêmeas que receberam somente água, a média relativa de filhos gerados pelas fêmeas que receberam 4-Nonilfenol ou óleo de milho é, respectivamente, iguais a 85,71%, e 80,95%, Figura 6. A análise estatística mostrou que o tamanho da ninhada das fêmeas que receberam 4-Nonilfenol foi similar a dos grupos controles ($p=0,9137$).

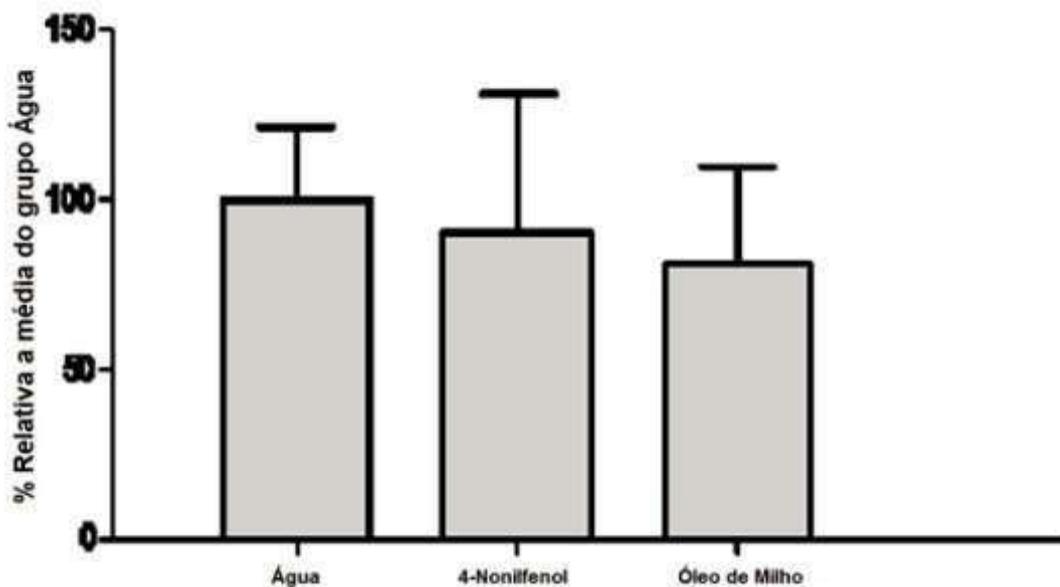


Figura 6. Porcentagem relativa de filhos nascidos de fêmeas que receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4-Nonilfenol diariamente durante a prenhez

A proporção de machos e fêmeas entre a prole de mães dos diferentes grupos experimentais também foi avaliada neste estudo, ver Figura 7. Nessa figura pode-se observar que as fêmeas que receberam durante a prenhez água, óleo de milho e 4-Nonilfenol geraram, respectivamente, porcentagem de filhos machos igual a 42,86%, 58,82% e 38,88%. De acordo com o teste estatístico do Teste de χ^2 com confiança de 5%, essa diferença no número

de machos nascidos entre os grupos não foi significativa ($p=0,257$).

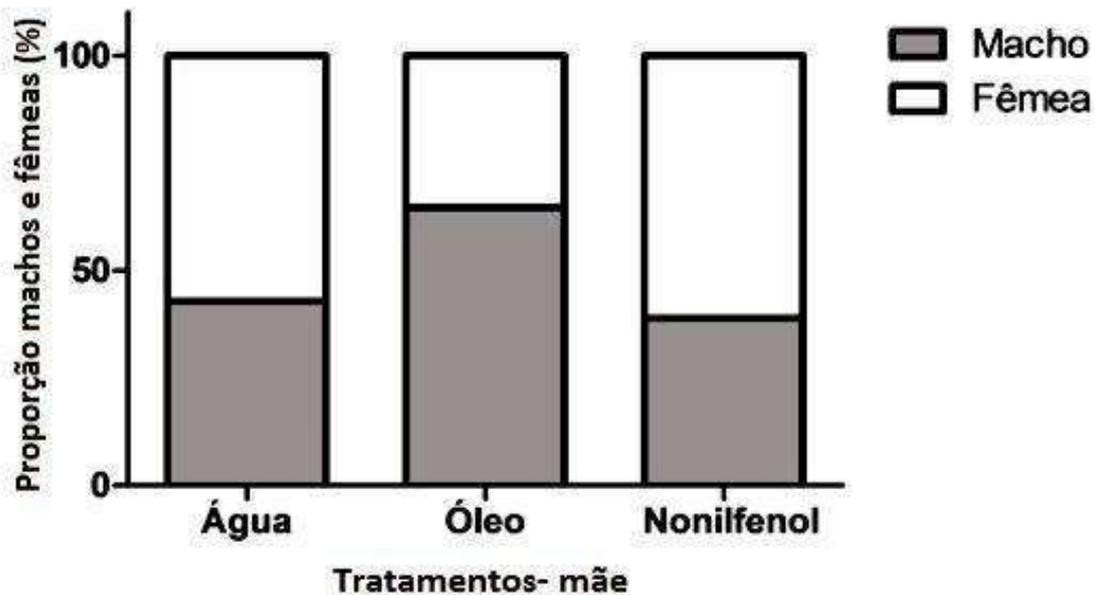


Figura 7. Proporção de machos e fêmeas entre a prole de fêmeas que receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4- Nonilfenol diariamente durante a prenhez

Neste estudo também se avaliou se a exposição ao NP, durante o período perinatal e de lactação, e ao Bisfenol A, após o desmame, interferia no crescimento dos indivíduos. Para tal, 55 camundongos da geração F1, pois dos 56 nascidos um faleceu 24 horas após o nascimento, foram pesados no 21^o dia de vida, idade em que os mesmos foram desmamados (Figura 8), no 42^o dia, idade que corresponde ao fim da puberdade, e no 60^o dia, idade correspondente ao início da maturidade sexual e ao final do período experimental (Figura 9).

Na Figura 8 observa-se que no 21^o dia de vida os animais cujas mães receberam 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam apresentaram peso ($15,37 \pm 2,37$ g) similar ao dos animais cujas mães receberam água ($15,80 \pm 2,10$ g) ou óleo de milho ($16,45 \pm 1,06$ g), peso esse que não mostrou diferença significativa.

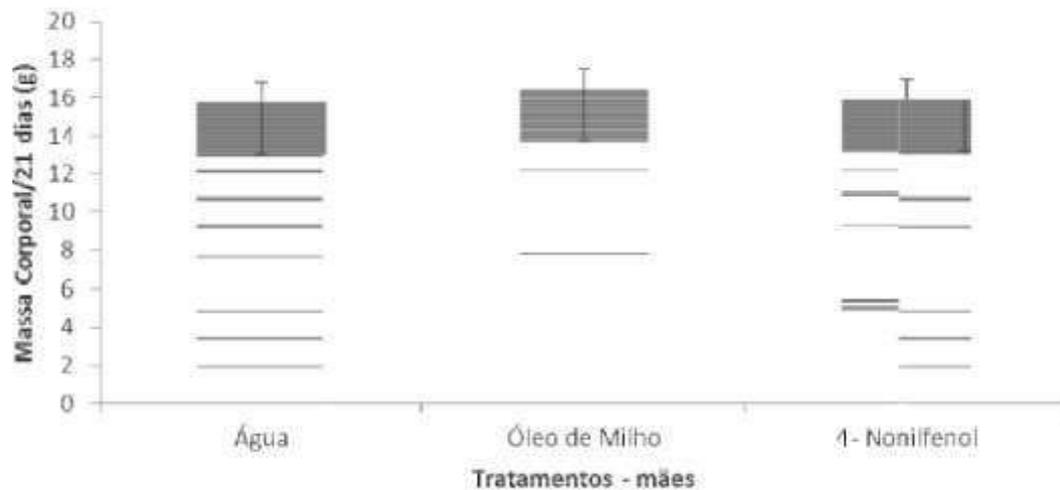


Figura 8. Peso médio em gramas, dos animais cujas mães receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4-Nonilfenol aos 21 dias, fim do desmame. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

No 42^o dia, Figura 9, os animais do grupo NP/Água apresentaram peso médio igual a $20,90 \pm 0,84$ g, peso esse que se mostrou significativamente inferior ao dos animais do grupo Água/Água, cujo peso médio foi igual a $23,04 \pm 2,30$ g. Já os animais do grupo NP/BFA apresentaram peso médio ($25,35 \pm 2,08$ g) significativamente maior do que o grupo Água/Água.

A Figura 9 mostra também que ao final do tratamento, quando tinham 60 dias de vida, os animais do grupo NP/Água e os do grupo NP/Óleo apresentaram, respectivamente, peso médio igual a $21,44 \pm 0,97$ g e $22,95 \pm 2,09$ g, peso esse que se mostrou significativamente inferior ao dos animais do grupo Água/Água, cujo peso médio foi igual a $24,82 \pm 2,60$ g. Já os animais do grupo NP/BFA continuaram apresentando peso médio significativamente maior ($26,48 \pm 2,04$ g) do apresentado pelos animais do grupo Água/Água.

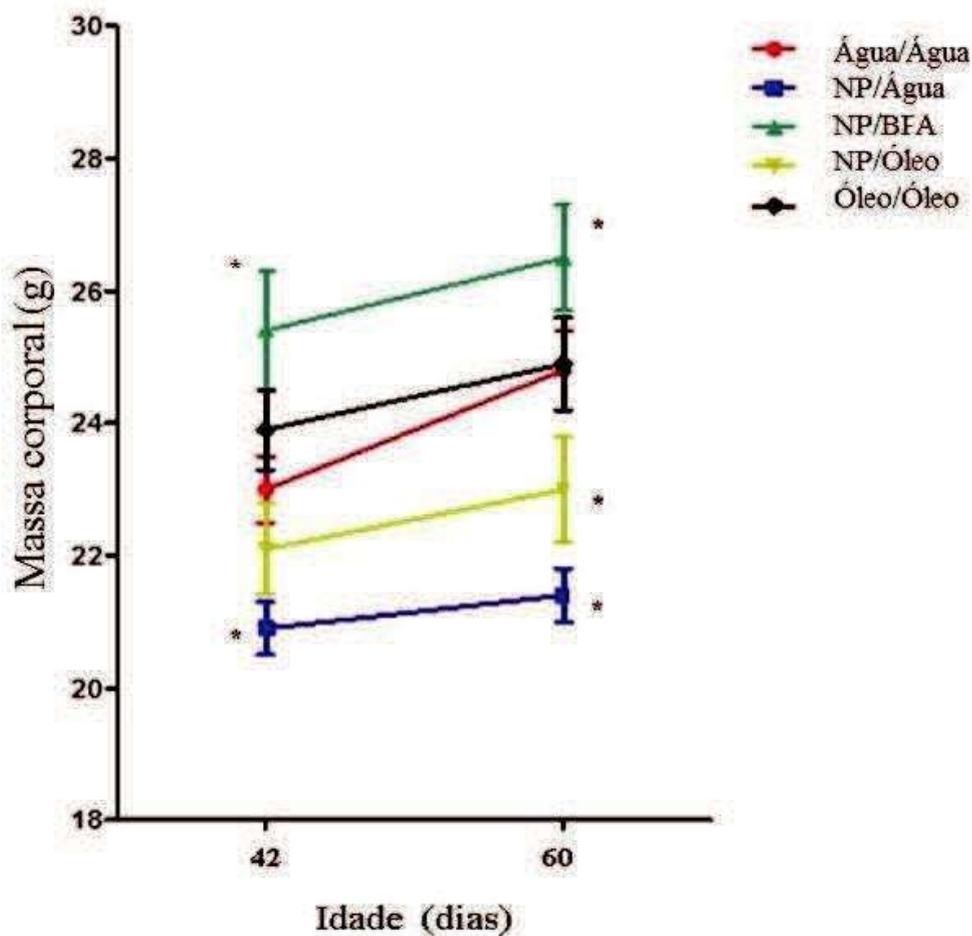


Figura 9. Peso médio de camundongo Balb/c- cujas mães receberam, por gavagem, água, óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, água, óleo de milho ou Bisfenol A. 42 dias – fim da puberdade; 60 dias - início da maturidade sexual. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo Água/Água no mesmo tempo

Outro parâmetro avaliado neste estudo foi se a exposição Bisfenol A nos camundongos sensibilizados por 4-Nonilfenol induzia hepato/nefrotoxicidade, além de lesões no baço. Esta análise foi realizada em 49 animais, pois foi esse o número de os animais que se conseguiu sangue suficiente para a análise bioquímica.

Os cortes histológicos dos fígados não apresentaram alteração morfológica; o parênquima desse órgão apresentava lóbulos de tamanho

normal, bem definidos e delimitados por espaços portas que continham uma vênula, uma arteríola e um ducto biliar. Os lóbulos por sua vez eram constituídos de hepatócitos, alguns deles binucleados, com aspecto normal, dispostos em cordões orientados radialmente a partir de uma veia centrolobular e entremeados com capilares sinusóides (Figura 10).

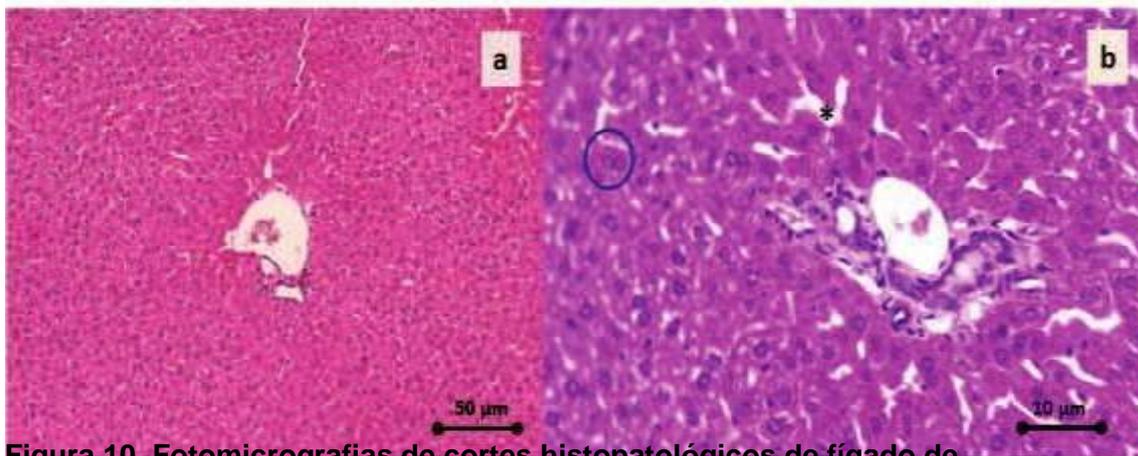


Figura 10. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de fígado de camundongo Balb/c, corados com H&E. (a) e (b) Fígado de animal do grupo controle negativo - Água/Água. * capilar sinusóide; hepatócito binucleado circulado

Os baços também não apresentaram alterações morfológicas. Neles o parênquima era dividido em polpa branca e polpa vermelha, sendo a polpa branca constituída de tecido linfóide com formas nodulares e cordonais e a polpa vermelha constituída de tecido reticular entremeado com capilares sinusóides (Figura 11).

A análise histológica dos rins mostrou que esses órgãos apresentavam a zona cortical, localizada mais externamente, e a zona medular, localizada mais internamente, de aspecto normal (Figura 12). Na zona cortical observaram-se a presença de corpúsculos renais, os quais são formados por tufo de capilares, além de túbulos contorcidos proximais e distais constituídos de epitélio cúbico simples (Figura 12a e 12b). Na região medular (Figura 12c) observavam-se

alças-de-Henle e tubos coletores. Nos animais dos grupos NP/BFA foi observado de gotas hialinas eosinófilas no citoplasma de células epiteliais de

alguns túbulos contorcidos distais (Figura 12d).

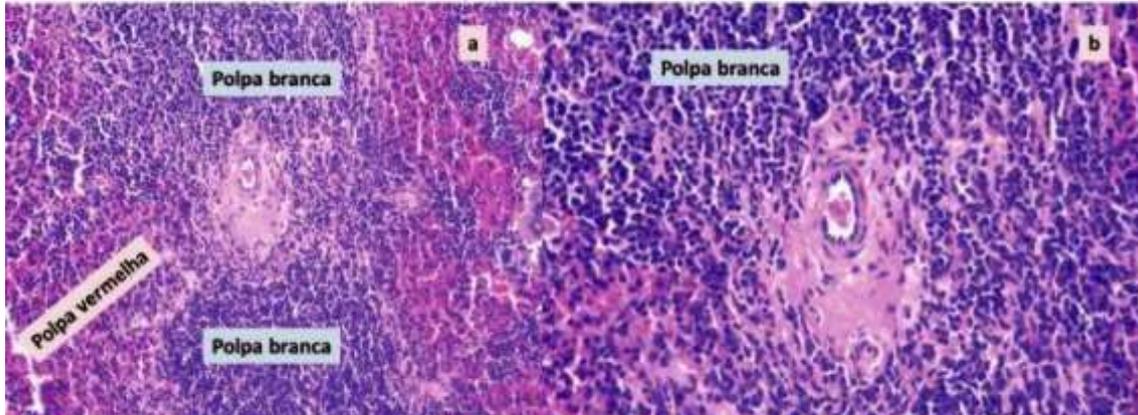


Figura 11. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de baço, corados com H&E, de camundongo Balb/c do grupo controle negativo - Água/Água. (a) polpa branca – tecido linfoide. Barra das escalas = (a) 100 μ m; (b) 400 μ m.



Figura 12. Fotomicrografias de cortes histopatológicos de rim, corado com H&E, de camundongo Balb/c do grupo NP/BFA. (a-b) região cortical; (c, d) região medular. Setas- gotas hialinas no citoplasma de células de túbulos contorcidos distais. Barra das escalas = (a,b,c) 100 μ m; (d) 400 μ m.

Como indicadores de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade também foram dosados os níveis séricos das enzimas de FAL, GT, TGO, TGP, além dos níveis de Creatinina e Ureia, ver Tabela 2. Os dados foram obtidos da análise do sangue de 37 animais, pois, como citado anteriormente, dos 55 nascidos sobreviventes este foi o número de animais que se conseguiu

Com relação aos indicadores de hepatotoxicidade observa-se nessa tabela que somente os animais do grupo NP/Água apresentaram níveis séricos de FAL ($102,60 \pm 4,47$ U/L) similares aos do grupo Água/Água ($106,63 \pm 3,88$ U/L). Nos animais dos grupos Óleo/Óleo, NP/Óleo e NP/BFA os níveis séricos dessa enzima foram significativamente inferiores ao do grupo Água/Água e correspondiam, respectivamente, a $85,18 \pm 5,94$ U/L, $85,67 \pm 3,73$ U/L, $97,00 \pm 4,86$ U/L.

A Tabela 2 mostra também que somente os animais do grupo Óleo/Óleo apresentaram nível sérico de GT superior ao apresentado pelos animais dos outros grupos. Nesse grupo o nível de GT foi de $7,30 \pm 4,307$ UL, enquanto que nos outros grupos o nível sérico dessa enzima não excedeu a 3,50 U/L, sendo igual a $3,0 \pm 0,30$ U/L no grupo Água/Água, $3,20 \pm 0,4$ U/L no grupo NP/Água, $3,50 \pm 0,20$ U/L no grupo NP/Óleo e $3,50 \pm 10,60$ U/L no grupo NP/BFA.

Já com relação aos níveis da enzima TGO, somente os animais do grupo NP/Água mostraram níveis plasmáticos dessa enzima ($134,60 \pm 30,33$ UI/L) significativamente diferente ao dos animais grupo controle negativo, Água/Água ($92,05 \pm 8,9$ UI/L).

Ainda na Tabela 2 observa-se que somente o grupo NP/BPA mostrou níveis séricos da enzima TGP ($42,00 \pm 10,04$ UI/L) diferente aos do grupo controle negativo, Água/Água ($27,47 \pm 1,14$ UI/L).

Com relação a indicadores de nefrotoxicidade, observa-se também na Tabela 2, que somente os animais do grupo Óleo/Óleo mostraram nível sérico de Ureia ($63,15 \pm 2,14$ mg/dL) igual ao grupo Água/Água ($60,16 \pm 3,12$ mg/dL). Nos animais dos outros grupos o nível dessa enzima mostrou-se inferior ao do grupo controle negativo, sendo igual a $56,00 \pm 1,82$ mg/dL nos animais do grupo NP/Água, $54,83 \pm 5,20$ mg/dL nos do grupo NP/Óleo e $50,67 \pm 4,6$ mg/dL nos do grupo NP/BFA.

Já com relação aos níveis séricos de Creatinina essa mesma Tabela mostra que somente os animais dos grupos Óleo/Óleo apresentaram nível plasmático desse composto ($0,15$ mg/dL) diferente aos apresentados pelos animais dos outros grupos, cujos níveis foram iguais a $0,10$ mg/dL.

Neste estudo dosou-se também o nível plasmático de Progesterona nos indivíduos da geração F1. Conforme a Tabela 2, o grupo NP/Água mostrou nível sérico de progesterona ($20,07 \pm 12,57$ ng/mL) superior aos dos animais dos outros grupos; enquanto que os animais dos grupos Óleo/Óleo ($1,29 \pm 0,20$ ng/mL), NP/Óleo ($0,68 \pm 0,17$ ng/mL) e NP/BFA ($1,28 \pm 0,57$ ng/mL) mostraram níveis desse hormônio inferiores ao do grupo Água/Água, que mostrou nível igual a $3,44 \pm 1,59$ ng/mL.

Tabela 2. Níveis séricos de Fosfatase alcalina, Gama glutamiltransferase, Aspartato aminotransferase, Alanina aminotransferase, Ureia, Creatinina e Progesterona em camundongas Balb/c expostos a baixas doses do 4-Nonilfenol durante o período perinatal e lactação e ao Bisfenol A durante a puberdade.

Tratamento (mãe/ filho)	FAL (U/L)	GT (U/L)	TGO (U/L)	TGP (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Progesterona (ng/mL)
----------------------------	--------------	-------------	--------------	--------------	------------------	-----------------------	-------------------------

FAL: Fosfatase alcalina; GT: Gama glutamiltransferase; TGO: Transaminase glutâmico oxalacética; TGP: Transaminase glutâmico pirúvica, (#) valores de referencia de acordo com Araújo e et alli, 2015; (*) denota diferença significativa em relação ao grupo Água/Água, grupo controle negativo

Resultados

Os cortes histológicos dos úteros das fêmeas do grupo Água/Água, Óleo/Óleo, NP/Água e NP/Óleo apresentavam endométrio com estroma rico em células com núcleos fusiformes e heterocromáticos e com várias glândulas tubulares simples. O epitélio da cavidade endometrial mostrou-se cilíndrico simples e o que recobria as glândulas mostrou-se cuboide simples (Figura 13).

Nos animais do grupo NP/BFA o epitélio superficial e o das glândulas também se apresentavam altos, em alguns casos, as células epiteliais da superfície e das glândulas apresentavam vacúolos citoplasmáticos. As células do estroma apresentavam-se grandes com núcleos volumosos, eucromáticos (Figura 13d).

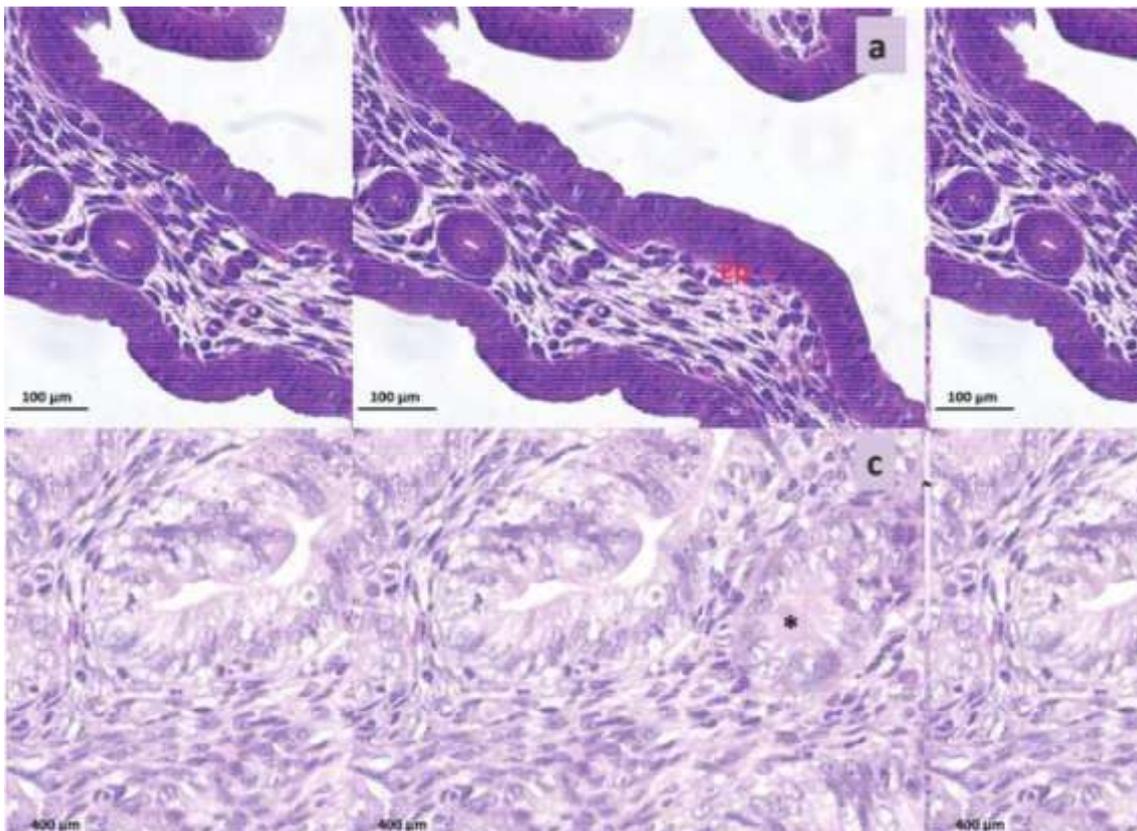


Figura 13. Fotomicrografia do endométrio, corado com H&E, de camundongos Balb/c cujas mães receberam Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a puberdade foram expostas a Água, ao Óleo de milho ou ao Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c) animal do grupo NP/Água; (d) animal do grupo NP/BFA, estroma rico em células com núcleos volumosos e eucromáticos. Asterisco (*) – glândulas; Ep: tecido epitelial superficial; setas apontam para vacuolização em célula epitelial; seta larga aponta neutrófilos no lúmen do útero

A análise do tecido mamário das fêmeas dos diferentes grupos mostrou que o epitélio das glândulas mamárias era constituído de uma camada interna de células epiteliais cubóides e uma camada externa de células achatadas, células mioepiteliais, e esse epitélio era envolvido por tecido adiposo (Figura 14a).

Em fêmeas dos grupos NP/Água e NP/Óleo observaram-se dilatações dos ductos mamários, alguns deles com células dentro do lúmen (Figura 14b).

Nas fêmeas do grupo NP/BPA foi observada atrofia ductal com excesso de tecido adiposo (Figura 14c), alguns ductos apresentavam células achatadas na superfície, além de vacuolizações citoplasmáticas (Figura 14d).

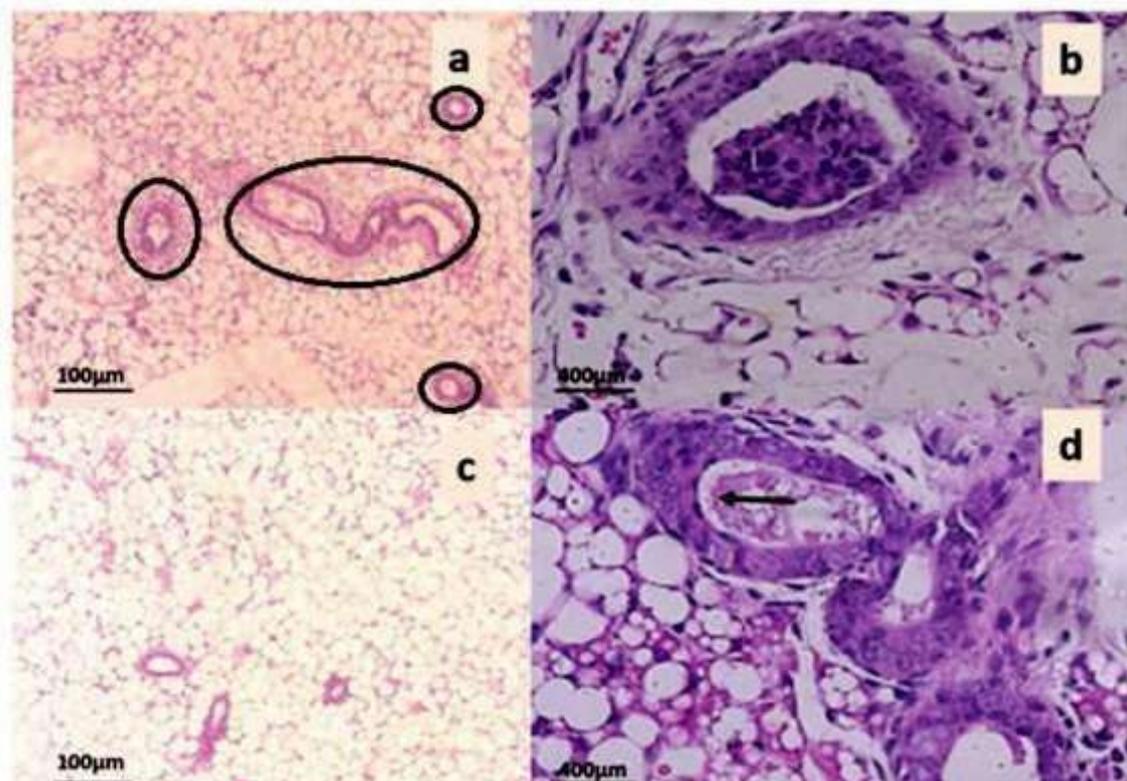


Figura 14. Fotomicrografia de tecido mamário, corado com H&E, de camundongas Balb- cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a puberdade foram expostas, também por gavagem, a Água, ao Óleo de milho ou ao Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c, d) animal do grupo NP/BFA. Círculos – ductos glandulares; Setas apontam células achatadas na camada interna do epitélio glandular.

A Figura 15 ilustra cortes histológicos de tecidos mamário corados pelo método imunohistoquímico para o PCNA. Nessa figura observa-se que os diversos grupos apresentam intensidade similar de marcação desse antígeno no tecido mamário.

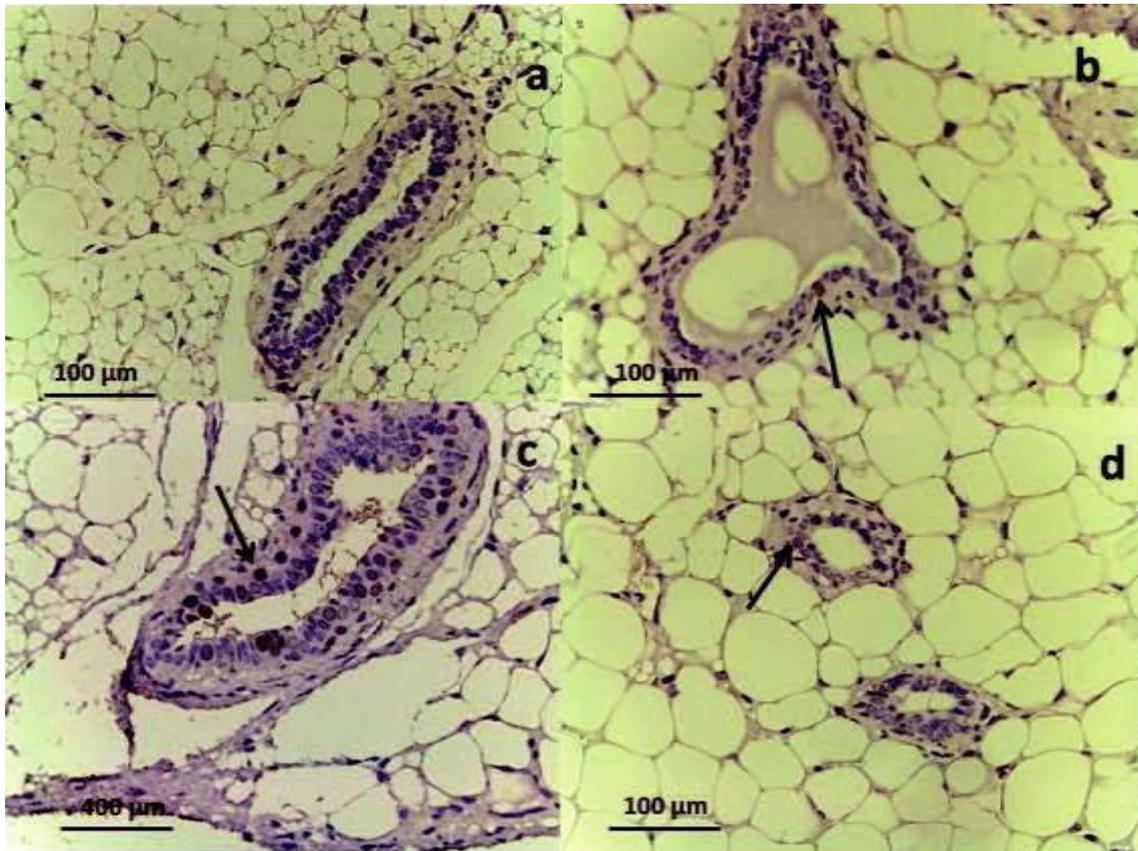


Figura 15. Fotomicrografia de tecido mamário com marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) de camundongos Balb/c fêmeas cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c) animal do grupo NP/Óleo; (d) animal do grupo NP/BFA. Setas apontam células positivas (núcleos marrons) para o antígeno PCNA

A análise quantitativa da proliferação celular foi realizada considerando-se a quantidade de células positivas para o antígeno PCNA por mm^2 . Os dados estão ilustrados na Figura 16. Nessa figura observa-se que no tecido mamário o índice de positividade para o PCNA variou de 247,5 a 1534,1 CEL/mm^2 , mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

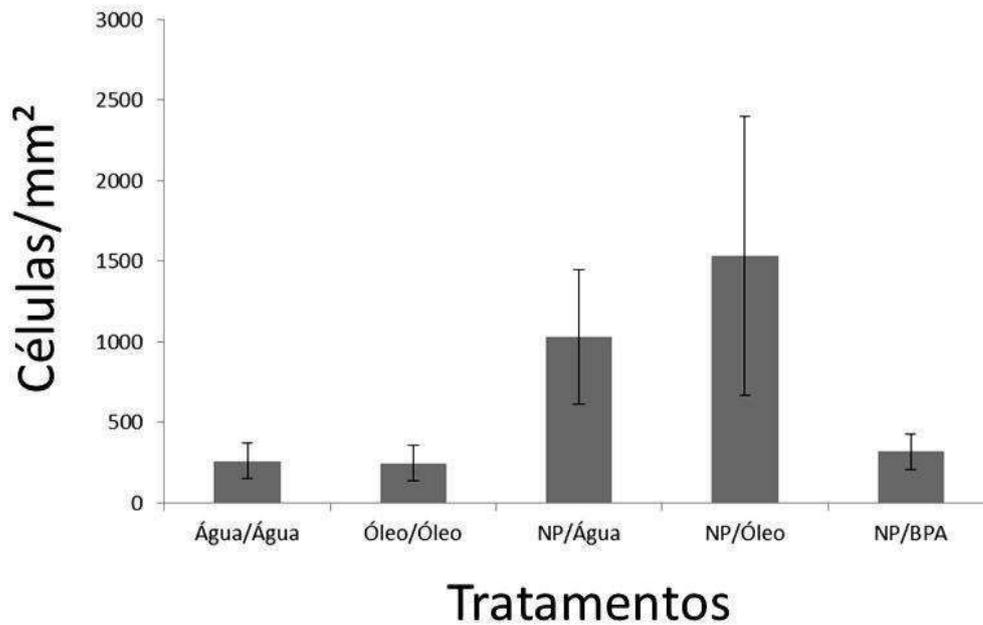


Figura 16. Expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em tecido mamário de camundongos Balb/C fêmeas cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A.

Com relação ao endométrio, a expressão do antígeno PCNA foi observada tanto no epitélio da superfície e no das glândulas quanto no estroma, Figura 17. Mas a intensidade da expressão do PCNA variou nos animais dos diversos grupos; em alguns a intensidade da expressão do PCNA era maior no tecido epitelial em outros era maior no estroma.

Já o índice de positividade não foi estatisticamente diferente entre os grupos, Figura 18.

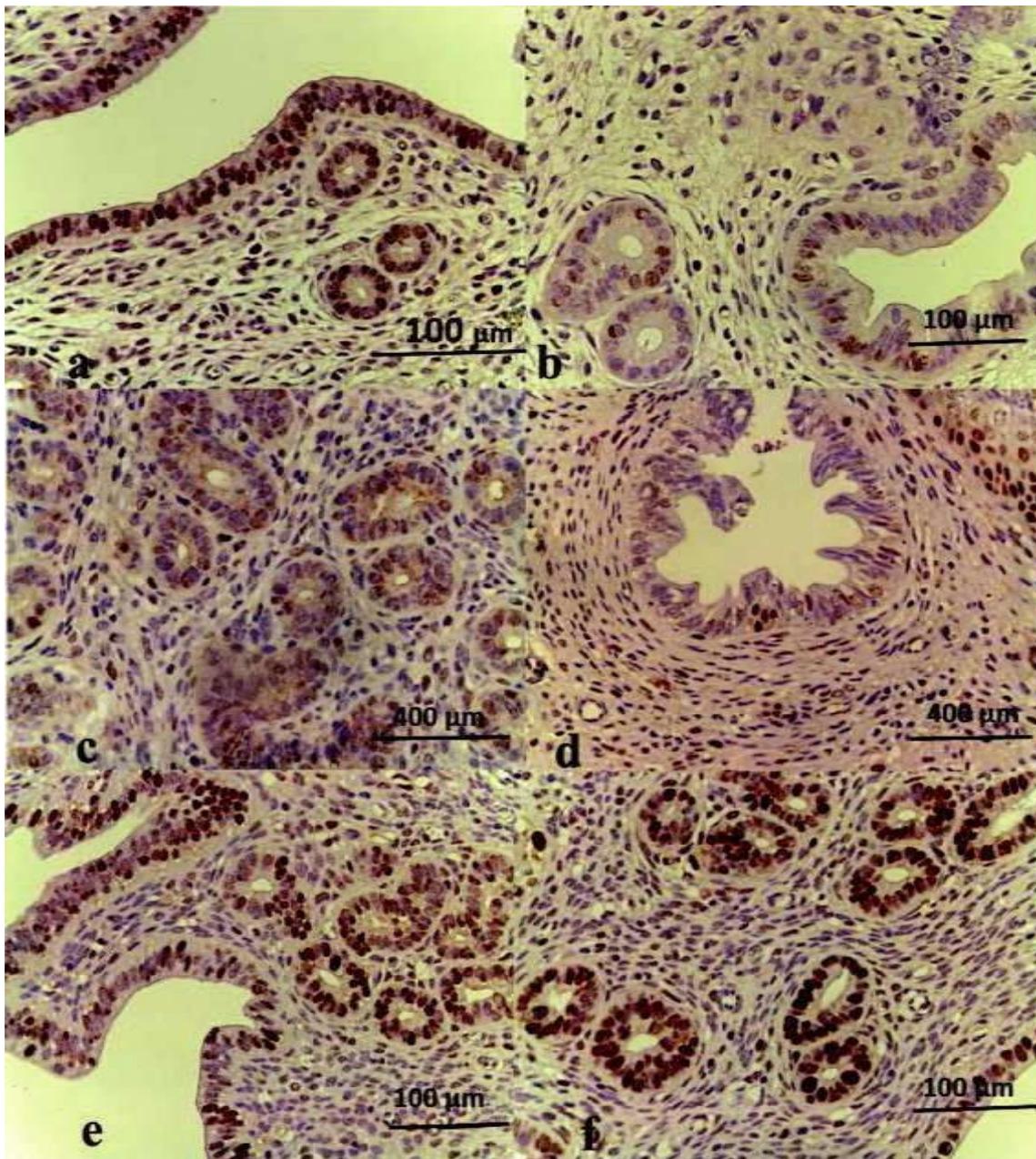


Figura 17. Fotomicrografi a de tecido endometrial com marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) de camundongos Balb/c fême as cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A. (a) animal do grupo Água/Água; (b) animal do grupo Óleo/Óleo; (c) animal do grupo NP/Água; (d) animal do grupo NP/Óleo; (e, f) animal do grupo NP/BPA. Núcleos marrons mostram células positivas para o antígeno PCNA

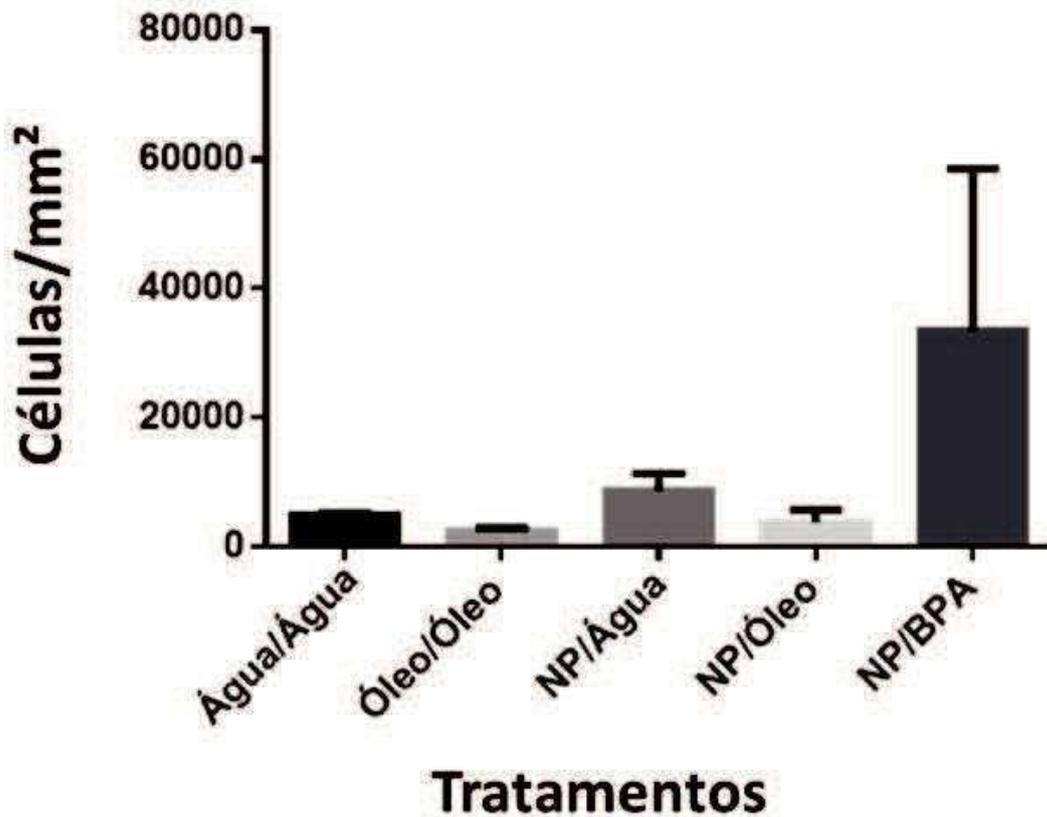


Figura 18. Expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no endométrio de camundongos Balb/C fêmeas cujas mães receberam, por gavagem, Água, Óleo de milho ou 4-Nonilfenol durante a sua gestação e enquanto os amamentavam e que durante a sua puberdade receberam, também por gavagem, Água, Óleo de milho ou Bisfenol A.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, cujo objetivo consistiu em avaliar os efeitos da exposição a baixas doses de BFA em camundongos sensibilizados por NP durante a fase perinatal, o primeiro parâmetro avaliado foi o de fertilidade, ou seja, se o número de filhos nascidos tinha sido afetado pelo fato de as mães terem sido expostas ao NP durante a gestação. A literatura refere que camundongos geram em média 12 filhotes por reprodutora, entretanto, neste estudo somente uma das quatro mães que receberam NP teve nove filhos, duas tiveram somente três filhos cada uma e outra não teve filhos, mesmo após duas tentativas de acasalamento. Apesar disso, a análise dos dados mostrou que o tamanho da ninhada das fêmeas dos diferentes grupos não diferiu estatisticamente. Estes dados corroboram os encontrados por Nagao e colaboradores em 2001, quando esses autores mostraram que o NP na concentração de 50 mg/kg/dia quando administrado aos genitores não afetava no número de filhos nascidos. O que evidencia que nessa concentração o Nonilfenol não é tóxico.

Considerando que a geração F1 foi exposta cronicamente ao NP durante o desenvolvimento embrionário, e ainda que nos mamíferos, após a diferenciação das gônadas, cujo processo está associado à presença ou à ausência do cromossomo Y, a diferenciação da genitália interna e externa, em masculina ou feminina, é dependente da resposta de vários tecidos aos hormônios estrógenos ou andrógenos a que os fetos estão expostos (MELLO et alli, 2005; MAJDIC & TOBET, 2011), outro parâmetro investigado neste estudo foi se a exposição diária ao 4NP durante a gestação alteraria a relação macho/fêmea entre os indivíduos nascidos daquela gestação. Ressalta-se o fato de que apesar de a sexagem dos animais ter tido como base a

visualização da bolsa escrotal, todos os animais identificados como fêmeas apresentaram úteros. A análise estatística dos dados mostrou que a dose de 50 mg/kg/dia de 4NP administrado às fêmeas durante a gestação não foi suficiente para induzir alterações na determinação do sistema reprodutor dos filhotes.

Outro parâmetro analisado neste estudo foi o peso dos animais da geração F1. A análise desse parâmetro deu-se, principalmente, porque existem evidências de que alguns desreguladores endócrinos podem regular o metabolismo lipídico e a adipogênese (BERTOLI et alli, 2015), especialmente se a exposição a eles ocorre durante o início do desenvolvimento (HEINDEL et alli, 2015). Mas, como se sabe que a integração olfativa entre as mães lactantes e a cria aparece logo após o parto e tem efeito no reconhecimento da prole, neste estudo não se efetuou a análise do peso dos indivíduos da geração F1 ao nascimento para que os mesmos não fossem rejeitados pelas mães, desse modo, a primeira medida foi obtida quando os animais tinham 21 dias de vida, data do desmame. A análise estatística dos dados mostrou que a transferência vertical de NP durante a lactação não foi suficiente para induzir alterações no peso dos animais, mais um indício de que o NP na concentração de 50 mg/Kg/dia não foi tóxico para os animais da geração F1.

Entretanto, no 42^o dia, quando os animais da geração F1 já estavam recebendo os tratamentos diretamente e não mais por meio do leite materno, foi observado que os animais do grupo NP/Água, apresentavam peso menor do que o grupo controle negativo, grupo Água/Água. Já os animais do grupo NP/BFA, aqueles cujas mães receberam NP e eles BFA, apresentaram aos 42 e 60 dias de vida peso maior do que o grupo controle negativo. Esses dados

corroboram com os publicados por Rubin colaboradores em 2001, quando esses autores relataram que a exposição durante o período pré-natal e neonatal a baixas doses de BFA leva ao aumento do peso corporal das crias, particularmente das fêmeas. Recentemente Ariemma e colaboradores (2016) mostraram in vitro que exposição prolongada a doses baixas de Bisfenol A aumenta a proliferação de células precursoras de adipócitos, antecipando a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de lipídios e glicose.

Considerando que o fígado e os rins são os órgãos mais impactados pela exposição a substâncias químicas (KATARIA et alli, 2015) e ainda que o BFA quando administrado por via oral é extensamente absorvido, sendo metabolizado no fígado em glucoronídeo de BFA, forma inativa excretada pelo rim (VÖLKELE et alli, 2005; GAYRARD et alli, 2013), neste estudo também se decidiu avaliar se exposição a baixas doses de BFA induzira hepato/nefrotoxicidade. Aparentemente, o tratamento dado aos animais não demonstrou efeito tóxico para o fígado, pois ao microscópio de luz não foi observado nenhuma alteração morfológica nesse órgão. Esta observação não corrobora as de Yıldız & Barlas (2013), quando esses autores relataram que o BFA em concentração subcrônica induz no fígado alterações estruturais tais como: edema, degeneração e necrose de hepatócitos. Vale citar que, diferentemente deste estudo, em que se utilizou o BFA na concentração de 25 µg/Kg, Yıldız e Barlas utilizaram dose igual a 125 mg/kg, que eles consideraram dose subcrônica.

No que se refere aos rins, o exame histológico mostrou a presença de gotas hialinas em células de túbulos contorcidos distais dos animais do grupo NP/BFA. Embora neste estudo, a presença de gotas hialinas tenha sido

visualizada por coloração convencional de hematoxilina e eosina (H&E) e a composição das gotículas não tenha sido avaliada, a sua presença é um indicio de lesão renal, pois Burnett e colaboradores, em 1989, mostraram que as gotas hialinas representam acúmulo de 2μ -globulina dentro de lisossomas, sendo que a presença dessas gotas em células de túbulos renais caracteriza nefrotoxicidade (STONE et alli, 1987; MARCHESI et alli, 2003; DOI et alli, 2007).

Além do fígado e do rim também se analisou o baço dos animias de todos os grupos, pois esse órgão constitui o maior acúmulo de tecido linfoide do organismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013) e segundo Sousa (2015), por expressarem pelo menos um subtipo dos receptores de estrógenos as células imunes estariam suscetíveis à ação do BFA; esse xenoestrógeno interfere na proliferação, na diferenciação e na migração de leucócitos, mesmo quando utilizado em concentrações consideradas baixas, além do fato de induzir redução na população de células imunocompetentes no baço na concentração de 5 mg/kg (SUGITA-KONISHI et alli, 2003). Embora neste estudo não se tenha efetuado a análise da população celular do baço, ao microscópio de luz nenhum animal mostrou alteração no tecido esplênico. É importante citar que se tivesse ocorrido alteração nos tipos celulares do baço, isso se refletiria na organização do tecido linfoide nesse órgão.

Como indicadores de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade também foram dosados o nível sérico de enzimas Fosfatase alcalina (FAL), Gama glutamiltransferase (GT), Aspartato aminotransferase (TGO), Alanina aminotransferase (TGP), além dos níveis de Creatinina e Ureia. A análise desses parâmetros bioquímicos envolveu a comparação com o grupo controle

negativo, pois apesar de os níveis dessas enzimas estarem dentro dos valores de referência, essas substâncias para os camundongos BALB /c apresentam variação sazonal.

A Fosfatase alcalina é uma enzima responsável pela remoção de grupos fosfato de várias moléculas, geralmente ela é dosada para avaliar lesão das vias biliares, pois ela é totalmente excretada via bile. Neste estudo os animais dos grupos Óleo/Óleo, NP/Óleo e NP/BFA apresentaram níveis reduzidos dessa enzima. Esses dados não corroboram os relatados por Khan e colaboradores em 2015, quando eles mostraram que o BFA induz aumento de FAL no soro sanguíneo, entretanto, diferentemente deste estudo, em que se utilizou dose baixa do BFA (25 µg/Kg), Khan e colaboradores utilizaram doses de 150 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg. A redução dos níveis de FAL observados neste estudo pode ser devido a várias condições, entre elas alterações no metabolismo do tecido ósseo, inflamação na mucosa do intestino delgado, deficiência de magnésio, mas não deve ser relacionada a lesão hepática, pois se assim fosse os níveis dessa enzima estariam aumentados e não diminuídos.

Apesar de não mostrar alterações na morfologia do fígado, os animais do grupo Óleo/Óleo mostraram níveis de -glutamyltransferase maiores do que o grupo controle, o que poderia ser relacionado a aumento de gordura no fígado, visto que esses animais receberam diariamente por gavagem 30 µL de óleo de milho, apesar de não ter sido visualizada na análise morfológica. Talvez esse aumento de -glutamyltransferase seja o início de um processo de uma doença hepática gordurosa não alcoólica. Vale lembrar que o NP e o BFA foram diluídos em óleo de milho e os animais que receberam esses xenoestrógenos não mostraram aumento de -glutamyltransferase.

Com relação às enzimas TGO e TGP, os animais do grupo NP/Água mostraram níveis aumentados de TGO e os do grupo NP/BFA aumento de TGP, embora ainda dentro dos valores de referência para a espécie. A que se considerar o fato de que nesses dois grupos a relação TGP/TGO é menor que 1, e somente é indicativo de lesão hepática quando essa relação for maior 1.

Além das enzimas citadas acima também foram dosados os níveis séricos de ureia e creatinina. A ureia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas, gerada no fígado, é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo, principalmente pela urina, sendo, portanto, utilizada para avaliar funções renais (BURTIS & ASHWOOD, 1998), apesar de também ser um indicador de lesão hepática. A creatinina resulta da degradação da fosfocreatina existente em células musculares, e é principalmente excretada por filtração glomerular (GUYTON & HALL, 2009); o nível de creatinina do sangue permite calcular a taxa de filtração glomerular, um parâmetro utilizado para avaliar a função renal. Por isso neste estudo dosaram-se os níveis desses dois compostos como parâmetro de nefrotoxicidade.

Todos os grupos constituídos de animais cujas mães receberam NP durante a sua gestação e enquanto os amamentavam (NP/Água, NP/Óleo e NP/BFA) mostraram níveis séricos de ureia inferiores aos apresentados pelos animais do grupo Água/Água, mas ainda estavam dentro do intervalo dos valores de referência para camundongos Balb/c.

Já em relação à análise aos níveis séricos de creatinina, os animais dos grupos NP/Água, NP/Óleo e NP/BFA não apresentaram níveis dessa substância diferente do apresentado pelo grupo controle negativo. Esses dados corroboram os Yen e colaboradores que 2012 mostraram que a exposição

crônica ao NP não altera os níveis séricos de creatinina. Embora não corroborem os de Olea-Herrero e colaboradores (2014) que relatam que o BFA na concentração de 50 mg/Kg induz, em camundongos, as células que revestem o corpúsculo renal à apoptose, levando a hiperfiltração glomerular o que acarretaria na diminuição dos níveis séricos de creatinina. Ressalta-se o ato de que essa concentração de BFA é muito superior à utilizada neste estudo. Ainda com relação à creatinina, pode-se observar na Tabela 2 que os animais do grupo Óleo/Óleo mostraram níveis séricos dessa substância superiores aos apresentados pelos animais de todos os outros grupos. Esse aumento de creatinina pode ser um sinal de diminuição da filtração glomerular. Em 2011, Imafidon e Okunrobo demonstraram que dietas à base de óleo aumentam os níveis de creatinina, comprometendo a função renal. Também em 2011, Borba e colaboradores relataram que a ingestão de uma dieta hiperlipídica pode aumentar o nível sérico de creatinina e diminuir a sua depuração. Como a dosagem de creatinina deve ser realizada em paralelo com a de ureia para uma melhor avaliação da lesão renal, há de se considerar que se a diminuição nos níveis de ureia observado neste estudo estiver relacionada à lesão renal, essa lesão deve estar no início, pois ocorreu sem aumento da creatinina, que tem aumento tardio na lesão renal quando comparada a ureia.

Já que tanto o NP quanto o BFA são capazes de ligar-se aos receptores de hormônios estrógenos e assim mimetizar os seus efeitos, neste estudo também se quantificou nos indivíduos da geração F1 os níveis de progesterona. Os níveis diminuídos de progesterona detectados neste estudo no grupo NP/BFA não corroboram os de Delclos e colaboradores (2014), esses autores relataram que camundongos adultos expostos ao BFA na mesma

concentração utilizada neste estudo (25 µg/Kg/dia) apresentaram os níveis séricos de progesterona similares ao do grupo controle. Da mesma forma os níveis de progesterona observados nos grupo Óleo/Óleo e NP/Óleo não corroboram os de Aranda-Ávila e colaboradores (2010) que relataram que a ingestão de óleo de milho aumenta níveis séricos de progesterona.

Como o NP e o BFA podem afetar o equilíbrio entre os hormônios estrogênicos e a progesterona, levando o organismo a uma maior resposta aos estrógenos (ALDAD et alli, 2011), e ainda que os hormônios estrogênicos tem ação proliferativa sobre o endométrio e o epitélio mamário, neste estudo realizou-se também nas fêmeas da geração F1 a análise histológica qualitativa dos tecidos mamários e endometrial.

As fêmeas do grupo NP/BFA apresentaram espessamento do epitélio e estroma com células grandes com núcleos volumosos e eucromáticos, condizentes com a passagem da fase proliferativa para a fase secretora do ciclo estral, quando os níveis de progesterona não estão tão elevados. Ressaltando que nesse grupo, como citado anteriormente, os níveis de progesterona eram menores do que os do grupo controle. O espessamento do endométrio, também conhecido como hiperplasia endometrial, normalmente está relacionado à exposição excessiva aos estrógenos, o que aumenta o risco de desenvolvimento de câncer endometrial. A literatura mostra que níveis mais elevados de BFA podem levar a hiperplasia endometrial. Mendoza-Rodríguez e colaboradores em 2011, por exemplo, mostraram aumento significativo na espessura do epitélio uterino de camundongas cujas mães tinham sido expostas ao BFA durante a sua gestação. Como a exposição ao BPA altera a

resposta hormonal em longo prazo esse espessamento pode aumentar a propensão ao desenvolvimento de câncer endometrial.

Embora tenham apresentado espessamento do tecido endometrial, as fêmeas do grupo NP/BFA mostraram nas glândulas mamárias atrofia ductal com aumento de tecido adiposo. Esse aumento de tecido adiposo pode estar relacionado ao fato de que o BFA também é capaz de se ligar a hormônios envolvidos no processo da adipogênese. Ohlstein e colaboradores (2014) mostraram, *in vitro*, que o BFA aumenta a diferenciação de células tronco em adipócitos. Da mesma maneira, Boucher e colaboradores em 2015 relataram que o BFA-glucoronídeo, um metabólito do BFA que não tem atividade estrogênica, é o indutor da diferenciação de células precursoras em adipócitos. Outro relato na literatura mostra o BFA mesmo quando associado a outros desreguladores endócrinos, ou seja, quando ocorre exposição a uma mistura de desreguladores endócrinos, entre eles o BFA, a expressão de genes de adipogênese é aumentada (BIEMANN et alli, 2014). Ressalta-se o fato de que os animais desse grupo (NP/BFA) mostraram peso maior do que todos os outros.

A literatura relata também que o BFA, mesmo em baixas doses, pode diminuir a taxa de apoptose nas células dos ductos mamários (VANDENBERG et alli, 2008) ou ainda estimular, *in vitro*, a proliferação de células de câncer de mama (SONG et alli, 2015), dados que não explicam o fato de neste estudo o grupo NP/BFA mostrar atrofia dos ductos das glândulas mamárias e não hiperplasia mamária, a alteração morfológica mais citada na literatura como a induzida por xenoestrógenos.

Apesar de no grupo NP/BFA o tecido endometrial mostrar tendência a maior proliferação celular, o índice de proliferação celular tanto no tecido mamário quanto no endometrial não se mostrou estatisticamente diferente do controle. Essa não significância pode ser decorrente da conversão do BFA para o BFA-glucoronídeo, como citado anteriormente, um metabólito que não tem atividade estrogênica, bem como pelo polimorfismo entre os indivíduos de uma população no que diz respeito às enzimas envolvidas no metabolismo do BFA, o que poderia ser evidenciado pelo valor do desvio padrão. Entretanto, há que se considerar o tamanho da amostra, que neste estudo foi pequena, pois as mães que receberam NP na gestação tiveram em conjunto 18 filhos, filhos esses que foram divididos aleatoriamente em três grupos, sendo que dos seis animais que receberam BFA somente três eram fêmeas.

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo sugere que a exposição ao BFA quando administrado cronicamente altera a estrutura das glândulas mamárias e do endométrio de camundongos Balb/c durante a idade adulta jovem, mas a relevância e a extrapolação desses dados para a população humana requerem estudos mais detalhados de modo a avaliar os mecanismos de ação do NP e do BFA e o seu papel no desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias hormônio-dependentes.

7. CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo sugere que:

a exposição ao 4-Nonilfenol na concentração de 50 mg/Kg/dia durante a prenhez não afeta a relação machos/fêmea entre os nascidos, nem o peso dos animais.

a exposição ao Bisfenol A na concentração de 25 µg/Kg, do desmame até à maturidade sexual, induz aumento de peso nos camundongos.

a exposição ao BFA na concentração de 25 µg/Kg por animais sensitizados pelo 4-Nonilfenol durante o período perinatal não é tóxica para o tecido hepático, para o renal nem para o tecido esplênico.

a exposição ao BFA na concentração de 25 µg/Kg por animais sensitizados pelo 4-Nonilfenol durante o período perinatal induz no início da maturidade sexual atrofia dos ductos galactóforos e adipogênese no tecido mamário, além de espessamento do endométrio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCONCIA, F.; PALLOTTINI, V.; MARINO M. Molecular mechanisms of action of BPA. *Dose-Response*. 13: 2-9. 2015.
- ADEMOLLO, N.; FERRARA F.; DELISE, M.; FABIETTI, F.; FUNARI, E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment International*. 34: 984–987.2008.
- ALDAD, T.S.; RAHMANI, N.; LERANTH, C.; TAYLOR, H.S. Bisphenol-A exposure alters endometrial progesterone receptor expression in the nonhuman primate. *Fertil Steril*. 96: 175-179. 2011.
- AMARO, A.A.; ESPOSITO, A.I.; MIRISOLA, V.; MEHILLI, A.; ROSANO, C.; NOONAN, D.M.; ALBINI, A. PFEFFER, U.; ANGELINI, G. Endocrine disruptor agent nonyl phenol exerts an estrogen-like transcriptional activity on estrogen receptor positive breast cancer cells. *Current Medicinal Chemistry*. 21: 630-640. 2014.
- ARANDA-AVILA, I.; HERRERA-CAMACHO, J.; AKÉ-LÓPEZ, J.R.; DELGADO-LEÓN, R.A.;KU-VERA, J.C. EFFECT OF supplementation with corn oil on postpartum ovarian activity, pregnancy rate, and serum concentration of progesterone and lipid metabolites in F1 (Bos taurus x Bos indicus) cows. *Tropical Animal Health and Production*. 42: 1435- 40. 2010. ARIEMMA, F.; D'ESPOSITO, V.; LIGUORO, D.; 2, ORIENTE, F.; CABARO, S.; LIOTTI, A.; CIMMINO, I.; LONGO, M.; BEGUINOT, F.; FORMISANO, P.; VALENTINO, R. Low-Dose Bisphenol -A Impairs Adipogenesis and Generates Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes. *PLoS ONE* 11(3): e0150762. doi:10.1371/journal.pone.0150762. 2016.
- BECHI, N.; IETTA, F.; ROMAGNOLI, R.; FOCARDI, S.; CORSI, I.; BUFFI, C.; PAULESU, L. Estrogen-like response to p-nonylphenol in human first trimester placenta and BeWo choriocarcinoma cells. *Toxicological Science*. 93: 75–81. 2006.
- BECHI, N.; IETTA, F.; ROMAGNOLI, R.; JANTRA, S.; CENCINI, M.; GALASSI, G.; SERCHI, T.; CORSI, I.; FOCARDI, S.; BUFFI, C.; PAULESU, L. Environmental Levels of para-Nonylphenol Are Able to Affect Cytokine Secretion in Human Placenta. *Environmental Health Perspectives*. 118: 427-31. 2010.

- BENACHOUR, N.; ARIS, A.; Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. Toxicology and Applied Pharmacology. 241: 322–328. 2009.**
- BERTOLI, S.; LEONE, A.; BATTEZZATI, A. Human Bisphenol A Exposure and the “Diabetes Phenotype”. Dose Response. 13:1-12. 2015.**
- BIEMANN, R.; FISCHER, B.; NAVARRETE SANTOS, A. Adipogenic effects of a combination of the endocrine-disrupting compounds bisphenol A, diethylhexylphthalate, and tributyltin. Obesity Facts. 7:48-56. 2014.**
- BILA, D. M.; DEZOTI, M.; Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química Nova. 30: 651-666. 2007.**
- BINDHUMOL, V.; CHITRA, K.C.; MATHUR, P.P. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. Toxicology 188: 117– 124. 2003.**
- BIRNBAUM, L.S.; When environmental chemicals act like uncontrolled medicine. Trends in Endocrinology and Metabolism. 24: 321–323. 2013.**
- BORBA, A.J. ROCHA, M.G.M.; SILVA, M.F.; TIBÚRCIO, D.T.S.; PEREIRA, S.A.L.; REIS, L.C.; THEDEI -JÚNIOR, G. Low-carbohydrate diet used for weight loss induces obesity in rats. Revista de Nutrição da Puccamp. 24: 519-528. 2011.**
- BOUCHER, J.G.; BOUDREAU, A.; AHMED, S.; ATLAS, E. In Vitro Effects of Bisphenol A -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. Environmental Health Perspectives. 123:1287-1293. 2015.**
- BURNETT V.L; SHORT B.G; SWENBERG J.A. Localization of a globulin within protein droplets of male rat kidney: Immunohistochemistry using perfusion-fixed, GMA-embedded tissue sections. Journal Histochemistry Cytochemistry. 37: 8 13 -8 18.1989.**
- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. Tietz Fundamento de Química Clínica, 4ª Ed - Guanabara Koogan SA. 1998.**
- BRANISTE, V.; JOUAULT, A.; GAULTIER, E.; POLIZZI, A.; BUISSON-BRENAC, C.; LEVEQUE, M.; MARTIN, P.G.; THEODOROU, V.; FIORAMONTI, J.; HOUDEAU, E. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal**

- exposure in rats. *Proceedings of the National Academy of Science*. 107: 448-453. 2010.
- CALDWELL, H. K.; ALBERS H. K. Effect of photoperiod 795 on vasopressin-induced aggression in Syrian hamsters. *Hormones and behavior*. 46: 444-9. 2004.
- CARR, G.L.; BANTIGNIES J.L.; FUCHS, G.; WILLIMS, G.P.; LUTZ, D.; MARULL, S. Organic reagent interaction with hair spatially characterized by infrared microspectroscopy using synchrotron radiation. *International Journal of Cosmetic Science*. 20: 381-94. 1998.
- CHERRY, N.; LABRECHE F.; COLLINS, J.; TULANDI, T. Occupational exposure to solvents and male infertility. *Occupational and Environmental Medicine*. 58: 635–640. 2001.
- CHORILLI, M.; MICHELN, D.C.; SALGADO, H.RN. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*. 28:11-23, 2007.
- DAHLMAN-WRIGHT, K.; CAVAILLES, V.; FUQUA, S.A.; JORDAN, V.C.; KATZENELLENBOGEN, J.A.; KORACH, K.S.; MAGGI, A.; MURAMATSU, M.; PARKER, M.G.; GUSTAFSSON, J.A. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological Reviews*. 58: 773-81. 2006.
- DARBRE, P. D.; HARVEY, P. W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*. 28: 561–578. 2008.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E.; BOURGUIGNON, J.P.; GIUDICE, L.C.; HAUSER, R.; PRINS, G.S.; SOTO, A.M.; ZOELLER, R.T.; GORE, A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*. 30:293–342. 2009.
- DELCLOS, K.B.; CAMACHO, L.; LEWIS, S.M.; VANLANDINGHAM, M.M.; LATENDRESSE, J.R.; OLSON, G.R.; DAVIS, K.J.; PATTON, R.E.; GAMBOA DA COSTA, G.; WOODLING, K.A.; BRYANT, M.S.; CHIDAMBARAM, M.; TRBOJEVICH, R.; JULIAR, B.E.; FELTON, R.P.; THORN, B.T. Toxicity evaluation of bisphenol A administered by gavage to

- Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90. *Toxicological Sciences*. 139: 174–197. 2014.
- DOHERTY, L. F.; BROMER, J. G.; ZHOU, Y.; ALDAD, T.S.; TAYLOR, H.S. In Utero Exposure to Diethylstilbestrol (DES) or Bisphenol-A (BPA) Increases EZH2 Expression in the Mammary Gland: An Epigenetic Mechanism Linking Endocrine Disruptors to Breast Cancer. *Hormones and Cancer*. 1: 146-155. 2010.
- DOI, A.M.; HILL, G; SEELY J.; HAILEY J. R; KISSLING G.; BUCHER R. J. 2u-Globulin Nephropathy and Renal Tumors in National Toxicology Program Studies. *Toxicology Pathology*. ; 4: 533–540. 2007.
- EL-DAKDOKY, M.H.; HELAL M.A. Reproductive toxicity of male mice after exposure to Nonylphenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79: 188-191. 2007.
- FIORINI, C.; TILLOY- ELLUL, A.; CHEVALIER, S. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*. 18: 413 -421. 2004.
- GAN, W.; ZHOU, M.; XIANG, Z.; HAN, X.; LI, D. Combined Effects of Nonylphenol and Bisphenol A on the Human Prostate Epithelial Cell Line RWPE-1. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12: 4141–4155. 2015
- GAYRARD V; MARLÈNE Z. LACROIX; SÉVERINE H. COLLET; CATHERINE VIGUIÉ; ALAIN BOUSQUET-MELOU; PIERRE -LOUIS TOUTAIN; NICOLE PICARD-HAGEN. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspectives*. 121:951–956. 2013.
- GUYTON, ARTHUR C.; HALL, JOHN E. Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology 11^a ed. (Philadelphia: Elsevier Saunders). ISBN 978 -1-4160-4574-8. 2009.
- GEENS, T.; GOEYENS, L.; COVACI, A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environment Health*. 214:339–47. 2011.
- GUENTHER, K.; HEINKE, V.; THIELE, B.; KLEIST, E.; PRAST, H.; RAECKER, T. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science Technology*. 36: 1676–1680. 2002.

- GYLLENHAMMAR, I.; GLYNN, A.; DARNERUD P.O.; LIGNELL, S.; DELF,R.V.; AUNE, M. 4 -Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. *Environmental International*. 43:21-28. 2012.
- 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*. 19: 215–221. 2004.
- HEINDEL, J.J.; NEWBOLD, R.; SCHUG, T.T. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 11: 653–661. 2015.
- HENRIQUES, D.M.; KUMMERER, K.; MAYER, F.M.; VASCONCELOS,T.G.; MARTINS, A.F. Nonylphenol polyethoxylate in hospital wastewater: a study of the subproducts of electrocoagulation. *Journal Environmental Science and Health*. 47: 497–505. 2012.
- HOWDESHELL, K.L.; HOTCHKISS A.K.; THAYER K.A.; VANDENBERG J.G.; SAAL, F.S.V. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*. 401: 763-4. 1999.
- HU, Y.; WANG, R.; XIANG, Z.; QIAN, W.; HAN X.; LI, D. Antagonistic effects of a mixture of low-dose nonylphenol and di-N-butyl phthalate (monobutyl phthalate) on the sertoli cells and serum reproductive hormones in prepubertal male rats in vitro and in vivo. *Public Library of Science*. 9:93425. 2014.
- HUFF, J. Carcinogenicity of bisphenol-A in Fischer rats and B6C3F1 mice. *Odontology*. 89:12-20, 2001.
- IMAFIDON, K.E.; OKUNROBO, L.O. Effects of some edible oils on renal function in rats. *Journal of Pharmacy & Bioresources*. 8: doi.org/10.4314/jpb.v8i2.5. 2011.
- JUNQUEIRA, L. C. *Histologia Básica*. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KATARIA ANGLINA; TRASANDE LEONARDO;TRACHTMAN HOWARD. The effects of environmental chemicals on renal function. *Nature Reviews Nephrology*.11: 610-625, 2015.
- KHAN, S.; BEIGH, S.; CHAUDHARI, B.P.; SHARMA, S.; ALIUL HASAN ABDI, S.; AHMAD, S.; AHMAD, F.; PARVEZ ,S.; RAISUDDIN, S. Mitochondrial

- dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environmental Toxicology*. doi: 10.1002/tox.22193. 2015.
- KELLY, EA.; OPANASHUK, LA; MAJEWSKA, AK. The effects of postnatal exposure to low-dose bisphenol-A on activity-dependent plasticity in the mouse sensory cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*. 22: 8 -117. 2014.
- KENDZIORSKI, J.A.; BELCHER, S.M. Effects of whole life exposure to Bisphenol A or 17 -ethinyl estradiol in uterus of nulligravida CD1 mice. *Data in Brief*. 5: 948-53. 2015.
- KÉRI, G.; TEJEDA, M.; GAÁL, D.; HULLÁN, L.; SCHWAB, R.; SZOKOLOCZI, O. Antitumor activity of the somatostatin structural derivative (TT-232), against mouse and human melanoma tumor models. *Anticancer Research*. 27: 4015-9. 2007.
- KIM, H.S.; SHIN, J.H.; MOON, H.J.; KANG, I.H.; KIM, T.S.; KIM, I.Y.; SEOK, J.H.; PYO, M.Y.; HAN, S.Y. Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. *Reproductive Toxicology*. 16: 259–268. 2002.
- KIM, Y.S.; KATASE, T.; SEKINE, S.; INOUE, T.; MAKINO, M; UCHIYAMA, T.;FUJIMOTO, Y.; YAMASHITA, N. Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*.54: 1127–1134. 2004.
- KIM, A.; JUNG, B.H; CADET, P. A novel pathway by which the environmental toxin 4-Nonylphenol may promote an inflammatory response in inflammatory bowel disease. *Medical Science Monitor Basic Research*. 20: 47-54. 2014.
- KIMURA, N.; KIMURA, T.; SUZUKI, M.; TOTSUKAWA, K. Effect of gestational exposure to nonylphenol on the development and fertility of mouse offspring. *Journal of Reproduction and Development*. 52: 789–795. 2006.
- KRAUGERUD, M.; DOUGHTY, R. W.; LYCHE, J. L.; BERG, V.; TREMOEN, N. H.; ALESTRØM, P.; ALEKSANDERSEN, M.; ROPSTAD, E. Natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs) suppress ovarian follicle development, liver vitellogenin immunostaining and hepatocyte proliferation in female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 15: 16–23. 2012.

- KRISHNAN, A.V.; STATHIS, P.; PERMUTH, S.F.; TOKES, L.; FELDMAN, D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 132: 2279-2286. 1993.
- LAZARI, M.F.; LUCAS T.F.; YASUHARA, F.; GOMES G.R.; SIU, E.R.; ROYER, C.; FERNADES, S.A.; PORTO, C.S. Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. 53:923-33. 2009.
- LING, W.; ENDO, T.; KUBO, K.; NAKAJIMA, K.; KAKEYAMA, M.; TOHYAMA, C. In Utero Bisphenol A Exposure Induces Abnormal Neuronal Migration in the Cerebral Cortex of Mice. *Frontiers in Endocrinology*. 7: 1 -6. 2016.
- LV, X.; XIAO, S.; ZHANG, G.; JIANG, P.; TANG, F. Occurrence and removal of phenolic endocrine disrupting chemicals in the water treatment processes. *Scientific Reports*. 6: 22860. 2016.
- MACON, M.B.; FENTON, S.E. Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia*. 18: 43–61.2013.
- MAJDIC, G.; TOBET, S. Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 32: 137–145. 2011.
- MARCHESI F.; MONESTIROLI S. V.; CAPILLO M.; GOBBI A.; MINUCCI S.; PELICCI P. G. Scanziani¹ E. Eosinophilic Crystals as a Distinctive Morphologic Feature of a Hyaline Droplet Nephropathy in a Mouse Model of Acute Myelogenous Leukaemia. *Journal Veterinary Medicine*. 50:103-107. 2003.
- MARKEY, C.M.; LUQUE, E.H.; MUNOZ DE TORO, M.; SONNENSCHIN, C.; SOTO, A.M. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biology of Reproduction*. 65: 1215 -23. 2001.
- MELZER, D.; RICE, N.E.; LEWIS, C.; HENLEY, W.E.; GALLOWAY, T.S. Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS ONE*. 5: e8673. 2010.
- MELLO, K.F.S.; MENDONÇA, B. B.; BILLERBECKI, A.E.C.; ELAINE M.F. COSTAI, E.M.F.; LATRONICOLI, A.C.; ARNHOL, I.J.P. Androgen insensitivity syndrome: clinical, hormonal and molecular analysis of 33

cases. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 49: 87-97.2005.

MENDOZA-RODRÍGUEZ ,C.A.; GARCÍA-GUZMÁN, M.; BARANDA-AVILA, N., MORIMOTO, S.; PERROT -APPLANAT, M.; CERBÓN, M. Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reproductive Toxicology*. 31: 177-83. 2011.

MICHALOWICZ, J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37 738–758.2014.

MOON, H.J.; HAN, S.Y.; SHIN, J.H.; KANG, I.H.; KIM, T.S.; HONG, J.H.; KIM, S.H.; FENTON, S.E. Gestational exposure to nonylphenol causes precocious mammary gland development in female rat offspring. *Journal of Reproduction and Development*. 53: 333-344. 2007.

MORIYAMA, K.; TAGAMI, T.; AKAMIZU, T.; USUI, T.; SAIJO, M.; KANAMOTO, N.; HATAYA, Y. SHIMATSU, A.; KUZUYA, H.; NAKAO, K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* . 87: 5185–5190. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US). COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8^a Edição. Washington (DC): National Academies Press (US). 2011.

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*. 15: 293–315. 2001

NEWBOLD, R.R. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicology and Applied Pharmacology*.199:142–150. 2004. O'CONNELL,

L. A.; HOFMAN, H. A. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*. 519:3599-639, 2011.

ODUM, J.; LEFEVRE, P.A.; TITENSOR, S.; PATON, D.; ROUTHEDGE, E.J; BERERSFORD, N.A; SUMPTER,J.P.; ASHBY, J. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and

- comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology Pharmacology*. 25: 176–188.1997.
- OLEA-HERRERO, N.; ARENAS, M.; MUÑOZ-MORENO, C.; MORENO-GÓMEZ-TOLEDANO, R.; GONZÁLEZ-SANTANDER, M.; ARRIBAS, I.; BOSCH, R.J. Bisphenol-A induces podocytopathy with proteinuria in mice. *Journal of Cellular Physiology*. 229: 2057–2066. 2014.
- OHLSTEIN, J.F.; STRONG, A.L.; MCLACHLAN, J.A.; GIMBLE, J.M.; BUROW, M.E.; BUNNELL, B.A. Bisphenol A enhances adipogenic differentiation of human adipose stromal/stem cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 53:345 -353. 2014.
- OSTERLUND, M. K.; HURD Y. L. Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders. *Progress in Neurobiology*. 64: 3251–267. 2001.
- PETRO, E. M.L.; LEROY, J.L.; COVACI, A.; FRANSEN, E.; DE NEUBOURG, D.; DIRTU, A.C.; DE PAUW, I.; BOLS, P.E. Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair in vitro oocyte developmental competence. *Human Reproduction*. 27: 1025–1033. 2012.
- ROCHESTER, R. JOHANNA, Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*. 42: 132-155. 2013.
- ROGERS, J.A.; METZ, L.; YONG, V.W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol -A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology*. 53: 421–430. 2013.
- ROPERO, A.B.; ALONSO-MAGDALENA, P.; GARCIA-GARCIA, E.; RIPOLL, C.; FUENTES, E.; NADAL, A. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *International Journal of Andrology* 31: 194–199. 2008.
- RUBIN, B.S.; MURRAY, M.K.; DAMASSA, D.A.; KING, J.C.; SOTO, A.M. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental Health Perspectives*. 109: 675-680. 2001.
- SCHONFELDER, G.; WITTFOHT, W.; HOPP, H.; TALSNESS, C.E.; PAUL, M.; CHAHOUD, I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal– fetal–placental unit. *Environmental Health Perspectives*. 110:703-707. 2002.

- SHAO W, BROWN, M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Research*. 6:39-59. 2003.
- SIMPSON ER. Sources of estrogen and their importance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 86: 225–230. 2003.
- 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*. 34: 1033–1049. 2008.
- SONG, H.; ZHANG, T.; YANG, P. LI, M.; YANG, Y.; WANG, Y.; DU, J.; PAN, K.; ZHANG, K. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR signals. *Toxicology in Vitro*. 30: 521– 528. 2015.
- SOTO, A.M.; BRISKEN, C.; SCHAEBERLE, C.; SONNENSCHNEIN, C. Does cancer start in the womb? altered mammary gland development and predisposition to breast cancer due to in utero exposure to endocrine disruptors. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 18:199-208. 2013.
- SOUSA, L.M.F. Efeitos do Disruptor Endócrino Bisfenol A na Imunidade Inata. Tese apresentada á Universidade Beira Interior para obtenção do titulo de Mestre em Medicina. 2015.
- SOTO, A.M.; JUSTICIA, H.; WRAY, J.W.; SONNENSCHNEIN, C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives*. 124: 1972 -2016. 1991.
- STONE, L.C.; MCCRACKEN, M.S.; KANERVA, R.L.; ALDEN, C.L. Development of a short-term model of decalin inhalation nephrotoxicity in the male rat. *Food Chemistry Toxicological*. 1: 35-41.1987.
- STEINMETZ, R.; BROWN, N.G.; ALLEN, D.L.; BIGSBY, R.M.; BEN, J.N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 138: 1780-1786. 1997.
- SUGITA -KONISHI, Y.; SHIMURA, S.; NISHIKAWA, T.; SUNAGA, F.; NAITO, H.; SUZUKI ,Y. Effect of Bisphenol A on non -specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. *Toxicology Letters*. 136: 217-27. 2003.

- TABIRA, Y.; NAKAI, M.; ASAI, D.; YAKABE, Y.; TAHARA, Y.; SHINMYOZU, T.; NOGUCHI, M.; TAKATSUKI, M.; SHIMOHIGASHI, Y. Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *European Journal Biochemistry*.262: 240–245. 1999.
- THOMAS, P.; PANG, Y.; FILARDO, E.J.; DONG, J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 146: 624-632. 2005.
- TOYAMA, Y.; SUZUKI, T.F.; MAEKAWA, M.; ITO, C.; TOSHIMORI, K. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Archives of Histology and Cytology*. 67: 373-381. 2004.
- VANDENBERG, L.N.; MAFFINI, M.V.; SCHAEBERLE, C.M.; UCCI, A.A.; SONNENSCHNEIN, C.; RUBIN, B.S.; SOTO, A.M. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reproductive toxicology*. 26: 210-219. 2008.
- VETILLARD, A.; BAILHACHE, T. Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon gonadotropin-releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicological Science*. 92:537-544. 2006.
- VILAHUR, N.; BUSTAMANTE, M.; BYUN, H.M.; FERNANDEZ, M.F.; SANTA MARINA, L.; BASTERRECHEA, M.; BALLESTER, F.; MURCIA, M.; TARDÓN, A.; FERNÁNDEZ-SOMOANO, A.; ESTIVILL, X.; OLEA, N.; SUNYER, J.; BACCARELLI, A.A. Prenatal exposure to mixtures of xenoestrogens and repetitive element DNA methylation changes in human placenta. *Environmental International*. 71: 81–87. 2014.
- VINAS, R.; JENG, Y.J.; WATSON, C.S.; Non -genomic effects of xenoestrogen mixtures, *International Journal of Environmental Reseach and Public Health*. 2694–2714. 2012.
- VOLKEL, WOLFGANG; BITTNER, NATALY; DEKANT, WOLFGANG; Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Drug metabolism and disposition*. 33:11-1748-57. 2005.
- WARHURST, A.M. An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols. *Friends of the Earth, Edinburgh*.1994.

- WATANABE, H.; SUZUKI, A.; GOTO, M.; LUBAHN, D.B.; HANDA, H.; IGUCHI T. Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *Journal of Molecular Endocrinology*. 33: 243-252. 2004.
- WETHERILL, Y.B.; PETRE, C.E.; MONK, K.R.; PUGA, A.; KNUDSEN, K.E. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1: 515–524. 2002.
- WHITEHEAD, R.; GUAN, H.; ARANY, E.; CERNEA, M.; YANG, K. Prenatal exposure to bisphenol A alters mouse fetal pancreatic morphology and islet composition. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 25: 171-179. 2016.
- YARAK S, PARADA MOAB, BAGATIN E, TALARICO-FILHO S, HASSUN KM. Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 80: 395-410. 2005.
- YE, X.; KUKLENYIK, Z.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A. M. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 831: 110–115. 2006.
- YEN, C.H.; SUN, C.K.; LEU, S.; WALLACE, C.G.; LIN, Y.C.; CHANG. L.T.; CHEN, Y.L.; TSA, T.H.; KAO, Y.H.; SHAO, P.L.; HSIEH, C.Y.; CHEN, Y.T.; YIP, H.K.. Continuing Exposure to Low-Dose Nonylphenol Aggravates Adenine-Induced Chronic Renal Dysfunction and Role of Rosuvastatin Therapy. *Journal of Translational Medicine*. 10:147. 2012.
- YILDIZ, N.; BARLAS, N. Hepatic and renal functions in growing male rats after bisphenol A and octylphenol exposure. *Human Experimental Toxicology*. 32:675-686. 2013.
- ZHANG, J.; YANG, M.; ZHANG, Y.; CHEN, M. Biotransformation of nonylphenol ethoxylates during sewage treatment under anaerobic and aerobic conditions. *Journal of Environmental Sciences*. 20: 135–41. 2008.
- ZOELLER, R.T.; BROWN, T.R.; DOAN, L.L.; GORE, A.C.; SKAKKEBAEK, N.E.; SOTO, A.M.; WOODRUFF, T.J.; VOM, S.F.S. Endocrine-disrupting

Referências Bibliográficas

**chemicals and public health protection: a statement of principles
from the endocrine society. *Endocrinology*. 153: 4097–4110. 2012.**

Colocar Documento do Comitê de etica