



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – FS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAROLINA MARTINS RIBEIRO

EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E
HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS E MACHOS

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorim
Amato

Coorientadora: Profa. Dra. Michella Soares
Coêlho Araújo

BRASÍLIA

2019

CAROLINA MARTINS RIBEIRO

EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E
HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS E MACHOS

Projeto de doutorado submetido ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato

Coorientadora: Profa. Dra. Michella Soares Coêlho Araújo

Brasília

2019

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

Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM386e Martins Ribeiro, Carolina
EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE
E HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS E
MACHOS / Carolina Martins Ribeiro; orientador Angélica
Amorim Amato; co-orientador Michella Soares Coêlho Araújo.
- Brasília, 2019.
101 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade de Brasília, 2019.

1. Nonilfenol. 2. Desreguladores Endócrinos. 3.
Adipogênese. 4. Obesidade. I. Amorim Amato, Angélica,
orient. II. Soares Coêlho Araújo, Michella, co-orient. III.
Título.

Carolina Martins Ribeiro

EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS E MACHOS

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

Aprovada em 31 de Outubro de 2019.

Banca Examinadora

Dra. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Carine Royer - Universidade de Brasília

Profa. Dra. Fernanda Cerqueira Barroso Oliveira – Uniceplac

Profa. Dra. Caroline Lourenço de Lima - Universidade de Brasília (Suplente)

Dedico esse trabalho a Deus, força invisível aos olhos, mas sempre presente em meu caminho. Aos meus pais, Eustáquio e Cândida, e à minha irmã, Juliana, por todo apoio, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me inspirar força e equilíbrio nos momentos em que precisei.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), por fornecer recursos financeiros para o desenvolvimento desse trabalho e das pesquisas em nosso país.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília e a todos os funcionários por todo o trabalho realizado durante esses quatro anos.

À minha orientadora e amiga, Angélica Amorim Amato. Não caberia palavras para agradecer por tudo e por tanto que fez por mim. Obrigada por todo conhecimento, dedicação e carinho dispensados a mim e aos meus colegas de grupo. Não teríamos exemplo melhor e orientadora melhor que você!

À minha coorientadora, Michella Soares Coêlho Araújo, pelos ensinamentos, dedicação, pelo carinho materno doado aos seus orientandos e por estar sempre disposta a nos ajudar.

À minha família, meus pais, Eustáquio e Cândida, e minha irmã, Juliana, minha fonte de energia, segurança e meu refúgio. Agradeço por sempre me incentivarem e não medirem esforços para que tudo fosse possível. Amo vocês! Agradeço também ao meu cunhado Joaquim e minha prima Daniela por sempre se fazer presente e me apoiar. Aos meus avós, pelas orações e carinho, e aos meus primos e tios pelo apoio. Obrigada!

Ao Laboratório de Farmacologia Molecular (meu querido FarMol) que tanto me ensinou profissionalmente e contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal, me preparou e transformou em quem eu sou hoje. Agradeço imensamente a todos os professores que fazem parte desse laboratório, que se esforçam e dedicam diariamente para realizar esse trabalho tão grandioso que é a pesquisa. Meus agradecimentos aos professores Francisco, Simeoni, Guilherme, Angélica, Adriana, Fátima, Carine, Djane, Ingrid, Marie e Marília. Além de dividirem conhecimentos, dividiram suas experiências de vida e tempo.

Aos técnicos do FarMol, Rilva, Luciano e Letícia, e aos estagiários, por toda a ajuda na realização desse trabalho. À Glorinha, pela ajuda com a histologia.

À Professora Patrícia Medeiros por me apresentar a Universidade de Brasília e abrir portas na minha vida acadêmica.

As minhas amigas e colegas de grupo de pesquisa, as “Angelicats”, Fernadinha, Bruna, Nady, Louise e Paula somos exemplos de união e cooperação. Sempre mostramos que nunca estamos sozinhas, temos sempre umas às outras. Juntas dividimos conhecimentos, alegrias, tristezas, desabafos, que nos mostraram o quão forte somos. Vocês são muito especiais! Muito obrigada por tudo! E ao Jorge, que chegou depois, agradeço por toda a ajuda e contribuição.

Aos Pibics, Aninha, Malu, Pedro e Pedro Henrique, que mesmo nas semanas de prova se dedicaram ao trabalho sem medir esforços. Vocês foram essenciais!

Aos amigos e colegas que o FarMol me deu: Sidney, Cinthia, Dani, Rafa, Isa, Henrique, Gleice, Natália M., Kaian, Luís, Simone, Mariella, Laíza, Palloma, Paloma, Amandda, Marielly, Luma, Natália, Daniel, Anna Paula, Raíza, Ariane, Camyla, Bel, Carol, Délia, Hanna, Luciana, Mateus, Sarah, Cibele, Camila, Karla, Adria, Pedro, Flora, Manuel, Olívia, Bia, Jamison, Ana Carolina, Karina, Alana, Kenzo, Michelly, Nara, Raquel e Paulo, os quais juntos compartilhamos de momentos bons e difíceis e formamos uma grande família. Alguns deles a amizade foi além das bancadas e se tornaram verdadeiros amigos, vizinhos e quase irmãos. Obrigada a todos por toda a ajuda! Lembrarei com carinho dos momentos na copa, da tradição do bolo e dos cafezinhos.

Aos veterinários Ana Luíza e Rafael, aos funcionários do CIEX e do biotério Aline, Dérisson, Wilson e Hércule, por toda a ajuda com os animais, vocês fizeram toda a diferença nesse processo. Aos camundongos, pequenos seres com uma missão tão linda com a ciência. Muito Obrigada!

A todos os membros do Laboratório do Professor Blumberg da Universidade da Califórnia em Irvine, Professor Bruce Blumberg, Raquel, Bassem, Riann, Segal, Maria e Linzi obrigada por todo ensinamento, paciência, por não medirem esforços em expandir o conhecimento, por serem tão hospitaleiros e por abrir portas para o FarMol. *Thank you so much for everything!*

Ao pessoal do Laboratório de Histopatologia Bucal, Professora Eliete, Professora Ana Carolina, Ana Elízia, Gabriel, Andreinha, Lídia e Isabela, sempre nos acolheram e nos ajudaram com o espaço físico e conhecimento.

À minha querida amiga de longa data Isabella, que sempre me apoiou e me deu força nos momentos em que mais precisei. As minhas amigas Natália, Larissa, Kátia e Clarissa que proporcionaram momentos de distração e risadas em meio as turbulências.

A todos que participaram diretamente e indiretamente desse trabalho meus sinceros agradecimentos.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.”

Marie Curie

RESUMO

O nonilfenol (NP) é um desregulador endócrino estrogênico usado em cosméticos, produtos plásticos, detergentes e embalagens de alimentos. Foi identificado como um obesogênico ambiental em cultura de células e na prole de machos e fêmeas que foram expostos no período perinatal ao NP. No entanto, o potencial obesogênico de exposição crônica ao NP fora do período de desenvolvimento embrionário não foi investigado. Dessa forma, investigamos os efeitos da exposição crônica ao NP sobre o peso corporal e adiposidade em camundongos C57BL/6 fêmeas e machos e em cultura de célula. Para isso os animais foram divididos em 6 grupos (n = 6) receberam dieta hiperlipídica e foram tratados com veículo (água potável) ou NP 0,5 mg/kg/d ou 2,5 mg/kg/d por 14 semanas em água potável. Peso, ganho de peso, consumo de dieta e água foram mensurados. A homeostase da glicose foi avaliada através da glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina. O HDL e TG plasmáticos e as enzimas hepáticas (ALT, AST, fosfatase alcalina e gama-GT) foram analisados. Foram analisadas a expressão gênica do *Esr1*, *Ppary*, *Fabpa*, *Adiponectina*, *Leptina* na massa dos dois depósitos de tecido adiposo branco e marrom interescapular. Investigamos o efeito do NP em cultura de células do estroma vascular do tecido adiposo branco de camundongos fêmeas e machos. Observamos que não houve diferença do peso corporal, ganho de peso e ingestão de energia em fêmeas e machos em resposta ao tratamento com NP. Em camundongos machos, o NP aumentou a expressão relativa do RNAm de *Adponectina* no tecido adiposo subcutâneo, aumentou o *Ppary*, *Fabpa* e diminuiu a *Leptina* no tecido adiposo visceral, e no tecido adiposo marrom aumentou o *Fabpa*, porém poucas alterações foram observadas nas fêmeas. Não houve alterações da tolerância à glicose ou sensibilidade à insulina. E não houve alterações do perfil lipídico e da concentração sérica de enzimas hepáticas. Em cultura de células primárias induzidas a se diferenciar em adipócitos na presença de NP, observamos aumento da expressão relativa do RNAm de *Fabpa* em fêmeas, com padrão não-monotônico de concentração-resposta. Nas células de machos, não foram observadas modificações da expressão de *Fabpa*. Assim, nossos dados indicam que a exposição prolongada de camundongos machos, porém não de fêmeas, ao NP afeta a expressão de *Esr1*, *Ppary*, *Fabpa*, *Adiponectina*, *Leptina*, no tecido adiposo. Porém sem repercussão sobre a massa corporal ou a homeostase à glicose, mesmo em cenário de dieta obesogênica. Esses achados sugerem que a exposição ao NP fora do período de desenvolvimento apresenta efeitos discretos sobre a biologia do tecido adiposo e que esses efeitos são sexualmente dimórficos.

Palavras-chave: Nonilfenol, Desreguladores Endócrinos, Adipogênese, Obesidade.

ABSTRACT

Nonylphenol (NP) is an estrogenic endocrine disruptor used in cosmetics, plastic products, detergents and food packaging. It was identified as an environmental obesogen in cell culture, and in male and female offspring that had perinatal exposure to different concentrations of NP. However, the obesogenic potential of concurrent exposure to NP outside the developmental period was not investigated. We investigated the effects of chronic exposure to NP on body weight in female and males C57BL/6 mice and in cell culture. The animals were randomly divided into six groups (n=6) were fed a high-fat diet and treated with vehicle (drinking water) or NP 0.5 mg/kg/d or 2.5 mg/kg/d for 14 weeks in drinking water. Weight, weight gain, food and water consumption were determined. Glucose homeostasis was assessed by fasting glucose levels, glucose tolerance test, insulin tolerance test. Serum HDL, TG and liver enzymes (ALT, AST, alkaline phosphatase and gamma-GT) were analyzed. Two different white adipose tissue visceral and subcutaneous and interscapular brown adipose tissue depots were excised for the analysis of *Esr1*, *Ppary*, *Fabpa*, *Adiponectin*, *Leptin*. The effect of NP on white adipose tissue vascular stromal cell culture of male and female mice was investigated. There was no difference in body weight, weight gain, and energy intake in female and male mice in response to NP treatment when compared with vehicle. In male mice, NP increased *Adiponectin* levels in subcutaneous adipose tissue, increased *Ppary*, *Fabpa* and decreased *Leptin* in visceral adipose tissue, and increased *Fabpa* in brown adipose tissue, but a little changes was seen in females. There were no changes in glucose tolerance or insulin sensitivity. And there were no changes lipid profile and serum concentrations of liver enzymes. In primary cell culture induced to differentiate into adipocytes in the presence of NP, increased *Fabpa* levels in females, with a non-monotonic concentration-response pattern. In male cells, no modifications of *Fabpa* expression were observed. Thus, our data indicate that prolonged exposure of male but not female mice to NP affects the expression of *Esr1*, *Ppary*, *Fabpa*, *Adiponectin*, *Leptin* in adipose tissue. However, without repercussions on body mass or glucose homeostasis, even in diet-induced obesity. These findings suggest that exposure to NP outside the developmental period has discrete effects on adipose tissue biology and that these effects in a sexual dimorphic pattern.

Keywords: Nonylphenol, Endocrine Disruptors, Adipogenesis, Obesity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismo pelo qual a obesidade leva ao desenvolvimento da resistência à insulina e síndrome metabólica.....	26
Figura 2	Fontes, vias de exposição, alvos metabólicos e efeitos fisiopatológicos dos desreguladores endócrinos (DE).....	33
Figura 3	Estrutura química do 17 β -estradiol (A) e do nonilfenol (B).....	35
Figura 4	Desenho experimental do estudo <i>in vivo</i>	40
Figura 5	Desenho experimental do ensaio de adipogênese com células mesenquimais derivadas dos tecidos adiposos brancos epididimal ou perigonadal e inguinal dos camundongos C57BL/6 fêmeas e machos.....	47
Figura 6	O NP não modifica a massa corporal de camundongos C57BL/6 fêmeas e machos alimentados com dieta hiperlipídica.....	53
Figura 7	Ganho de massa corporal de camundongos tratados com NP.....	53
Figura 8	O tratamento de camundongos fêmeas e machos com NP entre a 6 ^a e a 20 ^a semanas de vida não modificou a ingestão de dieta hiperlipídica.....	54
Figura 9	Os camundongos fêmeas e machos que receberam NP nas doses 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d ingeriram significativamente mais água quando comparados aos animais que receberam somente água filtrada (veículo).....	54
Figura 10	O tratamento de camundongos machos e fêmeas com NP a partir da 6 ^a semana de vida não modifica a tolerância à glicose na 17 ^a semana de vida.....	55
Figura 11	O TTI (Teste de tolerância a insulina): Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de insulina (1 UI/kg) em camundongos C57BL/6 fêmeas e machos.....	56
Figura 12	O NP não modifica a glicemia de jejum de camundongos C57BL/6 fêmeas e machos alimentados com dieta hiperlipídica.....	57

Figura 13	Efeito do NP sobre a concentração sérica das transaminases ALT e AST e das enzimas fosfatase alcalina e Gama-GT em camundongos C57BL/6 fêmeas.....	58
Figura 14	Efeito do NP sobre a concentração sérica das transaminases ALT e AST e das enzimas fosfatase alcalina e Gama-GT em camundongos C57BL/6 machos....	59
Figura 15	Efeito do NP sobre a concentração sérica de triglicérides e colesterol HDL em camundongos C57BL/6 fêmeas.....	60
Figura 16	Efeito do NP sobre a concentração sérica de triglicérides e colesterol HDL em camundongos C57BL/6 machos.....	60
Figura 17	Efeito do NP sobre a massa relativa dos depósitos dos tecidos adiposos visceral (perigonadal), subcutâneo (inguinal), marrom (interescapular) e o fígado de camundongos C57BL/6 fêmeas.....	61
Figura 18	Efeito do NP sobre a massa relativa dos depósitos dos tecidos adiposos visceral (epididimal), subcutâneo (inguinal), marrom (interescapular) e o fígado coletados de camundongos C57BL/6 machos.....	62
Figura 19	Características histológicas do tecido adiposo branco visceral (perigonadal ou epididimal) de camundongos fêmeas e machos.....	65
Figura 20	Características histológicas do tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) de camundongos fêmeas e machos.....	66
Figura 21	Características histológicas do tecido adiposo marrom (interescapular) de camundongos fêmeas e machos.....	67
Figura 22	Características histológicas do fígado de camundongos fêmeas e machos.....	68
Figura 23	Expressão relativa do RNAm da <i>Fabpa</i> nos tecidos adiposos visceral (perigonadal), subcutâneo (inguinal), marrom (interescapular) de camundongos C57BL/6 fêmeas.....	71
Figura 24	Expressão relativa do RNAm da <i>Fabpa</i> nos tecidos adiposos visceral (epididimal), subcutâneo (inguinal), marrom (interescapular) de camundongos C57BL/6 machos.....	72

Figura 25	Expressão relativa de <i>Fabpa</i> em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo subcutâneo de camundongos fêmeas induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias.....	73
Figura 26	Expressão relativa de <i>Fabpa</i> em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo visceral de camundongos fêmeas induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias.....	74
Figura 27	Expressão relativa de <i>Fabpa</i> em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo visceral de camundongos machos induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias.....	74
Figura 28	Expressão relativa de <i>Fabpa</i> em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo visceral de camundongos machos induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Desreguladores endócrinos com efeito obesogênico descrito.....	29
Tabela 2	Efeito adipogênico do nonilfenol descrito.....	37
Tabela 3 -	Descrição dos componentes da dieta hiperlipídica.....	39
Tabela 4 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.....	50
Tabela 5 -	Massa absoluta e relativa à massa corporal dos tecidos adiposos branco e marrom e do fígado, entre os camundongos que receberam veículo ou NP..	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADD	Fator de determinação e diferenciação de adipócitos 1
AGPAT2	sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase 2
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ANOVA	Análise de variância
aP2	Proteína Adipocitária 2
APE	Etoxilatos de Alquifenois, <i>Alkylphenol Ethoxylates</i>
AR	Receptor de androgênio
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BPA	Bisfenol A
C/EBP α , β e δ	Proteínas Ligadoras ao Amplificador CCAAT alfa, beta e delta
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Ct	Ciclo Limiar, <i>Cycle Threshold</i>
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE	Desreguladores Endócrinos
DEPC	Dietilpirocarbonato
DES	Dietilestilbestrol
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F – 12 Ham</i>

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Enzima desoxirribonuclease
DPN	Diarilpropionitrilo
EB	Benzoato de estradiol
EQ	<i>Equol</i>
ER	Receptor de Estrogênio; <i>Estrogen Receptor</i>
ESR2	Receptor de Estrogênio beta; <i>Estrogen Receptor beta</i>
ESR1	Receptor de Estrogênio alfa; <i>Estrogen Receptor alpha</i>
F0	Geração Filial
F1	Geração Filial 1 ou Primeira Geração
F2	Geração Filial 2 ou Segunda Geração
Fabpa	Ácidos Graxos Adipocitária
FM 550	<i>Firemaster</i>
FSHR	Receptor Hormônio Folículo Estimulante
Gama-GT	Gamaglutamiltransferase
Gapdh	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
GLUT4	Transportador de Glicose 4
HDL-c	Lipoproteína de Alta Densidade, <i>High Density Lipoprotein Cholesterol</i>
IBMX	Isometilbutilxantina
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade, <i>Low Density Lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteína Lipase
MCF7	Linhagem celular de câncer de mama, <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>

MEHP	Ácido monoetilhexilftálico
NOAEL	<i>No Observable Adverse Effects Level</i>)
NOEC	<i>No-Observed-Effect Concentration</i>
NP	Nonilfenol, <i>Nonylphenol</i>
NPE	Etoxilato de Nonilfenol
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBDE	Éter difenil polibromado
PBS	Tampão fosfato-salino, <i>Phosphate buffered saline</i>
PCB	Bifenilas Policloradas
PCB-126	3,3 ', 4,4', 5-pentaclorobifenilo
PCDD	Dibenzodioxina policlorada
PCDF	Dibenzofurano policlorado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
PPAR γ	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama
PPT	Propil pirazol
PR	Receptor de Progesterona
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RT	Transcrição Reversa
SNC	Sistema Nervoso Central
SREBP1	Proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1c
SVF	Fração Vascular Estromal - <i>Stromal Vascular Fraction</i>
TAB	Tecido Adiposo Branco

TAM	Tecido Adiposo Marrom
TBT	Tributilestanho
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
Tm	<i>Melting Temperature</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTG	Teste de Tolerância à Glicose
TTI	Teste de Tolerância a Insulina
Vigitel	Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

g/kg	Grama por quilograma
%	Porcentagem
%v/v	Porcentagem em volume
°C	grau Celsius
μL	Microlitro
g	Grama
H	Horas
kcal	Quilocalorias
kcal/g	Quilocalorias por grama
kg/m ³	Quilograma por metro cúbico
M	Molar
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/kg/dia	Miligrama por quilograma por dia
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/d	Mililitro por dia
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng/g	Nanograma por grama

nm	Nanômetro
x g	Unidade de medida para força centrífuga relativa
UI/kg	Unidade internacional por quilograma
µg/dia	Micrograma por dia
µg/kg	Micrograma por quilograma
µg/kg/d	Micrograma por quilograma por dia
µg/L	Micrograma por litro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1 OBESIDADE	22
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	27
1.3 NONILFENOL.....	33
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
3.2 MODELO ANIMAL E DIETA.....	39
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
3.4 GLICEMIA DE JEJUM, TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E TESTE DE.....	42
TOLERÂNCIA À INSULINA.....	42
3.5 EUTANÁSIA, COLETA DE SANGUE E RETIRADA DE AMOSTRAS TECIDUAIS	43
3.6 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	44
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	44
3.7.1 Fixação do tecido adiposo e hepático	44
3.7.2 Inclusão em parafina	45
3.7.3 Corte no micrótomo	45
3.7.4 Coloração com hematoxilina-eosina	45
3.8 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS	46
3.9 ENSAIO DE ADIPOGÊNESE.....	47
3.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	48
3.10.1 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra	49
3.10.2 Tratamento do RNA com enzima DNase	50
3.10.4 PCR quantitativa em tempo real	50
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4 RESULTADOS	53
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, INGESTÃO DE ENERGIA E INGESTÃO HÍDRICA	53
4.2 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A HOMEOSTASE DA GLICOSE.....	55
4.3 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TRANSAMINASES E SOBRE O PERFIL LIPÍDICO.....	58

4.4 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE OS DEPÓSITOS DE TECIDO ADIPOSEO E DO FÍGADO	62
4.4 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO TECIDO ADIPOSEO E DO FÍGADO	64
4.5 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A EXPRESSÃO DO mRNA DA FABP-A, PPAR γ , ADIPONECTINA, LEPTINA E ESR1 NOS TECIDOS ADIPOSOS E FÍGADO	70
4.6 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DO ESTROMA VASCULAR DO TECIDO ADIPOSEO	73
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO A.....	101

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 OBESIDADE

A obesidade atingiu proporções epidêmicas globais e pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado do excesso de peso ou obesidade (WHO, 2017). Os principais riscos provocados pela obesidade são doenças vasculares, diabetes, doenças renais e hepáticas, câncer e problemas respiratórios, podendo atingir pessoas de ambos os sexos e de idades diferentes (PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION, 2009). Anteriormente um problema limitado a países de alta renda, a obesidade agora também prevalece em países de baixa e média renda (WHO, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - OMS) define a obesidade e o sobrepeso como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que apresenta risco para a saúde. Em termos populacionais a obesidade é medida pelo índice de massa corporal (IMC), obtido por meio da divisão do peso (em quilogramas) pelo quadrado da altura (em metros). Um indivíduo com o IMC de 30 kg/m² ou mais é considerado como obeso e o IMC igual ou superior a 25 kg/m² é considerado como sobrepeso (WHO, 2019).

Em 2016, a estatística mundial era que mais de 1,9 bilhão de adultos apresentavam excesso de peso e mais de 650 milhões eram obesos. Sendo que 39% dos adultos estavam acima do peso e 13% eram obesos. Ainda no mesmo ano, 41 milhões de crianças menores de 5 anos estavam acima do peso ou obesas. E mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre 5 e 19 anos estavam acima do peso ou obesas (WHO, 2019).

No Brasil, os dados indicam o aumento da obesidade em 19,8% na população brasileira. Segundo a Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico - Vigitel do Ministério da Saúde (2018), houve aumento de 67,8% no número de obesos nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. O crescimento da obesidade foi maior entre os adultos de 25 a 34 anos e 35 a 44 anos, com 84,2% e 81,1%, respectivamente. As mulheres apresentaram índice de obesidade de 20,7% e os homens apresentaram 18,7%, ou seja, as mulheres apresentaram prevalência de obesidade maior que os homens. O excesso de peso foi mais prevalente nos homens, com aumento de 26,3% em dez anos, passando de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016. A obesidade cresceu 60% em dez anos, de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016.

No Brasil, em 2018, 55,7% da população brasileira estava com excesso de peso. Em 2006, a proporção de brasileiros com sobrepeso era de 42,6%. Esse aumento foi prevalente em adultos entre 18 e 24 anos, com 55,7%, sendo que os homens apresentaram aumento de 21,7% em relação às mulheres, com 40% (Ministério da Saúde, 2019).

A obesidade é um fenótipo altamente hereditário, visto que, em face a um ambiente altamente "obesogênico", algumas pessoas são suscetíveis a ela enquanto outras permanecem magras. É caracterizada como um estado no qual a quantidade total de triglicerídeos armazenada no tecido adiposo é aumentada anormalmente, resultado de um crônico desequilíbrio positivo entre consumo de energia e gasto energético (O'RAHILLY, 2009).

O desenvolvimento do tecido adiposo acontece por meio da adipogênese, que refere-se à diferenciação de um pré-adipócito em células maduras, variando de acordo com o sexo e a idade do indivíduo. Os adipócitos diferenciam-se a partir de células precursoras de origem mesenquimal. As mudanças morfológicas e funcionais, que ocorrem no decorrer da adipogênese correspondem a uma mudança na expressão e atividade de proteínas com atividade variada, resultará em um fenótipo final caracterizado por alterações na forma celular e acumulação de lipídios (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; SAELY, GEIGER e DREXEL, 2012; COELHO M, OLIVEIRA T, FERNANDES R et al., 2013). A depender da origem celular específica e dos fatores de transcrição envolvidos no processo de adipogênese, o adipócito pode ser caracterizado como branco, marrom ou bege (ROSEN, 2015; HEINDEL et al., 2017). Em conjunto com outros tipos celulares, o adipócito constitui o tecido adiposo.

Dessa forma, tem-se o tecido adiposo branco, que possui depósitos localizados nas áreas subcutânea e intra-abdominal (visceral), sendo depósitos metabolicamente diferentes (ROSEN, 2015; HEINDEL et al., 2017). O tecido adiposo visceral está relacionado ao desenvolvimento de doenças metabólicas, enquanto o subcutâneo pode proteger contra essas doenças (LAFONTAN e GIRARD, 2008; HEINDEL et al., 2017). Os adipócitos bege e o tecido adiposo marrom dissipam a energia química armazenada sob a forma de calor (ROSEN e SPIEGELMAN, 2014; KAJIMURA et al., 2015).

No tecido adiposo, os pré-adipócitos podem se diferenciar em adipócitos maduros ao longo da vida, permitindo a expansão hiperplástica do tecido adiposo em situações em que maior capacidade de armazenamento de lipídeos é necessária. Além disso, os adipócitos maduros podem expandir-se em tamanho para acomodar as maiores necessidades de armazenamento e, assim, tornar-se hipertróficos. Assim, o número de adipócitos e a morfologia

se modificam em resposta ao balanço energético através dos processos bioquímicos envolvidos na captação lipídica, esterificação de lipídeos, lipólise e diferenciação de pré-adipócitos (GRAY E VIDAL-PUIG, 2007; COELHO M, OLIVEIRA T, FERNANDES R et al., 2013).

A diferenciação adiposa, além de promover alterações coordenadas na morfologia celular, também promove alterações na sensibilidade hormonal e expressão gênica. Este processo de adipogênese é controlado pela interação de fatores de transcrição, como o receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ), expressão das proteínas ligadoras ao amplificador CCAAT (C/EBP) e fator de determinação e diferenciação de adipócitos 1 (ADD)/Proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1c (SREBP1). A diferenciação de adipócitos é caracterizada por uma mudança na expressão gênica entre os transcritos que determinam os estágios iniciais do processo de proliferação/diferenciação dos adipócitos àqueles transcritos que causam a maturação final dos adipócitos (RANGWALA e LAZAR, 2000; ROSEN et al., 2000; DUBOIS, 2006).

Assim, a indução adipogênica induz rapidamente a expressão das C/EBP β e C/EBP δ , que são os principais reguladores iniciais da adipogênese (WANG e SUL, 2009; LOWE, O'RAHILLY, ROCHFORD et al., 2011). Atuando ao lado de múltiplos co-ativadores, co-repressores e outros fatores de transcrição, eles desempenham um papel central na indução subsequente da expressão de PPAR γ e C/EBP α , fatores de transcrição que foram denominados como os principais reguladores da adipogênese (RANGWALA e LAZAR, 2000; ROSEN et al., 2000; SEMPLE, CHATTERJEE e O'RAHILLY, 2006; PAYNE et al., 2010). O PPAR γ e o C/EBP α induzem a expressão de genes envolvidos na sensibilidade à insulina, lipogênese e lipólise, incluindo aqueles que codificam o transportador de glicose GLUT4, proteína de ligação a ácidos graxos (FABPA, também conhecida como proteína adipocitária 2, aP2), lipoproteína lipase (LPL), sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase 2 (AGPAT2), perilipina e os fatores secretados adiponectina e leptina. Estudos revelaram que o PPAR γ e C/EBP α cooperam em vários locais de ligação em regiões promotoras, regulando juntos uma ampla gama de genes expressos em adipócitos em desenvolvimento e nos maduros (LEFTEROVA et al., 2008; NIELSEN et al., 2008; LOWE, O'RAHILLY, ROCHFORD et al.; 2011).

Além da capacidade de armazenamento, o tecido adiposo é cada vez mais reconhecido como um órgão endócrino ativo com produtos secretórios e parte do sistema imune inato (AHIMA E FLIER, 2000; RASOULI e KERN, 2009). Os produtos secretórios do tecido adiposo contribuem consideravelmente para a regulação do metabolismo e respostas

inflamatórias. A adiponectina é secretada abundantemente pelo tecido adiposo, o que está associado a uma condição metabólica favorável. Com a adiposidade, a secreção de adiponectina diminui significativamente, e múltiplos fatores derivados de adipócitos induzem ativação e infiltração de macrófagos em tecido adiposo. Os macrófagos ativados secretam citocinas, que podem contribuir para uma maior infiltração de macrófagos. A gordura inflamada na obesidade secreta uma série de proteínas implicadas no comprometimento da sinalização da insulina. Além disso, a gordura inflamada libera mais ácidos graxos livres que contribuem para a acumulação de gordura em locais ectópicos, incluindo fígado e músculo esquelético. O aumento de lipídios no fígado e no músculo esquelético tem sido associado à resistência à insulina e, como consequência, à síndrome metabólica (RASOULI e KERN, 2009) (Figura 1). A síndrome metabólica é uma condição complexa caracterizada por resistência à insulina, obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e hiperglicemia, sendo um fator de risco para doença cardiovascular, diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral, doença renal crônica e câncer (GRUNDY et al., 2004; ALBERTI et al., 2009; HEINDEL et al., 2017).

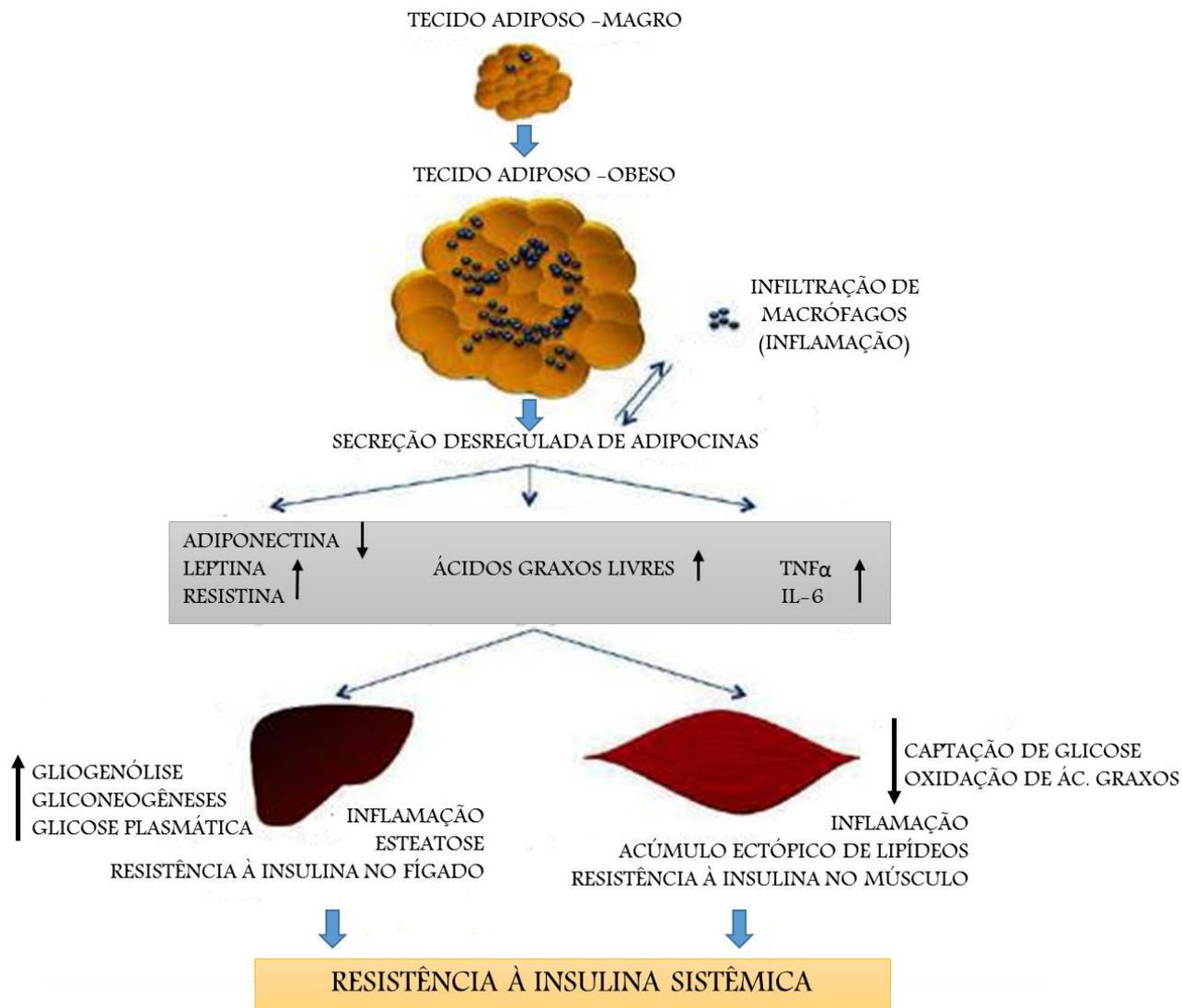


Figura 1 – Mecanismo pelo qual a obesidade leva ao desenvolvimento da resistência à insulina e síndrome metabólica. Adaptada de: COELHO, OLIVEIRA, FERNANDES et al., 2013.

Embora a interação entre fatores genéticos, alimentação e outros fatores comportamentais incluindo estresse, falta de sono, infecção por adenovírus, uso de antibióticos durante a infância (CASALS-CASAS e DESVERGNE, 2011; VOSS, ATKINSON e DHURANDHAR, 2015; PRINCIPI e ESPOSITO, 2016; HEINDEL et al., 2017) sejam considerados importantes fatores causais da obesidade e suas complicações, ainda é difícil compreender como eles poderiam produzir muitas dessas disfunções metabólicas. Recentemente, o papel do ambiente tem sido foco de grande atenção, na medida em que se observa que a concentração de determinadas substâncias sintéticas no ambiente coincidiu com o aumento da incidência da obesidade. Estas substâncias têm sido implicadas no comprometimento de muitos dos mecanismos envolvidos no controle do peso (BAILLIE-HAMILTON, 2002; HEINDEL et al., 2017) e conhecidas como desreguladoras do sistema endócrino.

1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

O balanço energético é determinado pela ingestão calórica e pelo gasto de energia. Sendo a obesidade resultante de balanço energético cronicamente positivo, os diversos fatores envolvidos na regulação da ingestão de alimentos e no gasto energético são implicados no desenvolvimento da obesidade. Ao longo dos últimos anos, vem se reconhecendo o papel dos poluentes químicos na etiologia das doenças metabólicas (NADAL et al., 2017). Os desreguladores endócrinos (DE) são poluentes ambientais definidos como uma substância exógena ou uma mistura de substâncias que altera a função do sistema endócrino e, conseqüentemente, gera efeitos adversos para a saúde de um organismo intacto, de seus descendentes ou (sub) populações (WHO/UNEP, 2012).

Eles contribuem para o aparecimento da síndrome metabólica através de processos inflamatórios via citocinas/adipocinas, causando desequilíbrio metabólico e gerando efeitos sobre a saúde. A síndrome metabólica refere-se à obesidade central (abdominal), a resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia caracterizada por elevação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, aumento de triglicerídeos e redução dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), pressão arterial elevada, disfunção endotelial e aterogênese (CIAIS E BAILLY et al., 2012; PETRAKIS et al., 2017).

Em geral, os DE podem agir imitando completa ou parcialmente os hormônios que ocorrem naturalmente no corpo, como os estrogênios, os andrógenos e os hormônios da tireoide, podendo determinar ativação suprafisiológica da sinalização hormonal. Eles também podem se ligar a um receptor e antagonizar a ação do hormônio endógeno. Conseqüentemente, a sinalização hormonal fisiológica falha. Os DE podem, ainda, interferir ou bloquear o modo como os hormônios naturais ou seus receptores são produzidos ou controlados (NIH, 2019).

Diversos DE são descritos como tendo potencial obesogênico (Tabela 1). Os compostos químicos obesogênicos causam ganho de peso alterando a homeostase lipídica para promover a adipogênese e o acúmulo de lipídios. A ação obesogênica ocorre por mecanismos como aumento do número de adipócitos, aumento do tamanho dos adipócitos ou alteração das vias endócrinas responsáveis pelo controle do desenvolvimento do tecido adiposo. Geralmente, as alterações precoces do desenvolvimento (durante a vida intrauterina ou início do período pós-natal) envolvem um aumento do número de adipócitos, enquanto alterações posteriores na vida adulta tendem a envolver principalmente um aumento no tamanho dos adipócitos (SPALDING

et al. 2008; DARBRE, 2017). Estudos sugerem que o número de adipócitos é estabelecido ao final da infância e que qualquer aumento do número de adipócitos no início da vida tende a ser permanente (SPALDING et al. 2008; DARBRE, 2017). Assim, quando tem-se exposição aos obesogênicos no início da vida as alterações seriam passadas para a idade adulta, o que não seria revertido (JANESICK e BLUMBERG, 2016; DARBRE, 2017).

Assim, a exposição pré-natal aos DE com potencial obesogênico pode predispor ao aumento da massa adiposa e excesso de peso. Estudos sugerem que esse tipo de exposição possa modificar o epigenoma de células estromais mesenquimais multipotentes, inclinando-as para a linhagem de adipócitos. Os seres humanos expostos aos DE durante o início da vida podem apresentar alteração das células tronco, que apresentariam programação para um destino adipogênico (JANESICK e BLUMBERG, 2011; KELISHADI, POURSAFA e JAMSHIDI, 2013).

Tabela 1 — Desreguladores endócrinos com efeito obesogênico descrito. Adaptado de: GORE et al.,2015

Desreguladores Endócrinos	Efeitos descritos
Dietilbestrol (DES)	Ganho de massa corporal e aumento dos depósitos de gordura Aumento das concentrações séricas de leptina, adiponectina, IL-6, insulina e triglicerídeos.
Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	Diminuição do gasto energético, aumento da massa gorda. Aumento da glicemia e intolerância à glicose
Bisfenol A (BPA), <i>Equol</i> (EQ), Benzoato de estradiol (EB), Diarilpropionitrilo (DPN), Propil pirazol (PPT)	Aumento da massa corporal
<i>Firemaster</i> (FM 550)	Aumento do T4 sérico Diminuição da atividade da carboxilesterase hepática Aumento do peso corporal
Ácido monoetilhexilftálico (MEHP)	Aumento da massa corporal e massa gordurosa Aumento da glicemia, colesterol, triglicerídeos Aumento da expressão de RNAm do gene adipogênico <i>Ppary</i>
3,3', 4,4', 5-pentaclorobifenilo (PCB-126)	Aumento da massa corporal
Tributilestanho (TBT)	Aumento da massa corporal e massa gorda Aumento da concentração plasmática de insulina, leptina, adiponectina e resistina Aumento do acúmulo de lipídeo no fígado
Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), Dibenzodioxina policlorada (PCDD), Dibenzofurano policlorado (PCDF), não-orto-PCB, PCB mono-orto-substituídos, pesticidas organoclorados	Aumento da gordura visceral, Esteatose hepática. Redução da sensibilidade à insulina

Outros mecanismos de interferência dos obesogênicos podem envolver a alteração dos hormônios que regulam o apetite, a saciedade e as preferências alimentares, alterando a taxa metabólica basal ou alterando o balanço energético para favorecer o armazenamento de calorias. Outros mecanismos possíveis são alterações na sensibilidade à insulina e metabolismo lipídico nos tecidos endócrinos, pâncreas, tecido adiposo, fígado, trato gastrointestinal, cérebro ou músculo (DARBRE, 2017).

Há ainda evidências de que os DE possam interferir na ingestão de nutrientes e no metabolismo, alterando o transporte intestinal, a secreção de peptídeos intestinais, a composição da microbiota intestinal e a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos que controlam a ingestão alimentar (NADAL et al., 2017). Também podem interferir no gasto energético através da sua ação na termogênese adaptativa, na termogênese induzida pela dieta e atividade física (NADAL et al., 2017).

Além de desordens metabólicas, os DE podem comprometer o desenvolvimento reprodutivo e a diferenciação sexual, como também o desenvolvimento embrionário precoce e a puberdade, devido aos seus efeitos sobre a ação de hormônios esteroides sexuais (CASALS-CASAS e DESVERGNE, 2011). Podem, também, levar ao aparecimento de alguns tipos de câncer hormônio-dependentes, como câncer de mama e próstata (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009).

Os DE apresentam características lipofílicas e muitos deles são compostos sintéticos estáveis que não se degradam prontamente e tendem a persistir no ambiente e se bioacumular, sendo denominados poluentes orgânicos persistentes (POP) (DARBRE, 2015; DARBRE, 2017). Os POP são conhecidos por acumularem na gordura corporal ao longo dos anos. Portanto, o vínculo da obesidade com as doenças pode ser devido à retenção de poluentes lipofílicos no maior volume de gordura dos indivíduos, e não apenas à deposição de gordura (DABRE, 2017). Segundo Dabre (2017) seria uma “espiral viciosa”, na qual os obesogênicos promovem o aumento da quantidade de gordura armazenada (pelo aumento do volume celular ou pelo número aumentado de células) havendo, conseqüentemente, maior retenção de obesogênicos lipofílicos. Isso, por conseguinte, levaria adiante uma espiral crescente de maior gordura corporal e ainda mais retenção de poluentes lipofílicos. Nesse sentido, os obesogênicos podem ser *self-fulfilling* e aumentar sua capacidade de retenção. A retenção das misturas dos poluentes químicos ambientais pode oferecer um potencial aditivo ou mecanismos

complementares que podem agravar os processos de doenças, como por exemplo o câncer (DABRE, 2017).

Os DE são comumente ativos em baixas concentrações e podem exercer mais de uma ação e interagir com múltiplos receptores hormonais simultaneamente. Outros podem trabalhar em conjunto para produzir efeitos aditivos ou sinérgicos, assim não sendo observados efeitos individuais (WHO/UNEP, 2012). Também são caracterizados por curvas dose-resposta não monotônicas, em que as estimativas de efeitos benéficos ou adversos não podem ser determinadas a partir da direção da inclinação da curva dose-resposta (VANDENBERG et al., 2012).

Os DE podem ser encontrados em muitos produtos que estão presentes no cotidiano da população, como garrafas plásticas, latas de metal, detergentes, retardadores de chamas, alimentos, brinquedos, cosméticos e pesticidas (NIH, 2019).

Existem duas classes de DE, os que são originados de fontes naturais e os de fontes antropogênicas. Entre os de origem natural, estão os fitoestrógenos presentes em grãos, alguns fungos, gramíneas, ervas, legumes e frutas e que se caracterizam por possuir potencial estrogênico mais fraco que os estrogênios endógenos. Aqueles de fontes antropogênicas são compostos orgânicos sintéticos produzidos a partir de carbono e outros elementos, como hidrogênio, nitrogênio e cloro, e que representam maiores riscos para a saúde humana (ELOBEID e ALLISON, 2008). Este é o caso do éter difenil polibromado (PBDE), dietilestilbestrol (DES), bisfenol A (BPA), pesticidas organofosforados (dicloro-difenil-tricloroetano, DDT), dioxinas, bifenilos policlorados (PCB), alguns organoclorados, retardadores de chama polibromados, perfluorados, ftalatos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, alquilfenóis, metais pesados, solventes e alguns produtos domésticos, como produtos de limpeza, purificadores de ar, tinturas de cabelo, cosméticos e protetores solares (ELOBEID; ALLISON, 2008; DE COSTER; VAN LAREBEKE, 2012).

Eles são amplamente dispersos no ambiente e, se persistentes, podem ser transportados a longas distâncias. Os POP são prevalentes entre os contaminantes ambientais por serem resistentes à degradação química, biológica ou fotolítica. Alguns podem ser armazenados no tecido adiposo de animais e ser bioacumulados, sendo denominados poluentes orgânicos persistentes. Outros, por sua vez, podem ser degradados rapidamente no ambiente ou no interior de animais e, assim, ser encontrados no ambiente apenas por curtos períodos de tempo. Podem

também apresentar sérios efeitos deletérios se a exposição ocorrer durante períodos críticos de desenvolvimento (CASALS-CASAS e DESVERGNE, 2011).

A exposição ambiental aos DE durante períodos críticos de desenvolvimento pode reprogramar as respostas fisiológicas, aumentando a susceptibilidade a doenças com o passar dos anos. Durante o desenvolvimento, a organogênese e a diferenciação dos tecidos ocorrem através de uma série contínua de eventos moleculares, bioquímicos e celulares rigorosamente regulados e precisamente cronometrados (GORE, HEINDEL, ZOELLER., 2006; PRUSINSKI, AL-HENDY e YANG et al., 2016).

Os seres humanos podem estar expostos aos produtos químicos desreguladores do sistema endócrino diariamente e durante todos os estágios da vida, desde a concepção e desenvolvimento fetal até a idade adulta e a senescência. Embora a puberdade e o período perimenopausa possam ser afetados pelos DE, os períodos pré-natal e o pós-natal precoce são mais suscetíveis à ação destes compostos, devido às mudanças rápidas que ocorrem durante estas etapas do desenvolvimento. A reprogramação do desenvolvimento tem como causa as alterações no epigenoma (GORE, HEINDEL, ZOELLER, 2006; PRUSINSKI, AL-HENDY e YANG, 2016). Este é o caso de alguns DE, como dietilestilbestrol (DES) e o bisfenol A (BPA), conhecidos como DE estrogênicos, por serem capazes de se ligar aos receptores de estrogênio (ER). Por este mecanismo, interferem no desenvolvimento celular normal nos tecidos alvo, como próstata e útero, resultando na malformação dos órgãos reprodutivos e posterior desenvolvimento de doenças (WALKER e HO, 2012; PRUSINSKI, AL-HENDY e YANG, 2016).

A exposição aos DE pelos humanos e animais pode ocorrer em casa ou no trabalho, através do ar e da ingestão de alimentos e água (Figura 2). Das centenas de milhares de produtos químicos fabricados, estima-se que cerca de 1000 podem ter atividade desreguladora endócrina. A medida de produtos químicos em fluidos corporais e tecidos (sangue, urina, placenta e sangue do cordão umbilical, tecido adiposo, entre outros) mostra que quase 100% dos humanos têm alguma carga corporal de DE (CASALS-CASAS e DESVERGNE, 2011; ENDOCRINOLOGY SOCIETY, 2014).

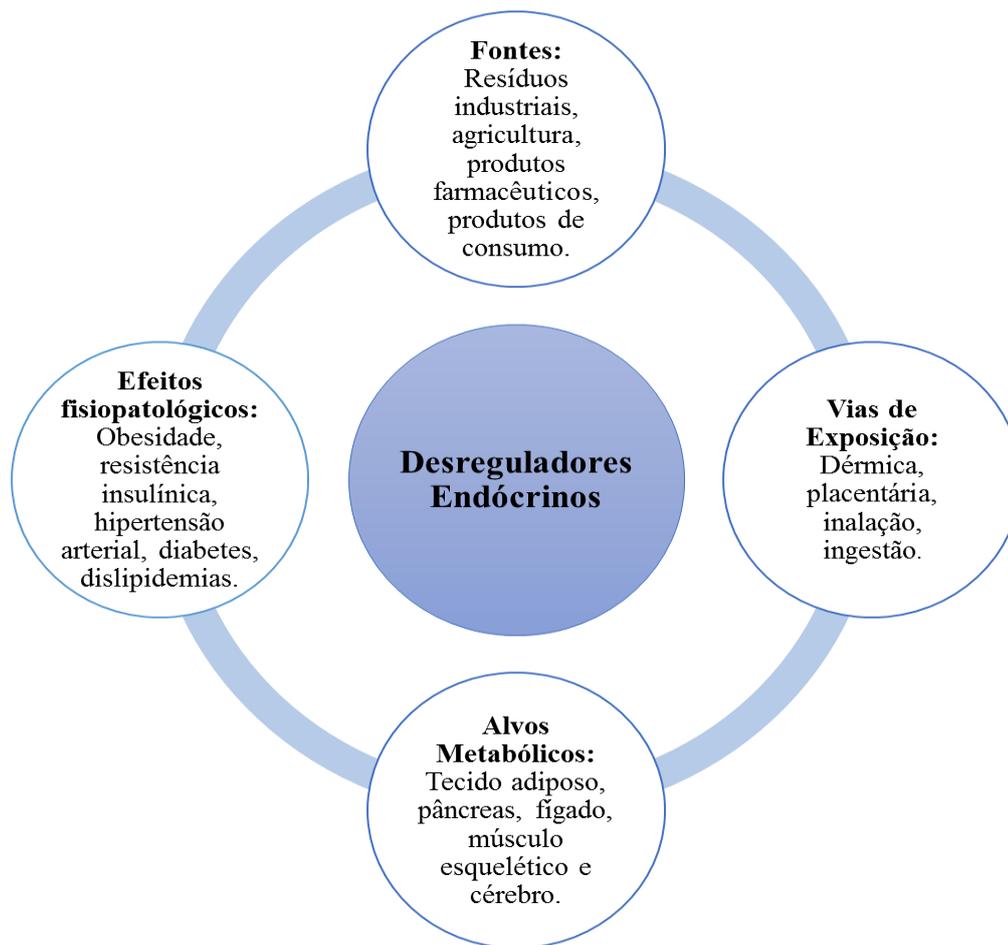


Figura 2 - Fontes, vias de exposição, alvos metabólicos e efeitos fisiopatológicos dos desreguladores endócrinos (DE). Adaptada de: NEEL; SARGIS (2011)

Dentre uma variedade de DE que pertencem a diferentes classes químicas, incluindo pesticidas, compostos utilizados na indústria plástica, produtos de consumo, subprodutos e poluentes industriais (CASALS-CASAS e DESVERGNE, 2011), tem-se o nonilfenol (NP), objeto do presente estudo.

1.3 NONILFENOL

O NP pertence à classe dos etoxilatos de alquilfenóis (*alkylphenol ethoxylates* - APE), sintetizados pela primeira vez em 1940 (MANZANO et al., 1998). São uma classe de tensoativos não iônicos amplamente usados na fabricação de detergentes, plásticos, tintas e cosméticos (NAYLOR et al, 1992; HAO et al., 2012). Em alguns lugares, o NP é utilizado como emulsionantes em muitos herbicidas e inseticidas pulverizados em plantações (MCKINLAY et al, 2008).

O NP é um produto da degradação microbiana do etoxilato de nonilfenol (NPE), o membro mais predominante dos tensoativos APE (NAYLOR et al, 1992; SOARES et al., 2008; HAO et al., 2012). Depois do seu uso, o NPE pode ser descartado em ambiente aquático, onde a cadeia de polietoxilato é quebrada durante o tratamento anaeróbico de águas residuais e, assim, o NPE é transformado em nonilfenol. O NP pode ser encontrado nas águas dos rios, na água para consumo, nos peixes, nos alimentos envolvidos por plásticos e em materiais de poliestireno (NIMROD e BENSON, 1992; MASUNO et al., 2003).

Por ser amplamente usado, o NP foi encontrado em amostras de tecido adiposo subcutâneo humano na população da Itália em quantidades variando entre 10-266 ng/g de tecido fresco (FERRARA et al. 2011). Também foi observada a presença de NP nos tecidos adiposos em mulheres do sul da Espanha (LOPEZ-ESPINOSA et al., 2009). Além do tecido adiposo, pesquisadores também encontraram NP em amostras de urina humana (XIAO et al., 2011).

A exposição humana ao NP é de difícil avaliação, podendo ocorrer após o contato com água potável e alimentos contaminados, como vegetais, leite, carne ou durante a exposição ocupacional (SOARES et al., 2008). Verificou-se que o NP estava presente em alimentos em concentrações variando de 0,1 a 19,4 µg/kg, em carnes, especificamente, em concentrações variando entre 0,50 e 0,67 mg/kg. Sua ingestão diária por adultos foi estimada em 7,5 µg/dia (RAMARATHNAM, RUBIN e DIOSADY, 1993; GUENTHER et al., 2002; SOARES et al., 2008).

Dados mostrados em diversos estudos indicam que o NP pode afetar a função de diferentes órgãos e sistemas. Estudos *in vivo* observaram efeitos adversos do NP no sistema nervoso central (SNC), incluindo alteração na homeostase neuroendócrina e na função cognitiva e neurotoxicidade na prole das ratas, principalmente quando a exposição ocorre durante a janela de desenvolvimento crítico do cérebro (JIE et al., 2016). Mostraram também que o NP pode causar alteração no sistema imunológico, no baço e timo de ratas que receberam o DE por via oral (XIA et al., 2013). Em outro estudo, foi observado alteração da função tireoidiana de animais expostos ao NP (XI et al., 2013).

Estudos observaram, ainda, a capacidade de o NP influenciar o sistema reprodutivo de machos, especificamente a expressão gênica das células de Sertoli (linhagem TM4), como o gene que codifica o receptor de estrogênio beta (ESR2), o receptor de progesterona (PR), o receptor de androgênio (AR) e o receptor hormônio folículo estimulante (FSHR) (LIU et al., 2014).

Um dos primeiros estudos que observou a atividade DE do NP foi realizado em 1991, por Soto e colaboradores. Os autores identificaram o NP em tubos de plástico usados em centrífuga de laboratório e observaram que ele induzia a proliferação celular e a expressão do receptor de progesterona em células tumorais de mama MCF7, sensíveis ao estrogênio. Neste mesmo estudo, observaram que o NP desencadeava atividade mitótica no endométrio de ratas (SOTO et al., 1991). Mais tarde, Lee e Lee (1996) mostraram a capacidade do NP em mimetizar o hormônio 17β -estradiol, competindo pelo sítio de ligação do receptor ao estrogênio, devido à semelhança entre suas estruturas químicas (Figura 3) (SOARES et al., 2008).

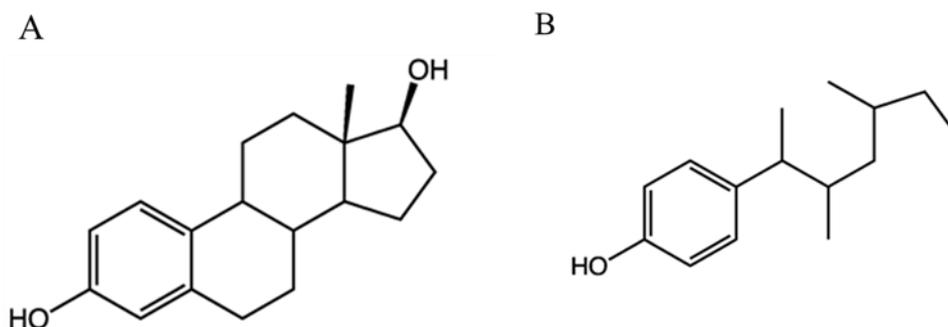


Figura 3 – Estrutura química do 17β -estradiol (A) e do nonilfenol (B). Fonte: Soares et al., 2008.

O 17β -estradiol atua através do receptor de estrogênio α (ESR1) diminuindo o número de adipócitos e a lipogênese (COOKE et al., 2001; VOM SAAL et al., 2012). Estudos mostraram que os estrógenos têm efeitos centrais no consumo de alimentos e no gasto de energia, que também contribuem para seus efeitos inibitórios gerais na deposição de células adiposas em adultos; esses efeitos ocorrem como resultado da interação entre hormônios como a leptina produzida pelos adipócitos com o estrogênio, e a interação entre esses hormônios também afeta os processos reprodutivos (GAO e HORVATH, 2008; VOM SAAL et al., 2012).

Dessa forma, o estrogênio e outros hormônios sexuais, além de estarem envolvidos com o sistema reprodutivo na fase adulta, regulam a função de outros tecidos. O aumento das concentrações plasmáticas de estrogênio está associado a uma redução na ingestão de alimentos e no peso corporal em adultos. E a perda da secreção de estrogênio ovariano relacionada à menopausa resulta em ganho de peso (GAO e HORVATH, 2008; VOM SAAL et al., 2012). Porém, estudos com DE estrogênicos têm mostrado potencial obesogênico *in vivo* e *in vitro*.

O NP é considerado o composto com mais efeito estrogênico da sua classe (KWACK et al; 2002). A capacidade de agentes estrogênicos, como o NP, de provocar alterações no sistema endócrino é medida através de estudos toxicológicos da concentração em que não é observado nenhum efeito (*No-Observed-Effect Concentration* - NOEC), concentração geralmente muito maior do que as encontradas no meio ambiente. Nesse estudo usamos doses superiores às que podem afetar o sistema endócrino. No entanto, isso não significa que o NP, nas concentrações observadas no ambiente, não apresente potencial de causar danos, uma vez que se deve levar em conta que no ambiente existe mais de um fator de estresse ou contaminante que pode afetar adversamente os organismos. Assim, o NP pode ter um efeito aditivo ou sinérgico a outros DE, visto que para exercer a atividade estrogênicas necessita de pequenas concentrações (RAJAPAKSE, SILVA e KORTENKAMP, 2002; SILVA, RAJAPAKSE e KORTENKAMP, 2002; SOARES et al., 2008).

Há evidências de que o NP possa estar envolvido nos processos de desregulação metabólica (YU et al., 2017). Ele se mostrou capaz de induzir hipoglicemia, hiperinsulinemia e estresse oxidativo no pâncreas de ratos adultos expostos por pequeno período de tempo (JUBENDRADASS et al., 2012). No fígado, foi observado a indução do estresse oxidativo e de danos hepáticos (KAZEMI et al., 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram potencial efeito adipogênico do NP (HAO et al., 2012) (Tabela 2). Hao e colaboradores observaram que a administração intraperitoneal de dose única de NP induziu a expressão de genes relacionados à adipogênese e lipogênese no tecido adiposo. Eles observaram, também, que a exposição perinatal a diferentes doses de NP resultou em aumento da massa corporal e adiposidade na prole do sexo feminino e masculino, sugerindo que a exposição perinatal ao NP pode aumentar a incidência de obesidade no período pós-natal (HAO et al., 2012).

Em um estudo recente realizado por Yang et al. (2017), foi observado que a exposição pré-natal ao NP aumentou significativamente a glicemia de jejum, indicando efeito multigeracional sobre o metabolismo da glicose em ratos machos. Zhang et al. (2014), por sua vez, observaram, em ratos *Wistar*, que os efeitos adversos da exposição ao NP no período perinatal são observados não apenas na primeira (F1) mas também na segunda geração (F2). Especificamente, o aumento da adiposidade foi observado em ratos não expostos diretamente ao NP, o que caracteriza seu efeito transgeracional.

Tabela 2 – Efeito adipogênico do nonilfenol descrito.

Estudos	Efeito adipogênico do NP
Masuno et al., 2003	Cultura de células de pré-adipócitos 3T3-L1: - Estimulou a proliferação dos adipócitos Inibiu a formação de adipócitos maduros
Hao et al., 2012	-Indução de adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 -Exposição perinatal poderia aumentar a incidência de obesidade na prole -Exposição aguda poderia aumentar a expressão de genes lipogênicos no tecido adiposo visceral e fígado
Zhang et al., 2014	-Estudo multigeracional poderia aumentar o peso corporal e alterar genes lipogênicos e adipogênicos nas gerações F1 e F2 de ratos (machos e fêmeas)
Chang et al. 2016	-Estudo multigeracional poderia aumentar a expressão de <i>Pparγ</i> no tecido adiposo da geração F1 dos animais

Até o momento, não foram encontrados, para nosso conhecimento, estudos que mostrassem o efeito da exposição crônica e direta do NP sobre tecido adiposo, ou seja, fora do contexto perinatal e transgeracional. Dessa forma, considerando-se a exposição humana significativa ao NP, a proposta deste projeto é de investigar os efeitos da exposição prolongada, desde idade precoce até a vida adulta em camundongos machos e fêmeas em um cenário que predispõe a obesidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do NP sobre a massa corporal, adiposidade e homeostase da glicose em camundongos C57BL/6 em um cenário obesogênico, bem como, avaliar o efeito adipogênico do NP em cultura primária de células estromais vasculares derivadas dos adipócitos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito da exposição ao NP, desde a puberdade até a vida adulta, em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, sobre os seguintes desfechos:

- Massa corporal, ingestão de energia e ingestão hídrica.
- Glicemia de jejum, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.
- Massa de diferentes depósitos de tecido adiposo (epididimal ou perigonadal e inguinal e marrom interescapular) e do fígado.
- Características histológicas dos diferentes depósitos de tecido adiposo (epididimal ou perigonadal, inguinal e marrom interescapular) e do fígado.
- Expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico como o gene da *Fabp-a*, *Ppary*, *Adiponectina*, *Leptina*, *Esr1* no tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco inguinal e epididimal ou perigonadal.

Investigar o efeito do NP sobre a diferenciação de células estromais vasculares derivadas do tecido adiposo branco inguinal e epididimal ou perigonadal de camundongos C57BL/6 fêmeas e machos através da expressão do gene da *Fabp-a*, um marcador de adipogênese.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido em camundongos e todos os procedimentos realizados seguiram as recomendações do Guia para Saúde e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (*National Institutes of Health's Guide for the Health and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, 2011*) e da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA 2013). O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, UnB-Doc 20581/2016 (ANEXO A).

3.2 MODELO ANIMAL E DIETA

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas e machos com 6 semanas de idade, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo. Após sua chegada ao biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, na 4ª semana de vida, os animais passaram por um período de adaptação ao novo ambiente antes do início do estudo.

Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas de plástico, em ambiente com temperatura média de 25°C e com ciclos claro-escuros fixos de 12/12 horas. Na 4ª semana de vida foram alimentados com dieta hiperlipídica (*Research Diets®*), fornecida na forma de *pellet*, cuja composição está descrita na Tabela 3. O fornecimento de dieta e de água potável (filtrada) foi *ad libitum*.

Tabela 3 – Descrição dos componentes da dieta hiperlipídica.

Produto D12492	g (%)	kcal (%)
Proteína	26,2	20
Carboidrato	26,3	20
Lipídeo	34,9	60
Total		100
kcal/g	5,24	

Ingrediente	g	Kcal
Caseína	200	800
L-cisteína	3	12
Amido de milho	0	0
Maltodextrina 10	125	500
Sacarose	68,8	275,2
Celulose BW200	50	0
Óleo de soja	25	225
Banha de porco	245	2205
Mistura mineral S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de cálcio	5,5	0
Citrato de Potássio	16,5	0
Mistura de Vitamina V10001	10	40
Bitrartato de Colina	2	0
FD&C Blue Dye #1	0,05	0
Total	773,85	4057

Fonte: <https://www.researchdiets.com/>

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Delineamento experimental *in vivo*

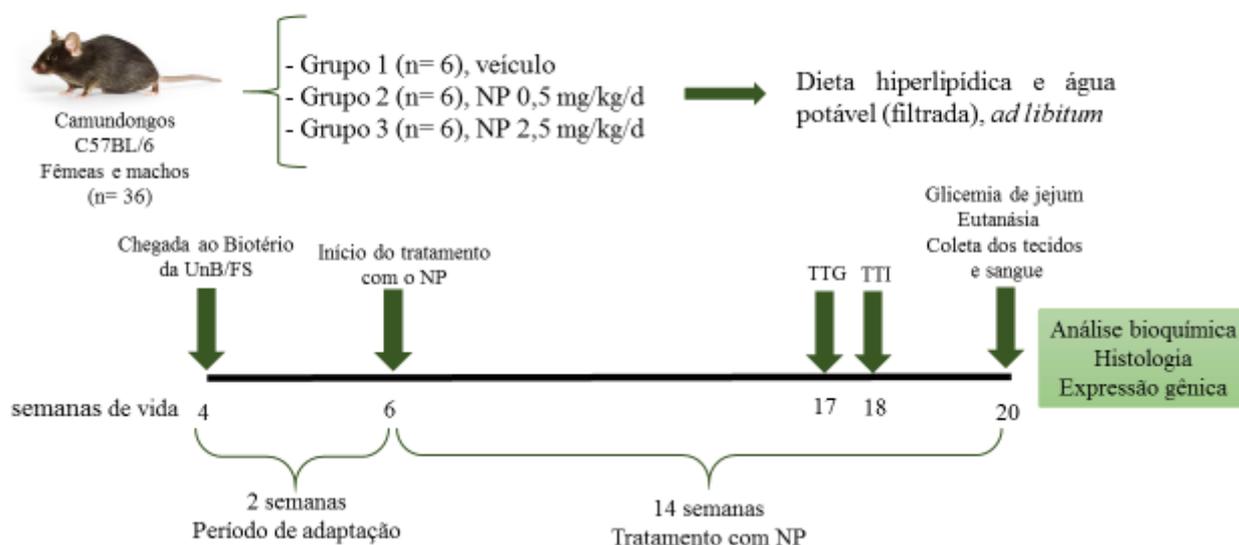


Figura 4 - Desenho experimental do estudo *in vivo*. NP: Nonilfenol, TTG: Teste de Tolerância à Glicose, TTI: Teste de Tolerância à Insulina.

Os experimentos com os camundongos fêmeas e machos foram realizados em momentos diferentes e com mesmo delineamento experimental (Figura 4) e tratamentos descritos abaixo. Foram utilizados 36 camundongos, sendo 18 camundongos fêmeas e 18 machos. Após sua chegada ao biotério, eles foram divididos aleatoriamente em três grupos cada um contendo 6 animais. Os grupos foram identificados da seguinte forma:

- **Grupo 1 (controle negativo):** camundongos fêmeas ou machos que receberam apenas água.
- **Grupo 2:** camundongos fêmeas ou machos que receberam NP na água de beber na dose de 0,5 mg/kg de peso corpóreo por dia, da 6^a até a 20^a semana de vida.
- **Grupo 3:** camundongos fêmeas ou machos que receberam NP na água de beber na dose de 2,5 mg/kg de peso corpóreo por dia, da 6^a até a 20^a semana de vida.

O NP foi obtido da empresa *Sigma-Aldrich*® e administrado na água de beber. A água de beber foi trocada duas vezes por semana e, para determinação da quantidade de NP a ser

adicionada à água, foram considerados (i) o peso do animal no dia da troca (em g) e (ii) a ingestão hídrica média diária calculada com os resultados de ingestão hídrica aferidos nos 7 dias anteriores ao dia da troca (em mL). Assim, obteve-se a quantidade de NP (em g) a ser adicionada à água. As doses de nonilfenol utilizadas, de 0,5 e 2,5 mg/kg/dia na água de beber, foram selecionadas com base em estudos anteriores realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol - UnB) e no nível de efeito adverso não observável (NOAEL - *No Observable Adverse Effects Level*), em que o cálculo oral de repetidas doses em humanos foi de 15 mg/kg/dia com base nos efeitos no sistema reprodutivo do DE em ratos (BONTJE et al, 2004). Assim, sabendo que os efeitos de baixas doses não podem ser preditos pelos efeitos observados em altas doses (GORE et al, 2015) foram selecionadas doses mais baixas que 15 mg/kg/dia com o objetivo de avaliar os efeitos metabólicos do NP, a saber 0,5 e 2,5 mg/kg/d. Para chegar às doses utilizadas, a concentração de NP na água foi de 2,09 – 16,32 µg/L. A Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* – EPA) recomenda, para manter a qualidade da água, concentrações de NP de 6,6 e 1,7 µg/L em água doce e água salgada, respectivamente (BROOKE e THURSBY, 2005, SOARES et al., 2008).

Entre a 6^a e a 20^a semanas de vida, a massa corporal (em gramas), a ingestão de dieta (em gramas) e a ingestão de água (em mL) foram avaliados duas vezes por semana. A partir dos dados obtidos, foram calculadas as seguintes variáveis:

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

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

Na 17^a semana, foi realizado o teste de tolerância à glicose em todos os animais, após jejum diurno de 6 horas, sem restrição de acesso à água. Foi coletada amostra de sangue da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero) e, em seguida, os animais receberam

solução de glicose, na dose de 1g/kg de massa corporal, por via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram então coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção de glicose e analisadas com tiras reativas em glicosímetro (*Accucheck Performa*, Roche).

Na 18ª semana, foi realizado o teste de tolerância à insulina em todos os animais, após jejum diurno de 4 horas, sem restrição de acesso à água. Foi coletada amostra de sangue da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero) e, em seguida, os animais receberam dose única de solução de insulina regular (*Lilly*), na dose de 1 UI/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram então coletadas após 15, 30, 45, 60 e 90 minutos da injeção de insulina e analisadas com tiras reativas em glicosímetro (*Accucheck Performa*, Roche).

Ao final do tratamento, na 20ª semana de vida, a glicemia de jejum foi aferida com a utilização de tiras reativas e glicosímetro (*Accucheck Performa*, Roche), no período da manhã, após jejum noturno de 12 horas, em amostra de sangue coletada da cauda do animal.

3.5 EUTANÁSIA, COLETA DE SANGUE E RETIRADA DE AMOSTRAS TECIDUAIS

Ao final do tratamento, na 20ª semana, os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes do CONCEA e do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida, foi usada uma guilhotina manual para a realização da eutanásia. O sangue do tronco foi coletado em tubo padrão e centrifugado (durante 15 minutos a 1792 x g, 4°C) e o soro armazenado a -80°C, para posterior mensuração da concentração de enzimas hepáticas e avaliação do perfil lipídico. Logo em seguida foram dissecados depósitos de tecido adiposo branco visceral (epididimal), branco subcutâneo (inguinal) e marrom (interescapular), além de amostras do fígado. Depois desse procedimento, suas massas foram aferidas e os fragmentos desses tecidos foram armazenados em paraformaldeído a 4% (para posterior análise histológica) ou a -80°C. A massa de cada depósito de tecido adiposo foi expressa em relação à massa corporal do animal, aferido no dia da eutanásia (mg de tecido/kg de massa corporal).

3.6 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

A concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, triglicerídeos e HDL colesterol (HDL-c) foi analisada por método enzimático utilizando kits de ensaio (GPT [ALT] UV AA líquida, GOT [AST] UV AA líquida, ALP 405 AA líquida, TG color GPO/PAP AA líquida, HDL Colesterol monofase AA *plus*, da *Wiener lab.*, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante, em analisador químico automático (CT600i, *Wiener*, Brasil).

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica, as amostras de tecidos (adiposo e hepático) fixadas em paraformaldeído (4%) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) foram desidratados em uma série de concentrações crescente de álcool etílico, diafanizado com xilol e incluído em parafina, com o auxílio do histotécnico Oma DM-40. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura, de forma seriada a cada 25 µm de profundidade, no micrótomo *Leica Biosystems*, modelo RM 2235 (*Leica Biosystems*, Alemanha). Os mesmos foram corados com hematoxilina-eosina para análise das amostras teciduais quanto à ocorrência de alterações morfológicas e classificação. As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópio de luz *Axioskop 2* e as imagens obtidas com o programa Zen lite 2011. Foram observadas um total de 144 amostras de todos os animais inclusos no experimento.

3.7.1 Fixação do tecido adiposo e hepático

Fragmentos de tecido adiposo e hepático foram imediatamente armazenados em tubos cônicos contendo solução fixadora (paraformaldeído 4% v/v, recém-preparada) por até 24 h. Em seguida, os fragmentos de tecido adiposo e hepático foram transferidos para outra solução fixadora, Bouin (75 mL de ácido pícrico, 25 mL de formol, 5 mL de ácido acético) por 4 h, lavados várias vezes em solução de álcool etílico 50% (v/v) e depois conservados em álcool etílico 70% (v/v) até o seu processamento.

3.7.2 Inclusão em parafina

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

3.7.3 Corte no micrótomo

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

3.7.4 Coloração com hematoxilina-eosina

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. Para a realização desta etapa, elas foram imersas em xilol (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico absoluto (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico a 95% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico a 80% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico a 75% (1 banho por 2 minutos), lavadas em água corrente, lavadas em água destilada por 3 minutos e imersas em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto (5 mg hematoxilina, 50 mL de álcool absoluto, 100 mg de alúmen de potássio, 2,5 g de óxido

vermelho de mercúrio, 1000 mL de água destilada). Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente até tirar o excesso de hematoxilina, imersas em ácido clorídrico (1 mL) e álcool a 70% (v/v) e novamente lavadas em água corrente.

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

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

3.8 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS

Os depósitos dos tecidos adiposos brancos epididimal (machos) ou perigonadal (fêmeas) e inguinal foram dissecados de camundongos fêmeas (*pool*, n = 10-8) e machos (*pool*, n= 10-8) com 5-7 semanas de vida, transferidos para tubos cônicos contendo PBS 1x. No fluxo laminar, os tecidos foram retirados do PBS 1x e colocados em placas de cultivo de células (KASVI®). Na placa, juntamente ao tecido foi adicionado meio de digestão contendo HEPES 100 mM e *collagenase* D (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) ou *collagenase* tipo IA (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich®), onde os tecidos foram fragmentados com ajuda de uma tesoura e, em seguida, transferidos para o tubo cônico. Os tubos cônicos foram incubados no *shaker* (Innova®44) à 37 °C por 40-90 minutos para realizar o processo de digestão dos tecidos. Após a incubação, foi adicionado meio de cultura DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F – 12 Ham*, Sigma-Aldrich®) sem fenol vermelho, com soro de bezerro a 10% com a finalidade de interromper a digestão dos tecidos. A mistura contendo o tecido digerido foi filtrada usando filtro (FALCON®) de 100 µm e transferida para outro tubo cônico e centrifugada à 189 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet*,

contendo as células do estroma vascular dos tecidos adiposos, foi ressuspenso em meio de cultura DMEM-F12 contendo 10% de soro de bezerro e transferido para a placa de cultura de células de 87,8 mm (KASVI®) e cultivadas à 37°C e 5% de CO₂.

3.9 ENSAIO DE ADIPOGÊNESE

A fração vascular estromal (*Stromal Vascular Fraction - SVF*) derivada do tecido adiposo contém populações de células heterogêneas, como células progenitoras/células-tronco mesenquimais, pré-adipócitos, células endoteliais, pericitos, células T e macrófagos M2. A morfologia das células SVF se assemelha à dos fibroblastos, e células SVF podem ser induzidas a se diferenciar em pré-adipócitos e tecido adiposo (HAN, et al. 2015).

Assim, quando tratadas com substâncias que iniciam a cascata transcricional envolvida na adipogênese, adotam o formato arredondado e iniciam acúmulo de lipídeos, que aparecem como gotículas intracelulares, um fenótipo compatível com o do adipócito diferenciado. As substâncias capazes de induzir a adipogênese são a isometilbutilxantina (IBMX, um inibidor de fosfodiesterase que aumenta a concentração intracelular de AMP cíclico), a dexametasona (um agonista do receptor de glicocorticoide) e a insulina.

Cada componente da combinação dexametasona, IBMX e insulina ativa vias celulares específicas, importantes para a diferenciação adipocitária, formando o coquetel adipogênico. A dexametasona ativa o fator de transcrição C/EBP β , e a IBMX inibe fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos, o que resulta em aumento dos níveis intracelulares de AMPc e ativação do fator de transcrição C/EBP δ . O C/EBP β e o C/EBP δ , por sua vez, induzem a transcrição do C/EBP α e do PPAR γ . A insulina contribui para a diferenciação de adipócitos por ativar a expressão de genes específicos desse tipo celular, como o que codifica a síntese de ácido graxo, a FABP-A, a leptina e a adiponectina (ROSEN et al., 2000). A mistura dexametasona, IBMX e insulina constitui um forte indutor de adipogênese contribuindo com a diferenciação adipocitária.

Em nosso estudo, as células SVF derivadas dos tecidos adiposos foram cultivadas em placas de 87,8 mm para cultura de células (KASVI®), em meio DMEM-F12 contendo soro de bezerro a 10%, até sua subconfluência. Depois disso, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços até sua confluência. Dois dias depois de observada a confluência, foram induzidas a se diferenciar em adipócitos. Foram induzidas a se diferenciar em adipócito, conforme protocolo

anteriormente descrito na literatura (Shoucri et al., 2017), em que as células SVF derivadas dos tecidos adiposos foram tratadas com 500 μM de IBMX, 5 $\mu\text{g/mL}$ de insulina e 1 μM de dexametasona durante 14 dias (Figura 5). Durante todo período, foram cultivadas em meio DMEM-F12 contendo soro fetal bovino a 10% e submetidas a tratamentos com veículo (DMSO, controle negativo), rosiglitazona (controle positivo) ou NP nas concentrações de 10^{-11} a 10^{-5} M, com intervalos de 10 vezes.

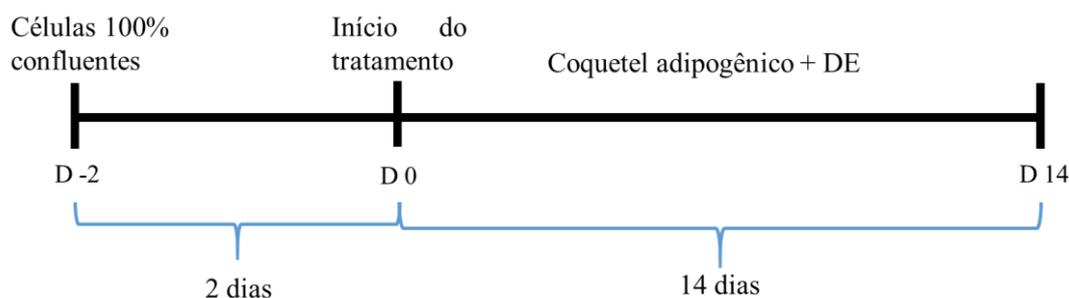


Figura 5 - Desenho experimental do ensaio de adipogênese com células SVF derivadas dos tecidos adiposos brancos epididimal ou perigonadal e inguinal dos camundongos C57BL/6 fêmeas e machos. D-2: dois dias anteriores ao início do tratamento; D0: dia em que se iniciou o tratamento; D14: catorze dias após o início do tratamento; DE: Desregulador Endócrino.

A adipogênese foi avaliada através do RNA total extraído para a quantificação expressão do gene que codifica a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária (FABP-A), um marcador de adipogênese, usando a técnica de PCR em tempo real.

Foram realizados 4 ensaios de diferenciação de adipócitos independentes com cada um dos dois tipos de depósitos de tecidos adiposos brancos epididimal ou perigonadal e inguinal dos camundongos C57BL/6 fêmeas e machos.

3.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA total foi extraído das amostras de cultura primária das células SVF derivadas dos tecidos adiposos tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona ou NP nas concentrações de 10^{-11} a 10^{-5} M ao final do ensaio de adipogênese. E também, das amostras de tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) e visceral (epididimal ou perigonadal) e marrom interescapular, e também de amostras de fígado. Para isso, amostras dos tecidos foram descongeladas e

imediatamente homogeneizadas em tubos cônicos de 15 mL com reagente Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*), na proporção de 0,1g de tecido por mL de Trizol, com a utilização de um homogeneizador de tecidos.

As amostras de tecido homogeneizado e da cultura de células foram então incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, centrifugadas a 21952 x g, durante 10 minutos, a 4°C, com formação de *pellet* de debris celulares. Nas amostras de tecido adiposo branco, ocorre a formação de fina camada de gordura na parte superior do tubo que foi descartada e as amostras centrifugadas novamente.

O sobrenadante foi então transferido para microtubos de 1,5 mL e o *pellet* descartado. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização. Os tubos foram agitados em vórtex durante 15 segundos, incubados a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados a 21952 x g, durante 15 minutos, a 4°C. Houve a formação de três fases, fase inferior de coloração vermelha, que contém o DNA; fase intermediária de coloração branca, contendo proteínas; e fase superior incolor, que contém o RNA. Apenas a fase superior (aquosa) que contém o RNA foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto (por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização). Os tubos foram agitados em vórtex, incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 21952 x g, durante 10 minutos, a 4°C, com formação de *pellet* de RNA. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9072 x g, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. O *pellet* foi então ressuspensionado em volumes de 20 a 50 µL de água deionizada tratada com dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC 0,1%) (*Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, EUA) e as amostras mantidas a -80°C até sua utilização.

3.10.1 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada no espectrofotômetro de microvolume *NanoDrop 2000/2000c* (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware USA), utilizando-se 1 µL da amostra.

A concentração de RNA total é fornecida automaticamente pelo equipamento em µg/µL, determinada pelo seguinte cálculo: (DO 260 nm x 40) / 1000, em que DO 260 representa o

valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento de onda 260 nm. O grau de pureza da amostra, também fornecido automaticamente pelo equipamento, é calculado pela razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Consideraram-se satisfatórias as amostras que com grau de pureza entre 1,7 e 2,0, visto que estes valores representam baixa contaminação com proteínas (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987).

3.10.2 Tratamento do RNA com enzima DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com enzima desoxirribonuclease (DNase) (*Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, EUA) durante 10 minutos, a temperatura ambiente e de acordo com o protocolo do fabricante, com a finalidade de evitar possibilidade de contaminação com DNA genômico e, conseqüentemente, influenciar a avaliação da expressão gênica.

3.10.4 PCR quantitativa em tempo real

A transcrição reversa (RT) e a amplificação do cDNA foram realizadas a partir do RNA total extraído das amostras, em único passo, por PCR quantitativa em tempo real utilizando o *kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). O produto de amplificação de cada amostra foi analisado pelo fluoróforo SYBR® Green. Os fluoróforos se intercalam na fita dupla de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência cuja intensidade é proporcional à quantidade do produto de amplificação. A fluorescência detectada é representada por meio do Ct (ciclo limiar, *cycle threshold*), que representa o ciclo na reação de amplificação a partir do qual a amplificação se torna exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*), em triplicatas, para volume final de 10 µL, de acordo com instruções do fabricante. Uma reação controle negativo, ou seja, sem amostra de RNA total, foi realizada para cada par de *primers* a fim de se verificarem possíveis contaminações.

As reações foram conduzidas em termociclador AB7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). As seqüências dos iniciadores ou *primers* utilizados estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Seqüência dos *primers* utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

<i>Primer</i>	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
<i>Fabpa</i>	5'- ACACCGAGATTTCCTTCAA AC-3'	5'- CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTC A-3'
<i>Ppary</i>	5'- GTGCCAGTTTCGATCCGTA GA-3'	5'-GGCCAGCATCGTGTAGATGA- 3'
<i>Leptina</i>	5'-TGGCTTTGGTCCTATCTG- 3'	5'-GAAATGTCATTGATCCTGGT-5'
<i>Adiponectina</i>	5'- GGAAACTTGTGCAGGTTGG AT-3'	5'-GGGTCACCCTTAGGACCAAGA- 3'
<i>Esr1</i>	5' - GCTCCTAACTTGCTCCTGGA C-3'	5'- AGCAACATGTCAAAGATCTCCA- 3'
<i>Gapdh</i>	5'- AAGGGCTCATGACCACAGT C -3'	5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'

As condições de termociclagem durante a PCR foram:

- Programa de transcrição reversa: 48°C durante 30 minutos;
- Ativação da Taq DNA polimerase: 95°C durante 10 minutos;
- Quarenta ciclos de desnaturação (95°C durante 15 segundos) e anelamento e amplificação (60°C durante 1 minuto);
- Curvas de dissociação (programa de dissociação do produto de amplificação): realizado após cada reação com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e produtos inespecíficos de amplificação. Para isso, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura (acréscimos de 0,3°C) de 60°C para 95°C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação T_m (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A T_m é específica para cada sequência de DNA amplificada e, assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado.

A expressão relativa do RNAm para cada um dos genes alvo foi determinada pelo método comparativo $\Delta\Delta\text{Ct}$, com normalização para o gene de referência que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Para isso, os valores de Ct obtidos para cada amostra nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar) foram subtraídos do valor do Ct obtido para as mesmas amostras nas reações de amplificação do gene referência (*Gapdh*), sendo obtido o ΔCt .

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \text{Ct}_{\text{gene referência}}$$

A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta\text{Ct}$. Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, em que $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{intervenção}} - \Delta\text{Ct}_{\text{calibrador}}$.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos relativos ao peso, consumo de água e dieta, teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina foram expressos como média e erro padrão da média de cada grupo de tratamento. Foi utilizada para comparar as médias entre múltiplos grupos quando se tinha tratamento em relação ao tempo foi utilizada a análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA), seguida da comparação múltipla de Bonferroni. Para dados não-paramétricos foi usado o teste Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn. Nos testes em cultura de células foram usados o teste Mann-Whitney em que comparamos os tratamentos usando diferentes concentrações do NP com o controle negativo, o DMSO. Foi verificada a presença de *outliers* com a utilização do teste de Grubb. Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para *Windows*. O critério de significância para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

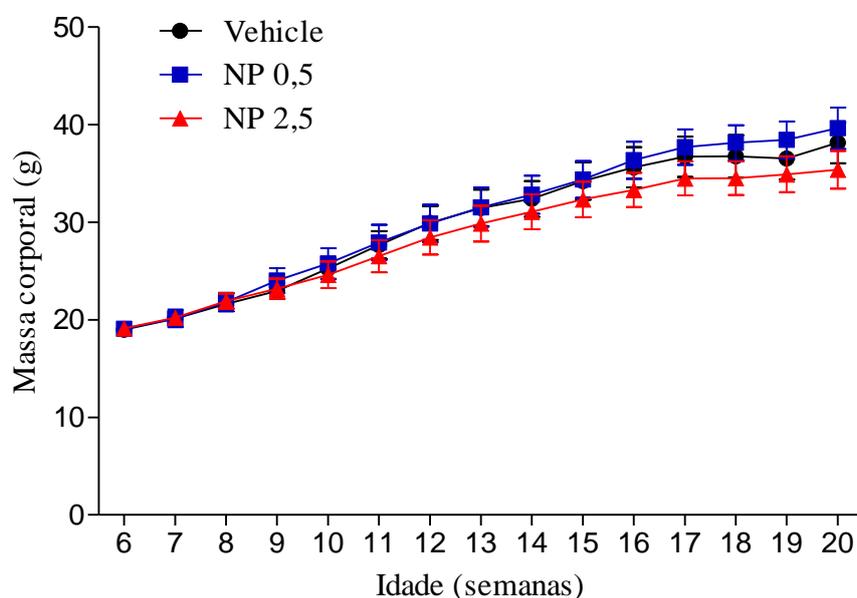
4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, INGESTÃO DE ENERGIA E INGESTÃO HÍDRICA

Os camundongos fêmeas e machos incluídos no estudo foram divididos aleatoriamente, ao completarem 6 semanas de idade, em 3 grupos contendo 6 animais cada, descritos da seguinte forma: grupo 1 (controle negativo), camundongos fêmeas ou machos que receberam apenas água; grupo 2, camundongos fêmeas ou machos que receberam NP na dose de 0,5 mg/kg de massa corpórea por dia, da 6ª até a 20ª semana de vida; e grupo 3, camundongos fêmeas ou machos que receberam NP na dose de 2,5 mg/kg de massa corpórea por dia, da 6ª até a 20ª semana de vida.

A avaliação semanal da massa corporal não mostrou diferença entre os grupos de fêmeas que receberam veículo ou tratados com NP (Figura 6A), como também não houve diferença entre os machos tratados com NP ou não (Figura 6B).

A



B

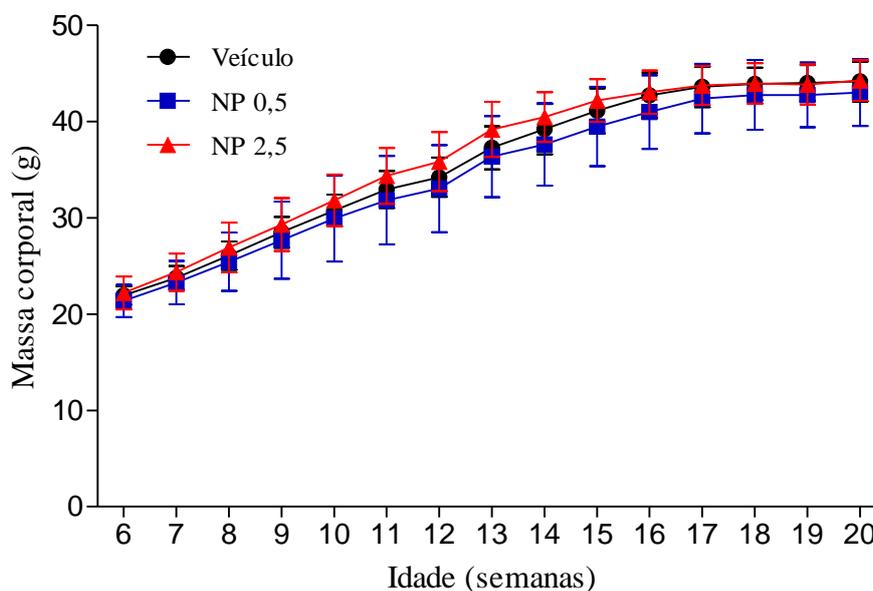
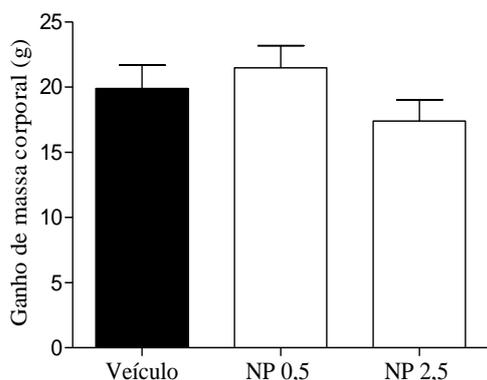


Figura 6 - O NP não modifica a massa corporal de camundongos C57BL/6 fêmeas (A) e machos (B) alimentados com dieta hiperlipídica. Massa corporal (mediana e intervalo interquartil) semanal entre 6 e 20 semanas de vida de camundongos tratados com veículo ou diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas. Dados analisados por análise de variância (two -way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni (n= 6 animais por grupo).

Também não foram observadas diferenças entre as fêmeas ou machos quando avaliado o ganho de massa corporal entre 6 e 20 semanas de tratamento com o NP (Figura 7A e 7B).

A



B

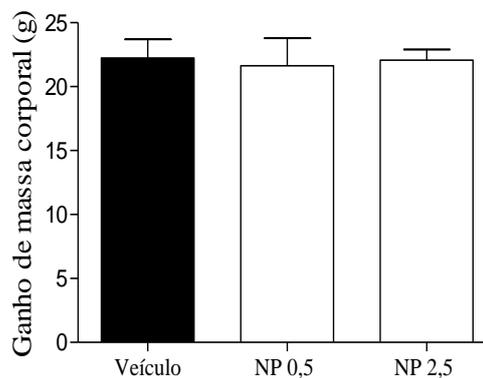


Figura 7 – Ganho de massa corporal de camundongos tratados com NP. O tratamento com NP, nas duas doses testadas, entre a 6ª e a 20ª semanas de vida não modificou o ganho de massa corporal de camundongos fêmeas (A) e machos (B). O tratamento com NP na dose de 0,5 mg/kg/d entre a 6ª e a 20ª semana de vida resultou em tendência de aumento da massa corporal em camundongos fêmeas, porém não significativa. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongos por grupo).

Não foi observada também diferença entre os grupos de fêmeas ou machos tratados com as duas doses de NP testadas, em relação ao controle, quando avaliada a ingestão média diária de dieta (Figuras 8A e 8B). Tanto as fêmeas quanto os machos que receberam o tratamento com NP na água de beber apresentaram ingestão hídrica significativamente maior em relação aos animais que receberam veículo (Figuras 9A e 9B).

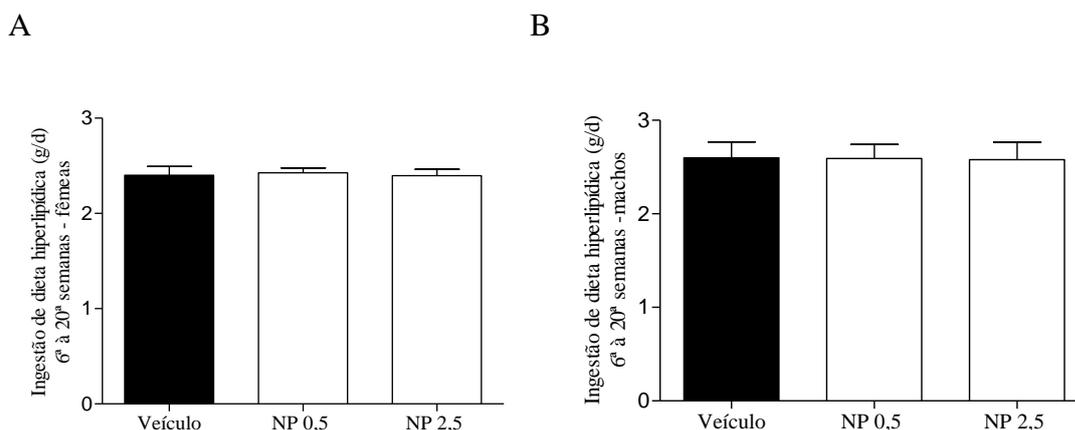


Figura 8- O tratamento de camundongos fêmeas (A) e machos (B) com NP entre a 6^a e a 20^a semanas de vida não modificou a ingestão de dieta hiperlipídica. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongo por grupo).

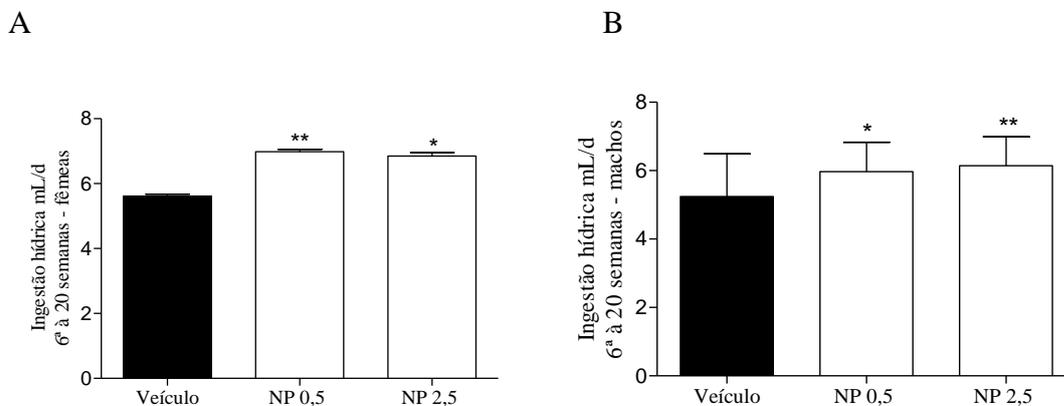


Figura 9 – Os camundongos fêmeas (A) e machos (B) que receberam NP nas doses 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d ingeriram significativamente mais água quando comparados aos animais que receberam somente água filtrada (veículo). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn, * p < 2,5 vs veículo, ** p < 0,5 vs veículo (fêmeas); * p < 0,5 vs veículo ** p < 5 vs veículo (machos) (n = 6 de camundongo por grupo).

4.2 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A HOMEOSTASE DA GLICOSE

Na 17^a semana de vida foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG) e na 18^a semana de vida foi realizado o teste de tolerância a insulina (TTI) nos camundongos fêmeas e machos.

Tanto os camundongos fêmeas (Figuras 10A e 10B) quanto os machos (Figuras 10C e 10D), alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com NP ou com veículo mostraram-se intolerantes à glicose (média da glicemia 120 minutos após a sobrecarga de glicose superior a 140 mg/dL), não havendo, contudo, diferença significativa entre os grupos (Figura 10). Também não foi observada diferença da glicemia em resposta à administração da insulina nos grupos tratados com NP, quando comparados ao grupo tratado com veículo (Figura 11).

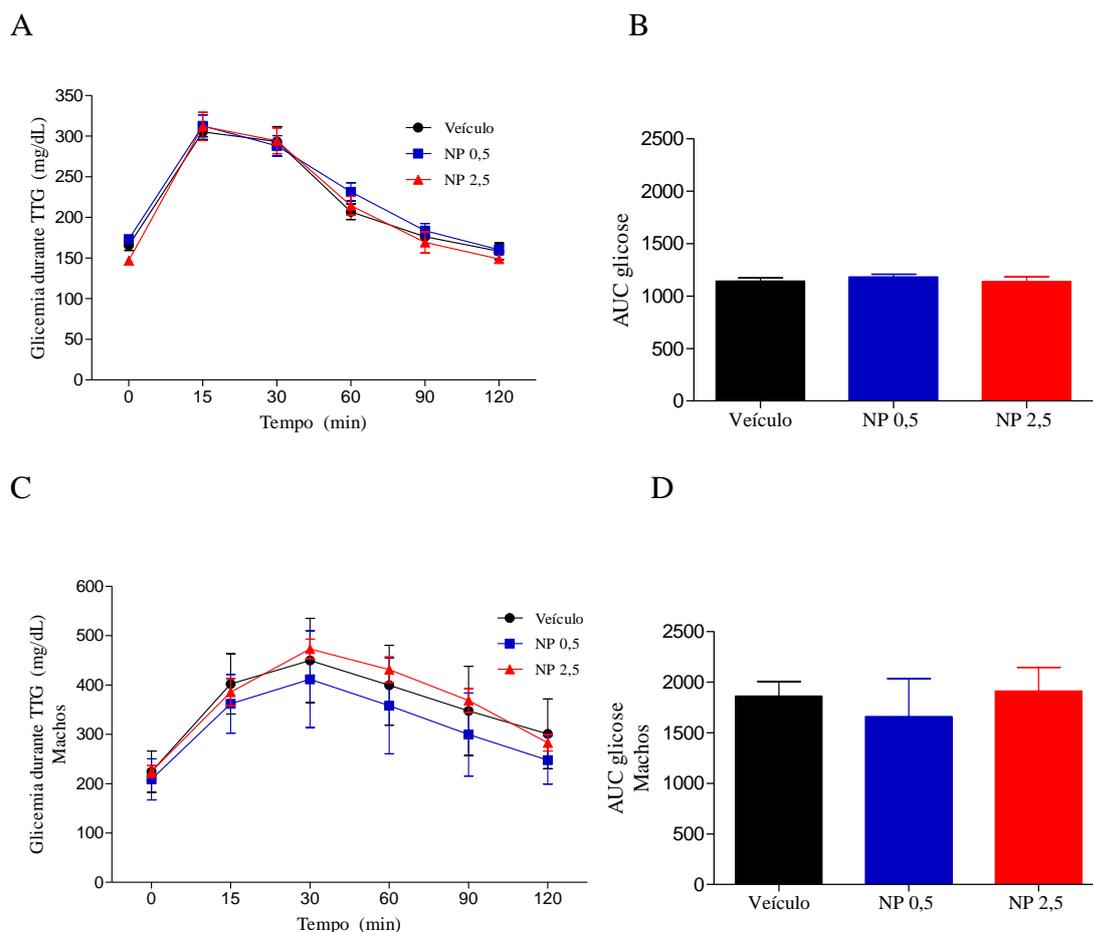


Figura 10– O tratamento de camundongos machos e fêmeas com NP a partir da 6ª semana de vida não modifica a tolerância à glicose na 17ª semana de vida. Teste de tolerância a glicose (sobrecarga intraperitoneal de glicose, 1 mg/kg) em camundongos C57BL/6 fêmeas (A e B) e machos (C e D) alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo (água) ou diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 11 semanas, da 6ª à 17ª semana de vida. Dados apresentados como média ± EPM e analisados por análise de variância (two-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. AUC: área sob a curva (n = 6 de camundongo por grupo).

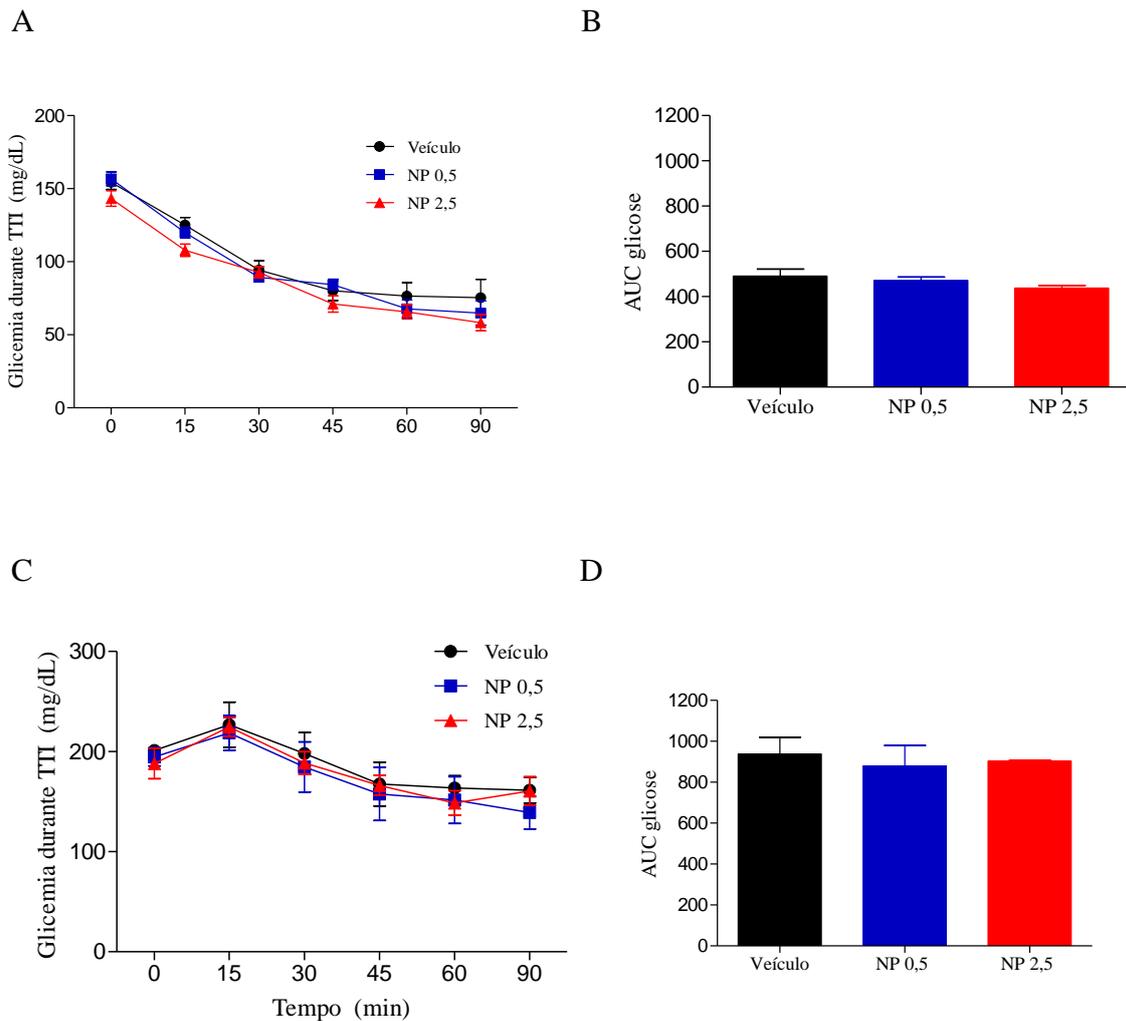
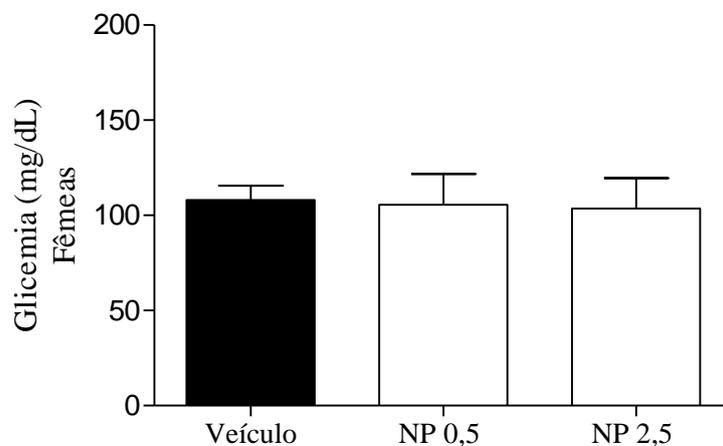


Figura 11 – O TTI (Teste de tolerância a insulina): Efeito do NP sobre a glicemia pós-sobrecarga intraperitoneal de insulina (1 UI/kg) em camundongos C57BL/6 fêmeas (A e B) e machos (C e D) alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo (água) ou diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 12 semanas, da 6ª à 18ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância (two-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. AUC: área sob a curva (n = 6 de camundongo por grupo).

Ao final do tratamento, na 20ª semana de vida, foi realizada a medida da glicemia de jejum dos camundongos fêmeas (Figura 12A) e machos (Figura 12B). O NP não apresentou efeito sobre a glicemia de jejum nas fêmeas e machos, em comparação com os respectivos controles (Figura 12).

A



B

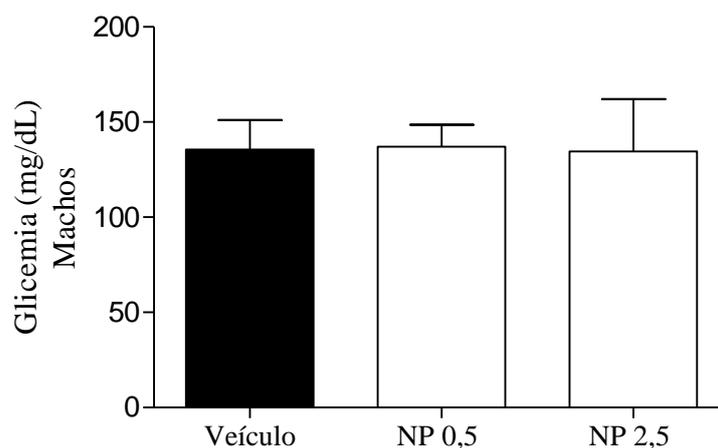


Figura 12 - O NP não modifica a glicemia de jejum de camundongos C57BL/6 fêmeas (A) e machos (B) alimentados com dieta hiperlipídica. Camundongos tratados com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6ª à 20ª semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongo por grupo).

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

Na 20ª semana de vida, após 14 semanas de tratamento com NP nas doses de 0,5 e 2,5 mg/kg/d ou veículo, os camundongos fêmeas e machos foram eutanasiados e foi coletado sangue para avaliação bioquímica. Foram avaliadas as concentrações séricas das transaminases ALT e AST, fosfatase alcalina e gamaglutamiltransferase (Gama-GT). Nas fêmeas observamos uma tendência de diminuição das transaminases (ALT e AST) em resposta ao tratamento com

NP na concentração de 2,5 mg/kg/d quando comparado ao veículo, porém não significativa (Figuras 13A e 13B). Foi observada tendência de aumento dose-dependente da concentração sérica de fosfatase alcalina (Figura 13C) e de redução dose-dependente da Gama-GT (Figura 13D) nos animais tratados com NP em comparação com o controle, embora não significativa.

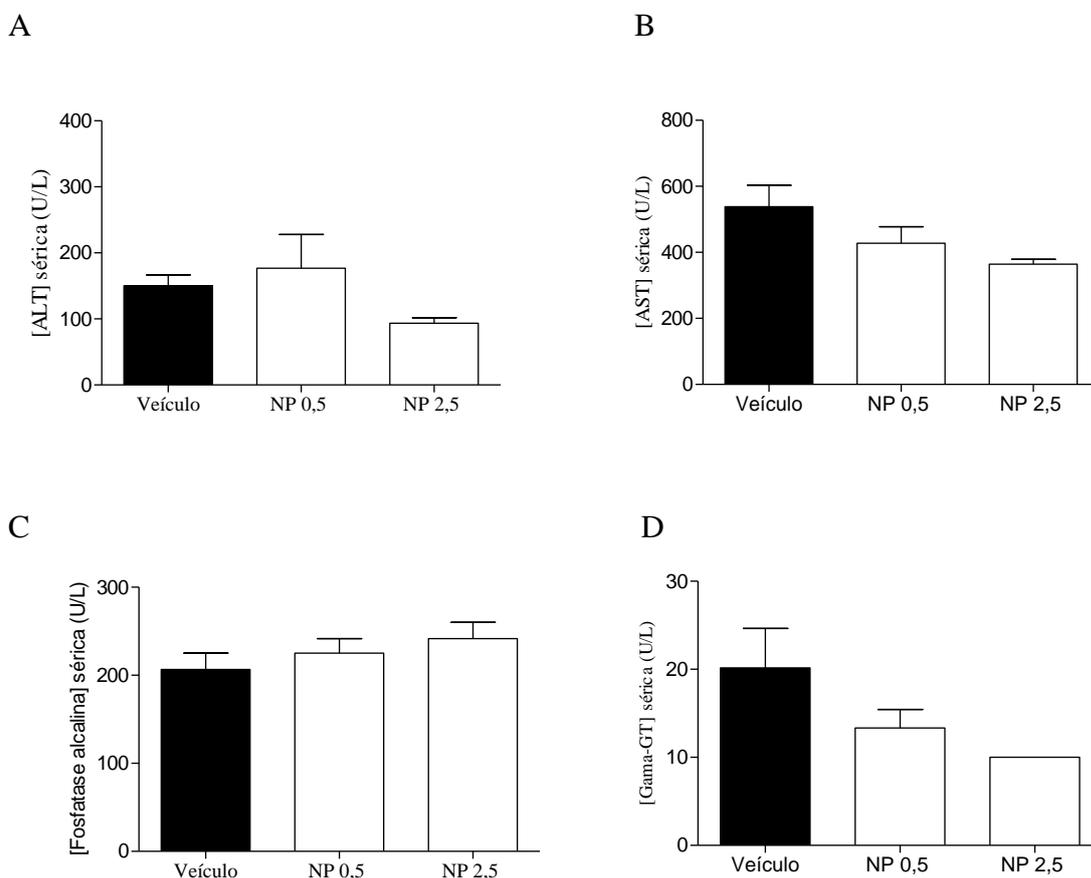


Figura 13 - Efeito do NP sobre a concentração sérica das transaminases ALT (A) e AST (B) e das enzimas fosfatase alcalina (C) e Gama-GT (D) em camundongos C57BL/6 fêmeas tratadas com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6^a à 20^a semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongo por grupo).

Nos machos, observamos tendência de diminuição da concentração sérica de AST em animais tratados com NP na concentração de 2,5 mg/kg/d, quando comparados ao veículo (Figura 14B), porém não foi observada diferença entre os grupos com relação à concentração sérica da ALT (Figura 14A). Assim como nas fêmeas, a concentração sérica de fosfatase alcalina mostrou uma tendência ao aumento de maneira dose-dependente nos animais tratados com NP (Figura 14C), enquanto a gama-GT diminuiu nos animais tratados com NP na concentração de 2,5 mg/kg/d, porém de forma não foi significativa (Figura 14D).

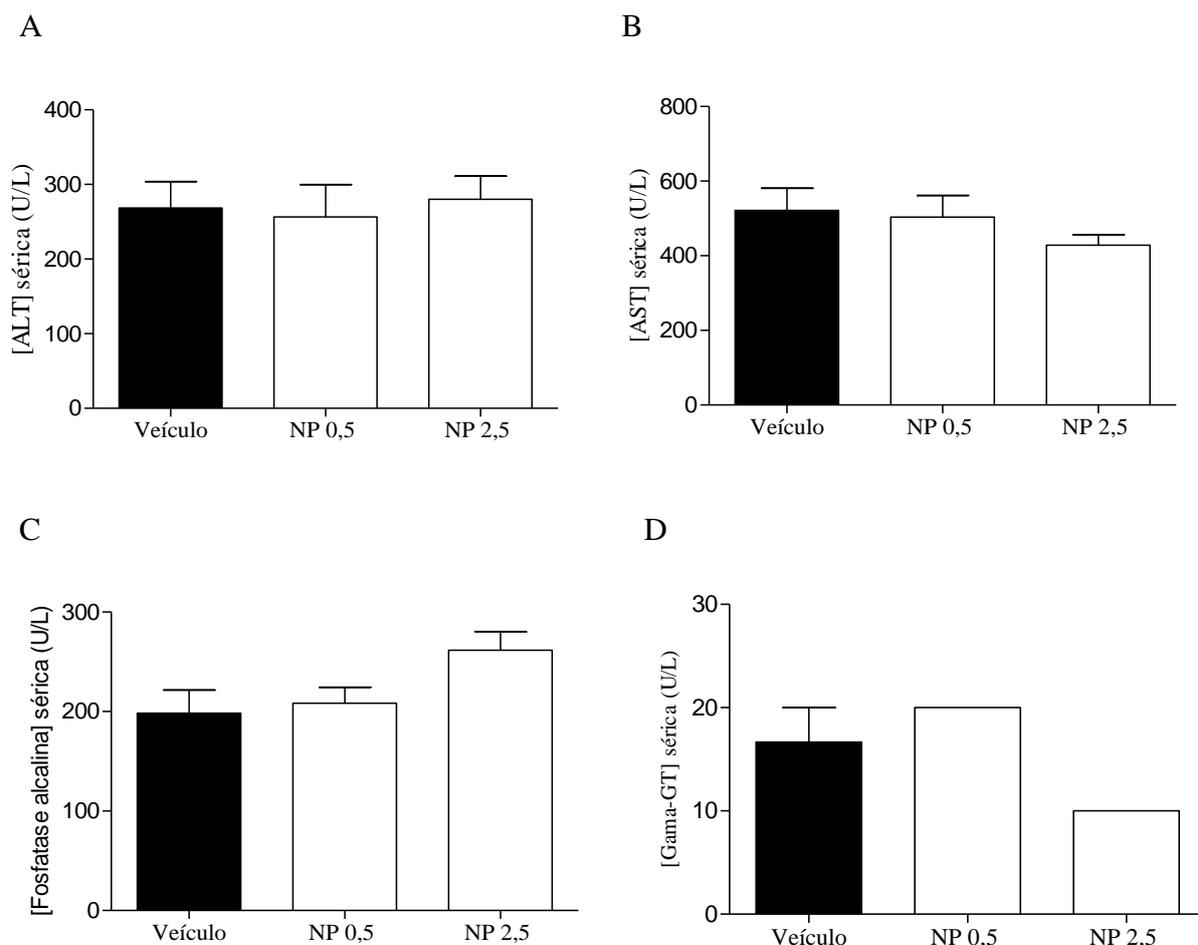
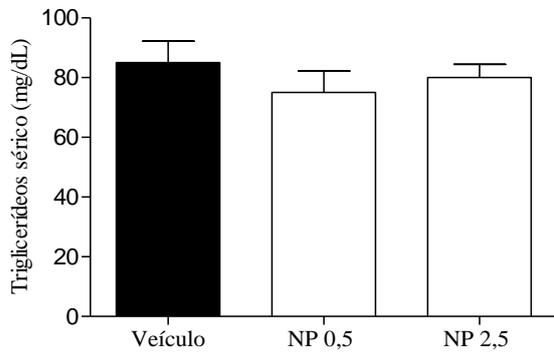


Figura 14 - Efeito do NP sobre a concentração sérica das transaminases ALT (A) e AST (B) e das enzimas fosfatase alcalina (C) e Gama-GT (D) em camundongos C57BL/6 machos tratados com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6^a à 20^a semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongo por grupo).

Foi também avaliado o perfil lipídico das fêmeas (Figura 15) e dos machos (Figura 16), especificamente as concentrações séricas de triglicerídeos e do colesterol HDL. Infelizmente, não foi possível avaliar o colesterol total sérico devido a pequena quantidade de amostra de sangue coletada durante a eutanásia. Nas fêmeas, observamos tendência de diminuição dos triglicerídeos de maneira dose-dependente, porém não significativa (Figura 15A). Não observamos diferença na concentração sérica de colesterol HDL entre as fêmeas tratadas e não tratadas com NP (Figura 15B). Nos machos observamos tendência de diminuição dos triglicerídeos em ambas concentrações de NP, porém mais acentuada na dose de 0,5 mg/kg/d (Figura 16A). O colesterol HDL aumentou nos machos tratados com 2,5 mg/kg/d de NP em relação aos animais não tratados (Figura 16B).

A



B

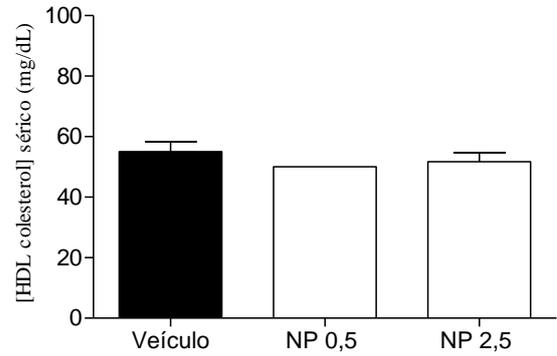
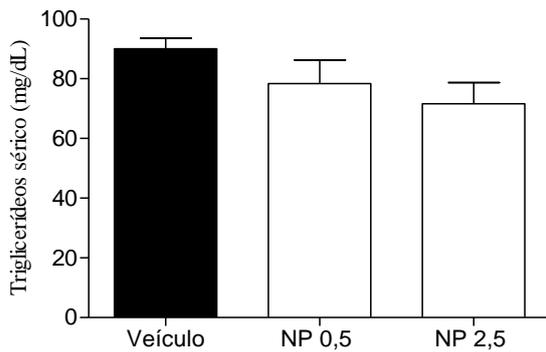


Figura 15 – Efeito do NP sobre a concentração sérica de triglicédeos (A) e colesterol HDL (B) em camundongos C57BL/6 fêmeas tratadas com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6ª à 20ª semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongo por grupo).

A



B

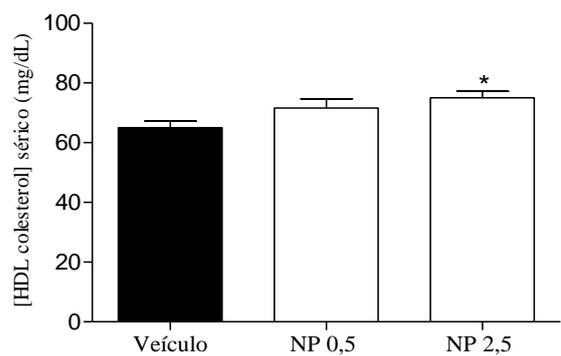


Figura 16 – Efeito do NP sobre a concentração sérica de triglicédeos (A) e colesterol HDL (B) em camundongos C57BL/6 machos tratados com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6ª à 20ª semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn. * p < 0,5 vs veículo (n = 6 de camundongo por grupo).

4.4 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE OS DEPÓSITOS DE TECIDO ADIPOSEO E DO FÍGADO

Os depósitos dos tecidos adiposos visceral (perigonadal ou epididimal), subcutâneo (inguinal), marrom (interescapular) e também o fígado foram coletados dos camundongos fêmeas e machos e em seguida sua massa foi aferida. Foi calculada a massa relativa dos tecidos, considerando a massa corporal do animal.

Não observamos diferença entre a massa dos tecidos adiposos e fígado das fêmeas que receberam o tratamento com NP (0,5 e 2,5 mg/kg/d) ou veículo (Figura 17, Tabela 5). Resultado semelhante foi observado entre os camundongos machos (Figura 18, Tabela 5).

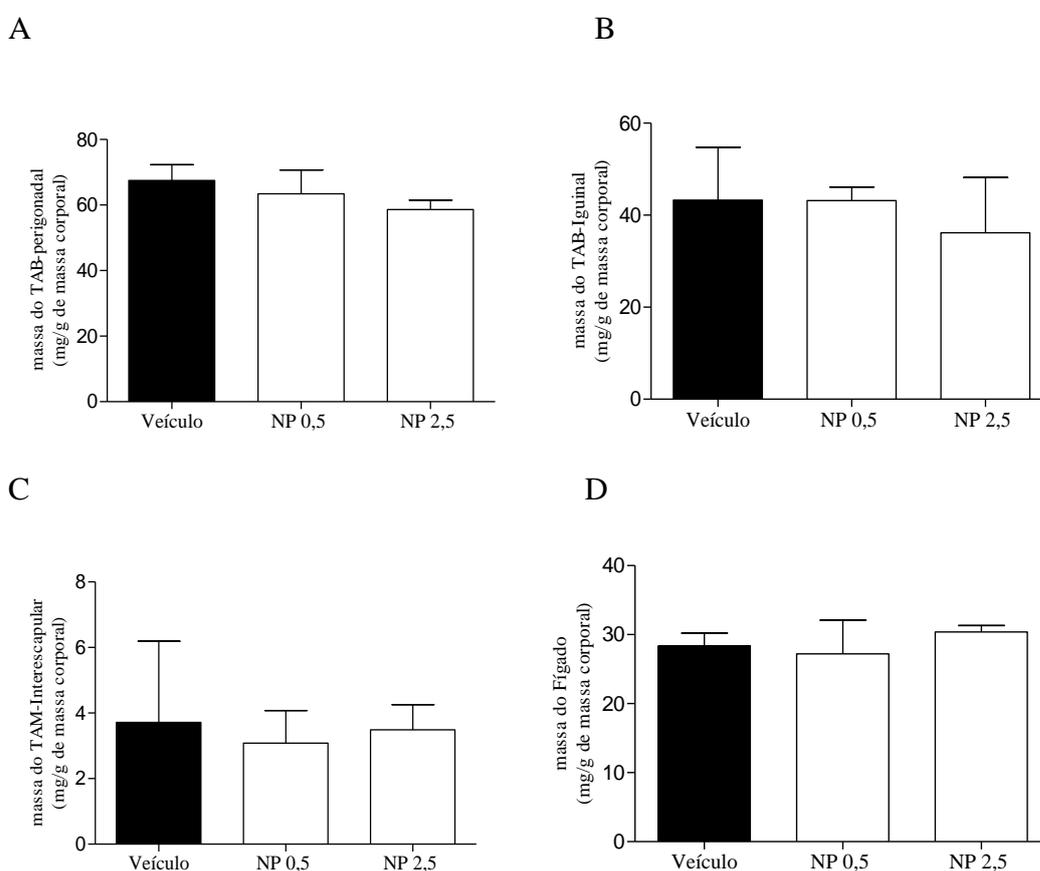
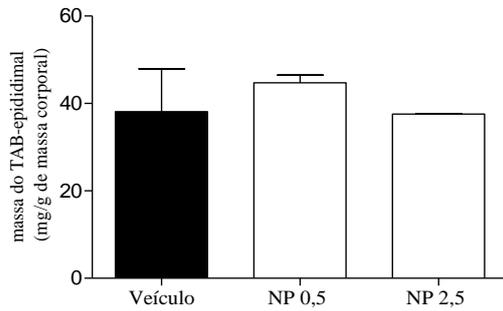
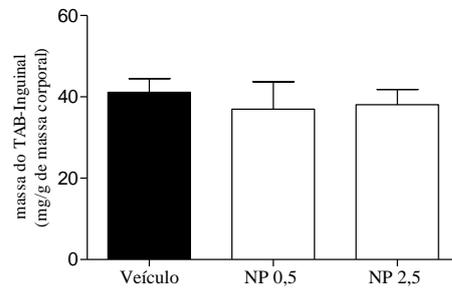


Figura 17- Efeito do NP sobre a massa relativa dos depósitos dos tecidos adiposos visceral (perigonadal), subcutâneo (inguinal), marrom (interescapular) e o fígado de camundongos C57BL/6 fêmeas tratadas com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6^a à 20^a semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongo por grupo).

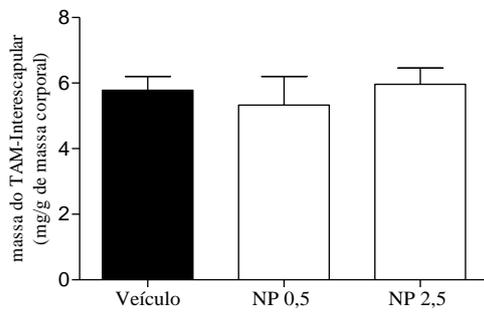
A



B



C



D

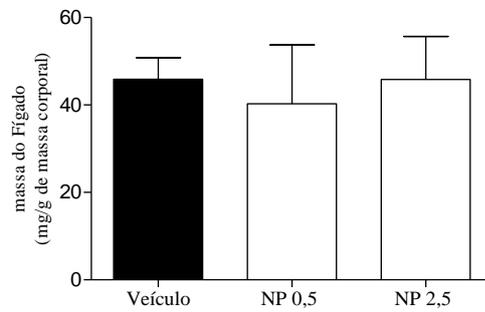


Figura 18 - Efeito do NP sobre a massa relativa dos depósitos dos tecidos adiposos visceral (epididimal), subcutâneo (inguinal), marrom (interscapular) e o fígado coletados de camundongos C57BL/6 machos tratados com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6^a à 20^a semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn (n = 6 de camundongo por grupo).

Tabela 5 – Massa absoluta e relativa à massa corporal dos tecidos adiposos branco e marrom e do fígado, entre os camundongos que receberam veículo ou NP. TAB: tecido adiposo branco; TAM: tecido adiposo marrom; NP: nonilfenol

	Fêmeas		Machos	
	Massa absoluta (mg)	Massa relativa (mg/kg)	Massa absoluta (mg)	Massa relativa (mg/kg)
TAB inguinal				
Veículo	2646 (2380;3183)	67,5 (57,7;72,3)	1682 (1364;1907)	38,1 (31,7;47,9)
0,5 NP	2493 (2068;2935)	63,4 (57,8;70,7)	1797 (1493;1875)	44,7 (35,2;46,5)
2,5 NP	2012 (1642;2448)	58,6 (54,5;61,5)	1521 (1265;1599)	37,6 (29,5;37,6)
TAB perigonadal ou epididimal				
Veículo	1723 (1124;2197)	43,3 (33,6;54,8)	1700 (1354;1897)	41,1 (33,1;44,5)
0,5 NP	1655 (1409;1918)	43,2 (37,8;46,1)	1519 (1153;1858)	36,9 (30,05;43,7)
2,5 NP	1265 (709,2;1920)	36,2 (23,3;48,2)	1608 (1383;1766)	38,1 (32,5;41,8)
TAM interescapular				
Veículo	133,7 (102;247,8)	3,7 (2,7;6,190)	247,7 (177;253,6)	5,8 (5,1;6,2)
0,5 NP	119,2 (113;145,1)	3,1 (2,9;4,1)	223,1 (173;257,7)	5,3 (4,2;6,2)
2,5 NP	109,1 (102,5;172)	3,5 (3,05;4,25)	249,6 (190;775,8)	6 (4,5;6,4)
Fígado				
Veículo	1073 (994,2;1118)	28,3 (26,7;30,2)	1906 (1661;2220)	45,9 (40,19;5,8)
0,5 NP	1067 (1026;1090)	27,2 (27;32,1)	1656 (1267;2289)	40,3 (31,2;53,7)
2,5 NP	1063 (905,4;1186)	30,4 (28,7;31,3)	1920 (1732;2398)	45,8 (41,2;55,7)

Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

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

Foram avaliadas as características histológicas do tecido adiposo branco perigonadal ou epididimal, inguinal, marrom e fígado dos camundongos fêmeas e machos tratados com veículo ou diferentes doses de NP (0,5 ou 2,5 mg/kg/d).

A avaliação qualitativa dos cortes histológicos não indicou diferença entre os tecidos, sugerindo que não houve diferença entre as fêmeas tratadas com NP (0,5 e 2,5 mg/kg/d), durante

14 semanas, quando comparadas com as fêmeas do grupo controle (Figura 19A-C, Figura 20A-C, Figura 21A-C, Figura 22A-C). O mesmo foi observado nos camundongos machos (Figura 19D-F, Figura 20D-F, Figura 21D-F, Figura 22D-F).

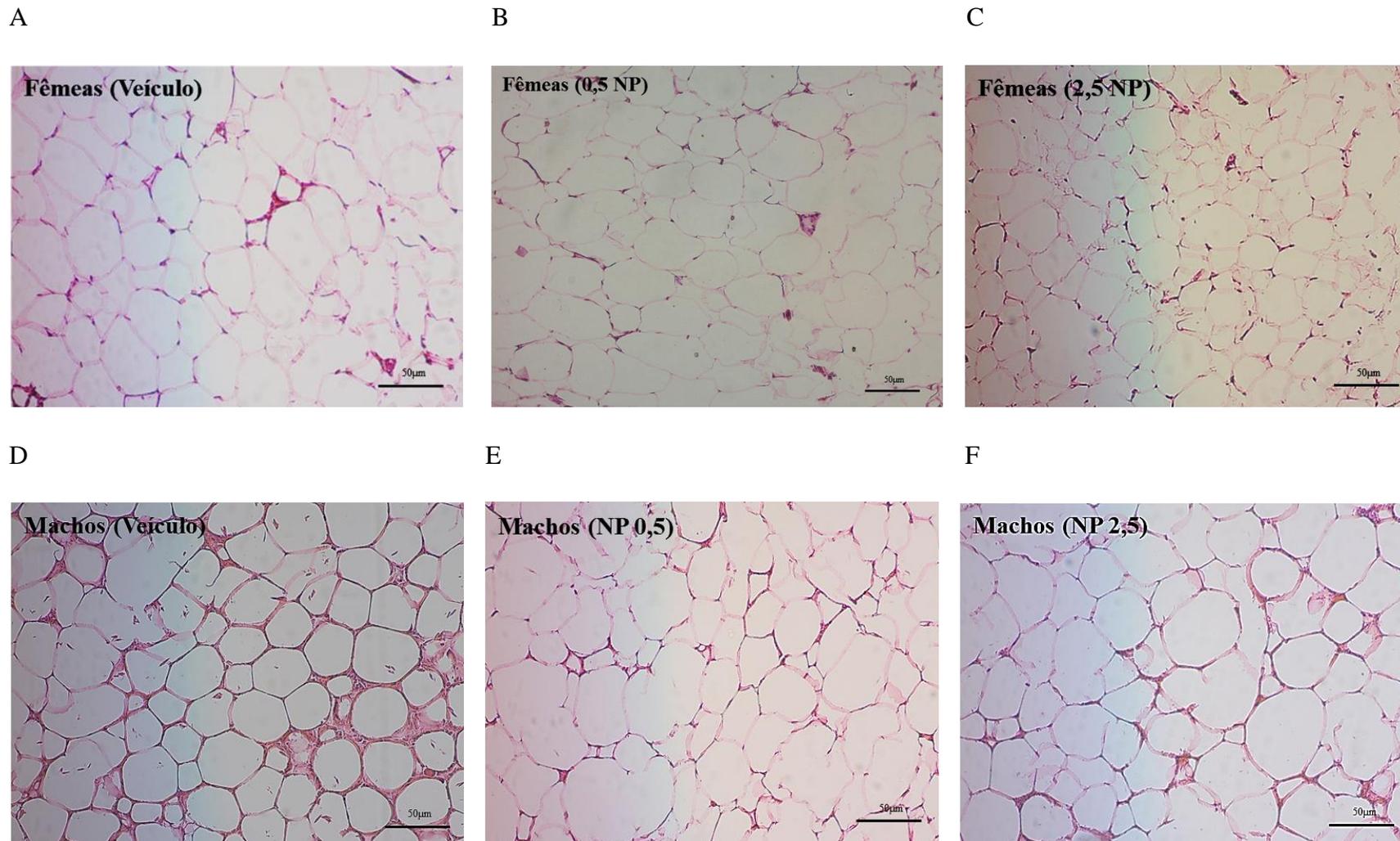


Figura 19 – Características histológicas do tecido adiposo branco visceral (perigonadal ou epididimal) de camundongos fêmeas (A-C) e machos (D-F) alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo ou diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6ª à 20ª semana de vida. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 100 vezes e escala de 50 micrometros (n = 6 de camundongo por grupo).

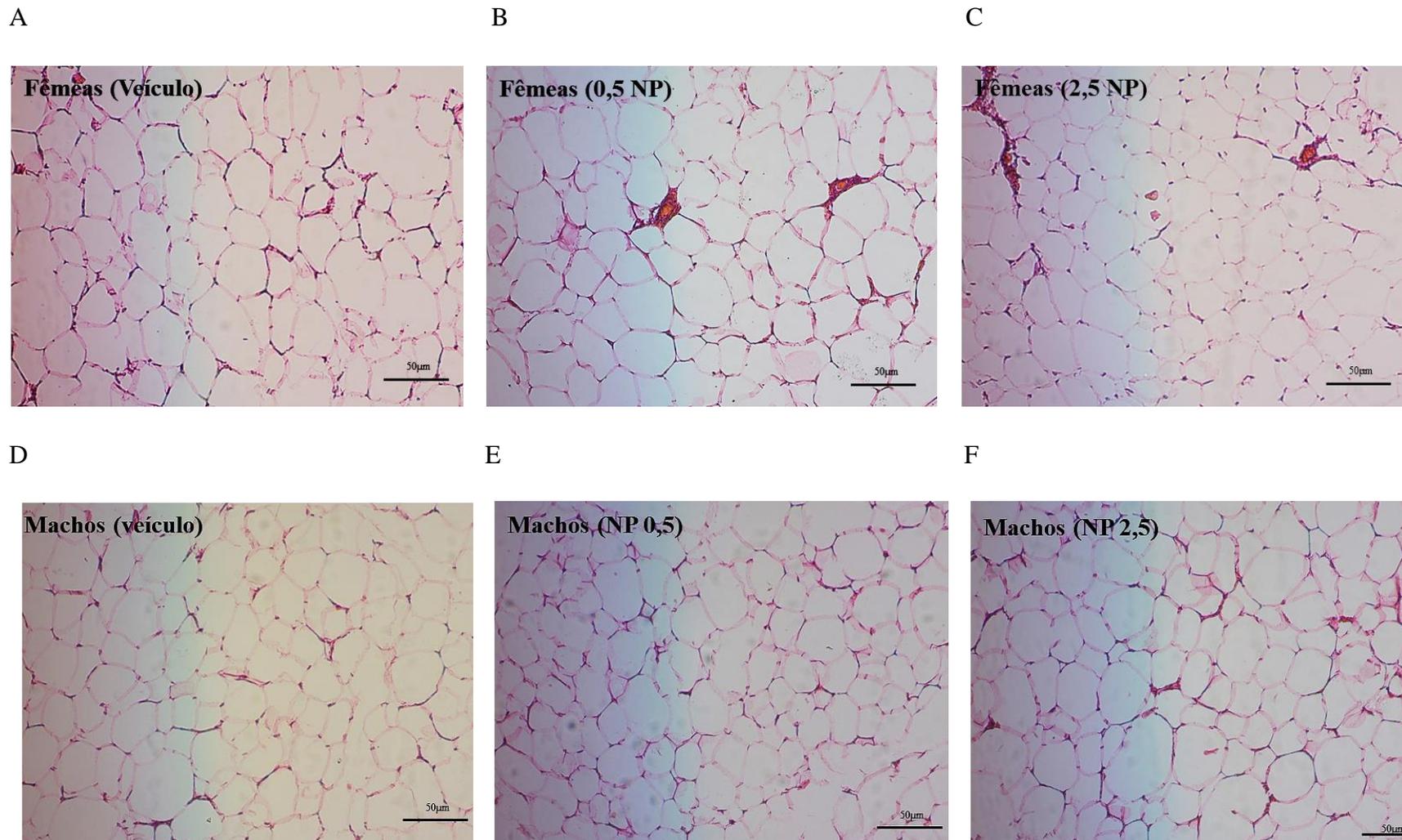


Figura 20 – Características histológicas do tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) de camundongos fêmeas (A-C) e machos (D-F) alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo ou diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6^a à 20^a semana de vida. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 100 vezes e escala de 50 micrometros (n = 6 de camundongo por grupo).

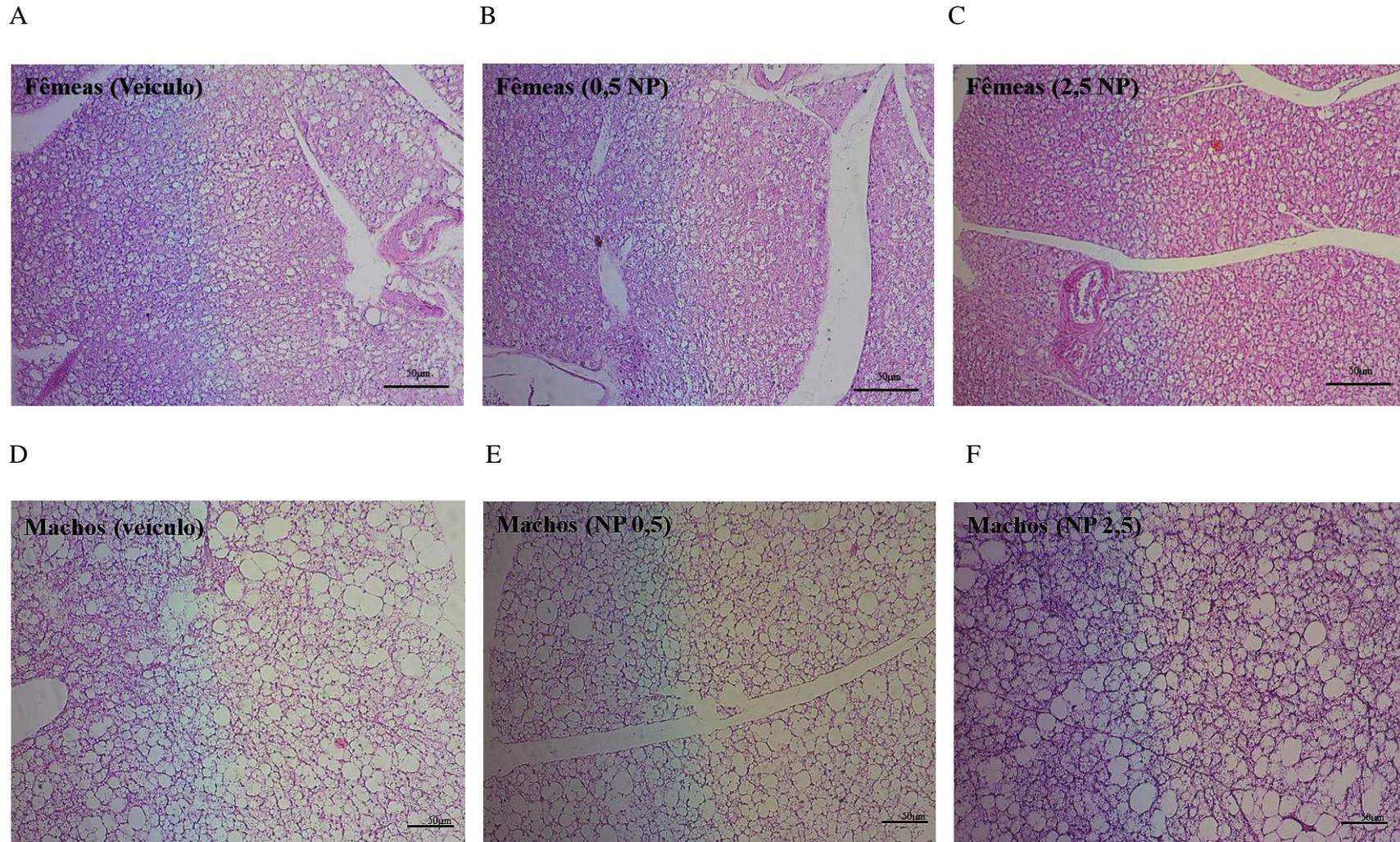


Figura 21 – Características histológicas do tecido adiposo marrom (interescapular) de camundongos fêmeas (A-C) e machos (D-F) alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo ou diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6ª à 20ª semana de vida. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 100 vezes e escala de 50 micrometros (n = 6 de camundongo por grupo).

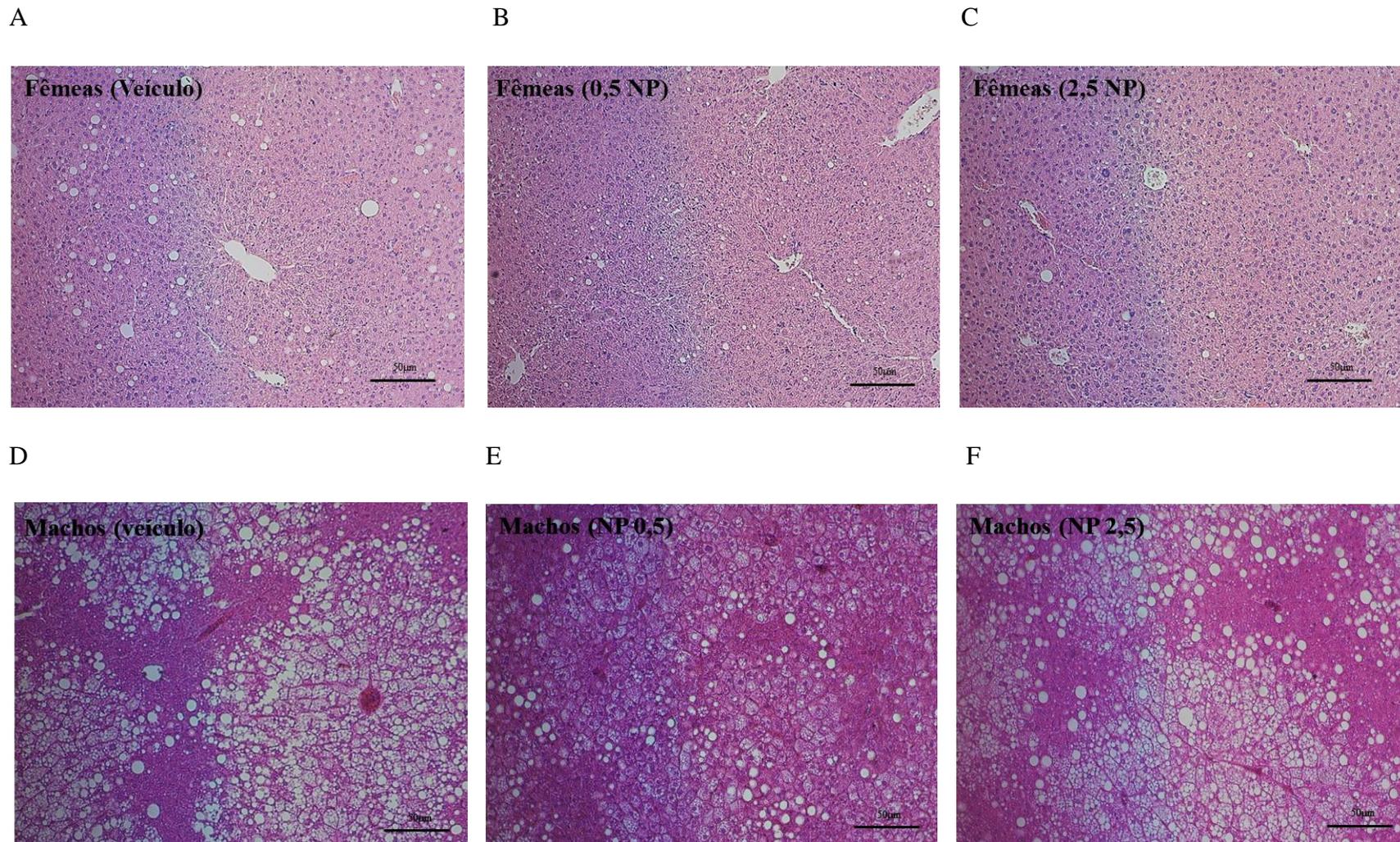


Figura 22 – Características histológicas do fígado de camundongos fêmeas (A-C) e machos (D-F) alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo ou diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6ª à 20ª semana de vida. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 100 vezes e escala de 50 micrometros (n = 6 de camundongo por grupo).

4.5 EFEITO DO NONILFENOL SOBRE A EXPRESSÃO DO mRNA DA FABP-A, PPAR γ , ADIPONECTINA, LEPTINA E ESR1 NOS TECIDOS ADIPOSOS E FÍGADO

A investigação do efeito adipogênico do NP foi também realizada pela determinação e marcadores adipogênicos e lipogênicos através da expressão do RNAm dos genes da *Fabpa*, *Ppar γ* , *Adiponectina*, *Leptina* nos tecidos adiposos visceral, subcutâneo e tecido adiposo marrom. Não foi observado diferença na expressão de *Fabpa* no tecido adiposo brancos subcutâneo e visceral, como também não foi observado no tecido adiposo marrom das fêmeas tratadas com NP (Figuras 23A-C).

Nos machos observamos aumento significativo da expressão relativa do RNAm da *Fabpa* no tecido adiposo branco visceral dos animais tratados com NP 0,5 mg/kg/d quando comparados aos tratados com veículo (Figura 24B). Foi também observado aumento significativo da expressão do referido RNAm no TAM interescapular dos animais nos grupos tratados com NP 0,5 mg/kg/d e uma tendência de aumento desse gene nos grupos tratados com NP 2.5 mg/kg/d (Figura 24C). Não foi observado diferença na expressão de *Fabpa* no tecido adiposo subcutâneo dos machos tratados com NP (Figura 24A).

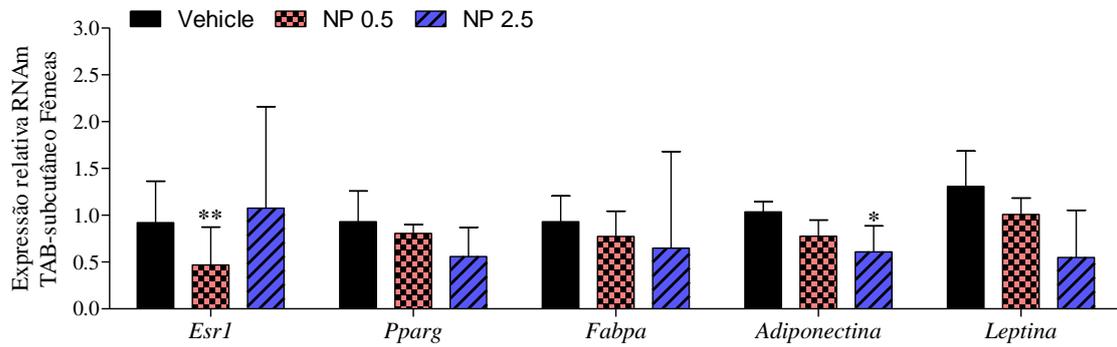
No depósito de tecido adiposo subcutâneo dos machos foi observada uma tendência de aumento da expressão do gene do *Ppar γ* nos animais tratados com NP 0,5 e 2,5 mg/kg/d (Figura 24A), sendo que nas fêmeas não houve diferença na expressão relativa do *Ppar γ* nesse depósito (Figura 23A). Porém, no tecido adiposo visceral de machos e fêmeas tratados com NP 0,5 mg/kg/d observamos o aumento significativo da expressão gênica do *Ppar γ* (Figura 23B e 24B). No tecido adiposo marrom não foi observado efeito do NP sobre a expressão do *Ppar γ* nos machos e nas fêmeas tratadas com NP 2,5 mg/kg/d observou-se tendência de diminuição da expressão do *Ppar γ* (Figura 23C e 24C).

A *Adiponectina* apresentou tendência de aumento nos machos tratados com NP 0,5 mg/kg/d e aumentou significativamente nos animais tratados com a concentração maior do NP de 2,5 mg/kg/d no tecido subcutâneo. Nos outros depósitos do tecido adiposo visceral e marrom, não foi observado diferença na expressão do gene da *Adiponectina* entre tratados e não tratados com NP. Da mesma maneira, não foi observado diferença na expressão do gene da *Adiponectina* nos depósitos dos tecidos adiposos visceral e marrom das fêmeas. No tecido subcutâneo das fêmeas tratadas com NP 2,5 mg/kg/d observou-se diminuição da expressão do gene da *Adiponectina*.

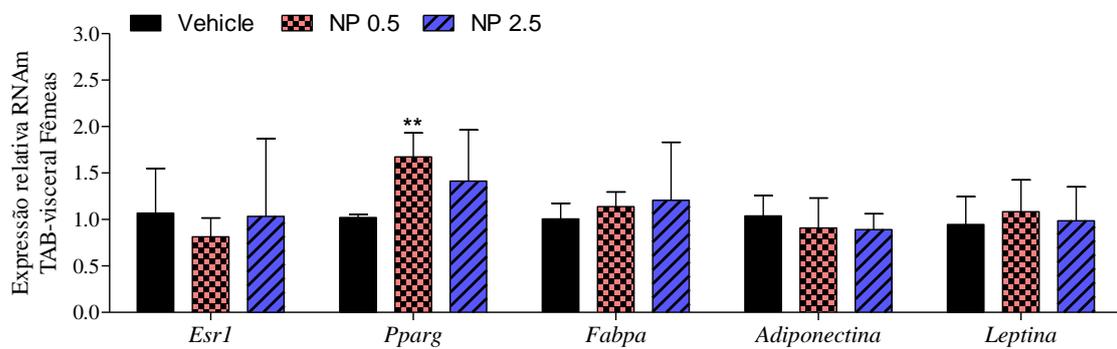
Avaliamos também a expressão da *Leptina* e observamos diminuição da expressão desse gene no tecido adiposo visceral de camundongos machos tratados com NP 2,5 mg/kg/d. Não foi observado efeito do NP nos depósitos de tecido adiposo, subcutâneo e marrom dos camundongos machos e fêmeas, bem como no visceral das fêmeas.

Como o estradiol pode regular a expressão do receptor de estrogênio no hipotálamo (LIU e SHI, 2015) e somente o ESR1 é expresso no tecido adiposo (PEDERSEN et al., 2004), investigamos o efeito do NP sobre a expressão do RNAm *Esr1* no tecido adiposo. Nos machos, observamos aumento da expressão de *Esr1* no tecido subcutâneo dos animais tratados com NP 0,5 mg/kg/d e no tecido adiposo marrom observamos aumento na expressão do *Esr1* de maneira dose-dependente nos animais tratados. Nas fêmeas, observamos diminuição significativa da expressão do *Esr1* no tecido subcutâneo dos animais tratados com NP 0,5 mg/kg/d. Não foi observada diferença na expressão desse gene no tecido visceral dos camundongos machos, bem como no visceral e marrom das fêmeas.

A



B



C

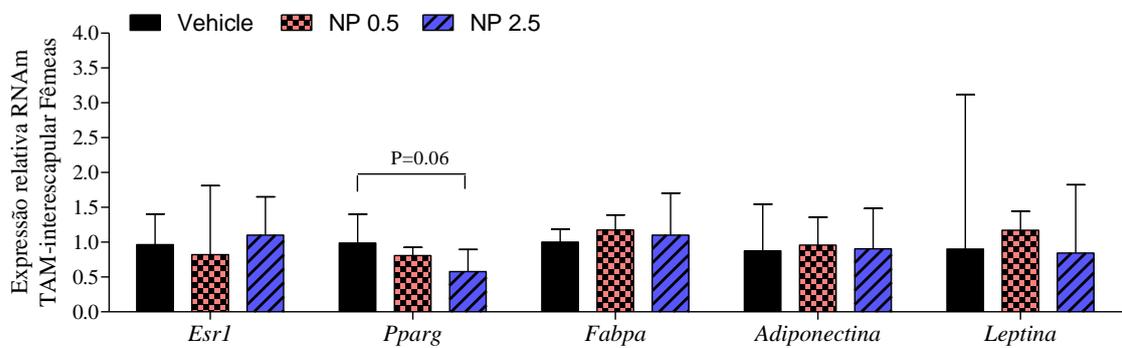
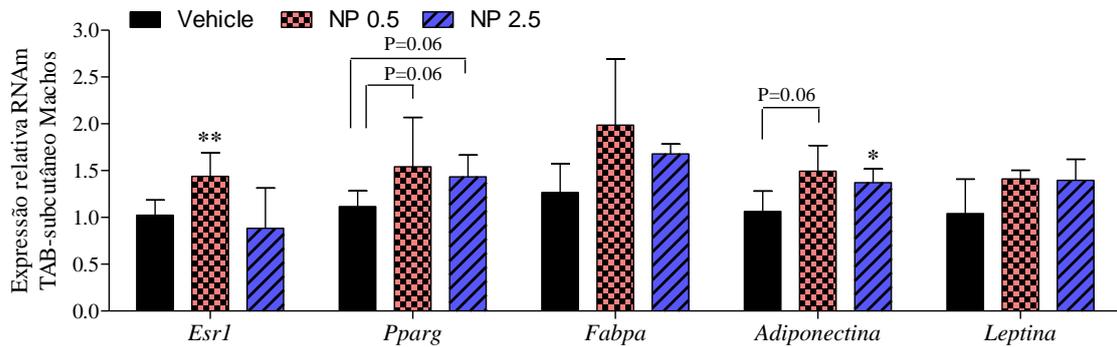
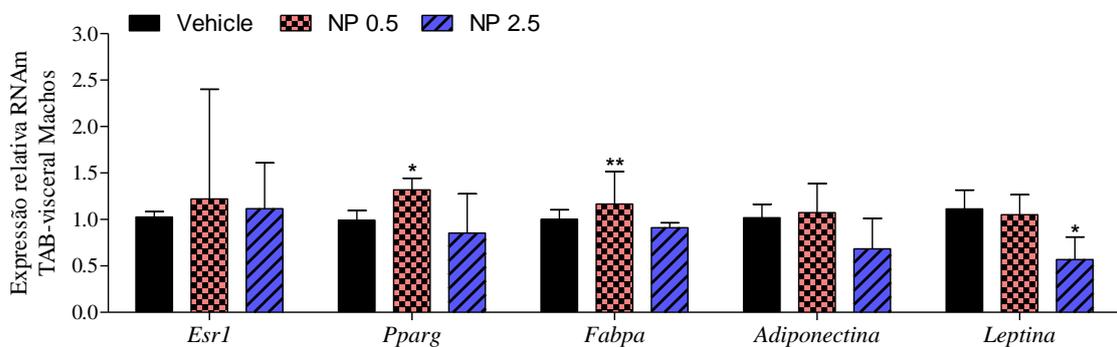


Figura 23 - Expressão relativa do RNAm da *Esr1*, *Pparg*, *Fabpa*, *Adiponectina* e *Leptina* nos tecidos adiposos visceral (perigonadal) (A), subcutâneo (inguinal) (B) e marrom (interescapular) (C) de camundongos C57BL/6 fêmeas tratados com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6ª à 20ª semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn. ** $p < 0,5$ vs veículo (n = 6 de camundongo por grupo). TAB: Tecido Adiposo Branco, TAM: Tecido Adiposo Marrom.

A



B



C

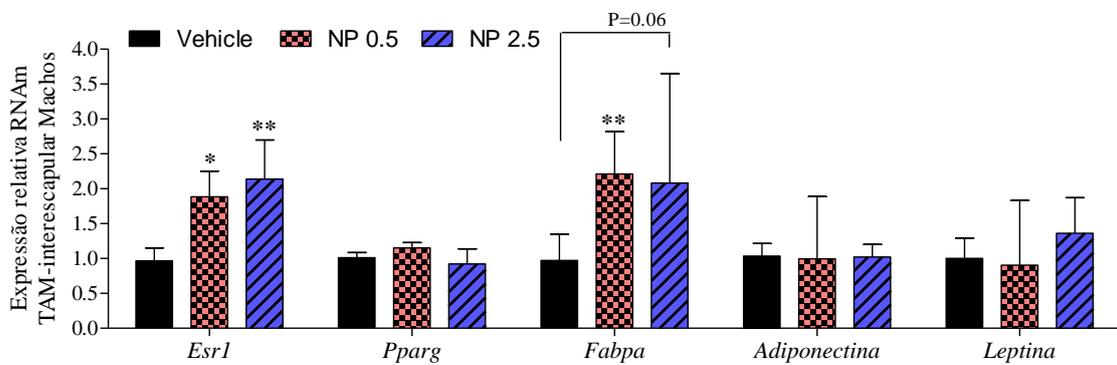


Figura 24 - Expressão relativa do RNAm da *Esr*, *Pparg*, *Fabpa*, *Adiponectina* e *Leptina* nos tecidos adiposos visceral (epididimal) (A), subcutâneo (inguinal) (B) e marrom (interescapular) (C) de camundongos C57BL/6 machos tratados com diferentes doses (0,5 ou 2,5 mg/kg/d) de NP durante 14 semanas, da 6^a à 20^a semana de vida. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn. ** p < 0,5 vs veículo (n = 6 de camundongo por grupo). TAB: Tecido Adiposo Branco, TAM: Tecido Adiposo Marrom.

4.6 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DO ESTROMA VASCULAR DO TECIDO ADIPOSEO

A adipogênese em cultura foi avaliada pela determinação de um marcador do adipócito maduro, a expressão do RNAm do gene *Fabpa*. As células do estroma vascular dos tecidos

adiposos brancos subcutâneos e visceral de camundongos fêmeas e machos. Foram observados aumento da expressão gênica da *Fabpa* nas células isoladas do tecido adiposo branco subcutâneo de fêmeas tratadas com NP nas concentrações de 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M, e rosiglitazona (controle positivo) quando comparadas ao DMSO (Figura 25). Ainda nas fêmeas, foi observado aumento na expressão do gene da *Fabpa* nas células derivadas do tecido adiposo branco visceral tratadas com NP nas concentrações de 10^{-9} , 10^{-8} M e rosiglitazona (controle positivo) quando comparados ao DMSO (Figura 26).

Nas células do estroma vascular do tecido adiposo branco subcutâneo e visceral dos machos não foram observadas diferenças estáticas entre as células tratadas e não tratadas com o NP (Figuras 27 e 28).

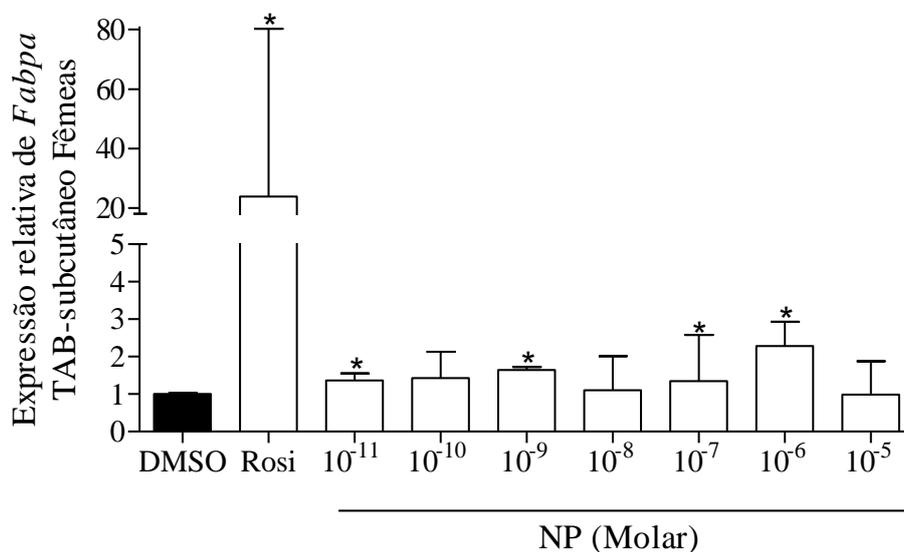


Figura 25. Expressão relativa de *Fabpa* em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo subcutâneo de camundongos fêmeas induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias. Ao final deste período, foi extraído o RNA total para determinação da expressão relativa de *Fabpa*, normalizado para *Gapdh* (gene referência). Dados expressos como mediana e intervalo interquartil de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs DMSO, pelo teste Mann-Whitney. TAB: Tecido Adiposo Branco, NP: Nonilfenol, Rosi: Rosiglitazona 10^{-5} M.

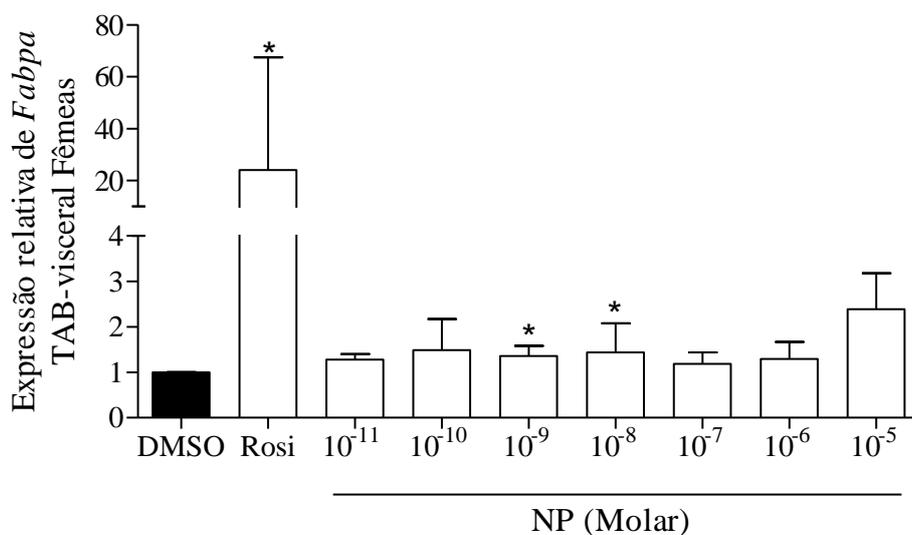


Figura 26. Expressão relativa de *Fabpa* em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo visceral de camundongos fêmeas induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias. Ao final deste período, foi extraído o RNA total para determinação da expressão relativa de *Fabpa*, normalizado para *Gapdh* (gene referência). Dados expressos como mediana e intervalo interquartil de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs DMSO, pelo teste Mann-Whitney. TAB: Tecido Adiposo Branco, NP: Nonilfenol, Rosi: Rosiglitazona 10^{-5} M.

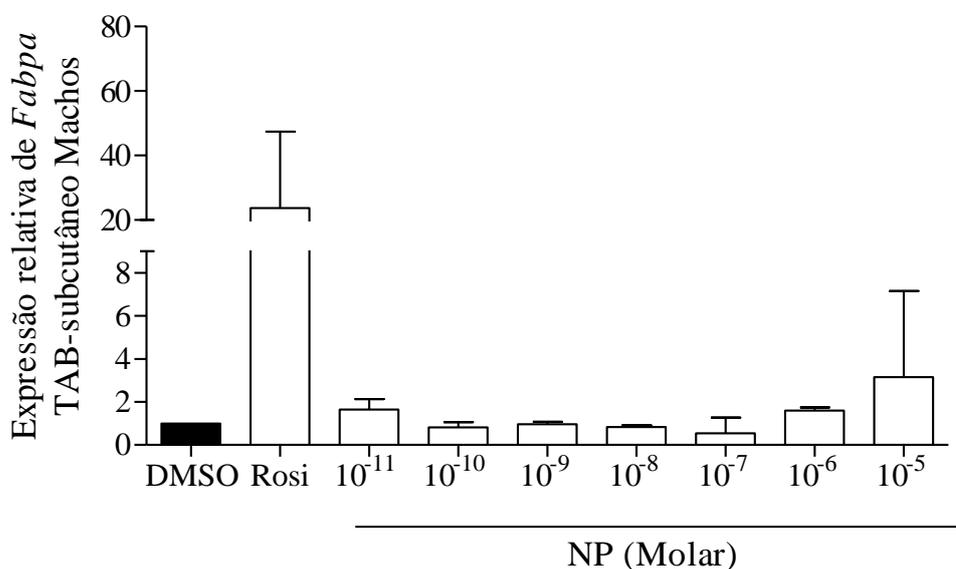


Figura 27. Expressão relativa de *Fabpa* em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo visceral de camundongos machos induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias. Ao final deste período, foi extraído o RNA total para determinação da expressão relativa de *Fabpa*, normalizado para *Gapdh* (gene referência). Dados expressos como mediana e intervalo interquartil de 3 experimentos independentes. Teste Mann-Whitney. TAB: Tecido Adiposo Branco, NP: Nonilfenol, Rosi: Rosiglitazona 10^{-5} M.

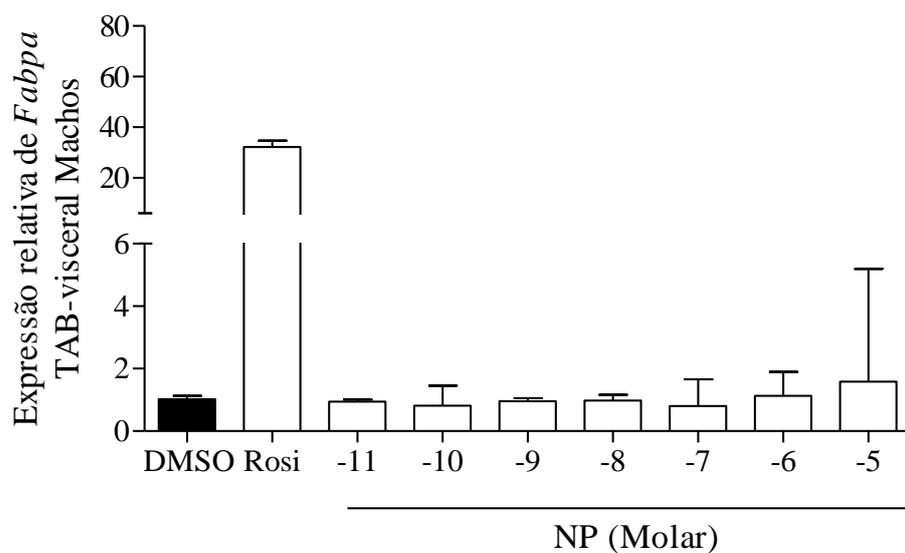


Figura 28. Expressão relativa de *Fabpa* em células do estroma vascular derivadas do tecido adiposo visceral de camundongos machos induzidas a se diferenciar em adipócitos com 500 μ M de IBMX, 5 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante 14 dias. Ao final deste período, foi extraído o RNA total para determinação da expressão relativa de *Fabpa*, normalizado para *Gapdh* (gene referência). Dados expressos como mediana e intervalo interquartil de 3 experimentos independentes. Teste Mann-Whitney. TAB: Tecido Adiposo Branco, NP: Nonilfenol, Rosi: Rosiglitazona 10^{-5} M

5 DISCUSSÃO

Em 2006, Grun e Blumberg propuseram a hipótese da existência dos “obesogênicos ambientais”, segundo a qual compostos químicos poderiam perturbar o sistema endócrino e influenciar a adipogênese e a obesidade. Esses obesogênicos seriam compostos químicos encontrados no ambiente podendo ser naturais ou sintéticos capazes de promover a obesidade, aumentando o número de células de gordura ou o armazenamento de gordura nos adipócitos existentes (GRUN e BLUMBERG, 2006). O NP é considerado um DE estrogênico (SOTO et al., 1991) com capacidade de estimular a proliferação de adipócitos já diferenciados em cultura de células (MASUNO et al., 2003). Estudos com animais mostraram que o efeito obesogênico do NP podem afetar gerações, quando há exposição pré-natal (HAO et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

Os mecanismos pelos quais o NP atua ainda não estão claros. Sabe-se que ele se liga aos receptores de estrogênio e inibe competitivamente os estrogênios naturais. O NP mimetiza o hormônio natural 17β -estradiol e, assim, compete com o hormônio endógeno pela ligação com o ER (Soares et al., 2008).

Em nosso estudo, observamos que camundongos fêmeas e machos com alimentação rica em gordura e expostos ao NP (0,5 e 2,5 mg/kg/d), através da água de beber, no início da puberdade e na vida adulta, não tiveram diferença no peso corporal e no ganho de peso. Bem como não observamos diferença nos pesos dos tecidos adiposos e fígado de camundongos fêmeas e machos. Uma de nossas hipóteses, seria que o efeito obesogênico de uma dieta com conteúdo muito alto de lipídeos (60%) possa ter sido maior que o efeito obesogênico do NP impedindo a visualização do efeito deste nos animais.

Outra hipótese que sugerimos para justificarmos o nosso resultado, seria em relação ao período da vida em que esses animais estariam sendo expostos ao NP. Talvez uma exposição mais prolongada durante a vida ao NP poderia promover ganho de peso mais tardiamente nos animais como observado no estudo realizado por Brulport, Le Corre, Chagnon et al.(2017). Eles avaliaram o efeito da exposição crônica ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um obesogênico ambiental, no peso corporal e ganho de peso. Em seu estudo os animais foram expostos ao DE a partir da 10^a semana de vida, eles observaram que o sobrepeso induzido pelo TCDD ocorreu nos machos na 23^a semana de vida e fêmeas com 35^a semanas de vida. Em nosso estudo, os animais foram expostos ao NP a partir da 6^a semana de vida e até a 20^a semana de

vida, não foi possível observar diferença no peso e no ganho de peso dos animais expostos ao NP em relação aos animais não expostos.

Outro período de exposição crítico aos DE seria durante o desenvolvimento fetal intrauterino. Hao e colaboradores (2012) realizaram um estudo em que fêmeas grávidas eram expostas ao NP durante o período gestacional e 7 dias após a lactação. Os animais receberam NP por gavagem nas seguintes concentrações 0,05, 0,25 e 0,5 mg/kg por peso corporal. Nesse estudo eles observaram o que o NP na concentração menor induziu o desenvolvimento da obesidade, como aumento do peso e da massa gorda na prole, tanto em fêmeas quanto nos machos. Em nosso trabalho avaliamos a exposição no início da puberdade até a vida adulta e para mimetizar a via de exposição ao NP, ele foi colocado na água de beber, diferente do estudo anterior que administrou por gavagem. A gavagem intragástrica permite controlar a dose administrada a cada animal e ser reproduzível ao longo do tempo (BRULPORT, LE CORRE, CHAGNON et al., 2017). E também, a exposição por gavagem é uma dose elevada em pouco tempo, ao passo que na água de beber a exposição é menor porém por mais tempo (VANDENBERG et al., 2014).

Em estudo multigeracional, observou-se também efeito do NP sobre o peso corporal nas gerações F1 e F2 em machos e fêmeas acompanhados até a 26^a semana de vida (F1) e 13^a semana de vida (F2), e alteração na expressão de genes envolvidos na adipogênese e lipogênese no tecido adiposo visceral (ZHANG et al., 2014). Nesse estudo, fêmeas grávidas foram expostas ao NP durante o período gestacional e 21 dias após esse período. O NP foi administrado por gavagem nas concentrações de 5, 25 e 125 µg/kg/d e foi analisado o efeito do NP nas gerações F1 e F2. Foi observado, além do aumento do peso, alterações nos genes envolvidos na adipogênese e lipogênese como *Ppary*, *Srebp-1*, *Lpl* e *Fas* no tecido adiposo branco nas gerações F1 e F2 (ZHANG et al., 2014). E diminuição dose dependente do RNAm e da proteína do *Esr1* no tecido adiposo visceral de fêmeas e machos (ZHANG et al., 2014).

Em nosso estudo *in vivo* também observamos efeito do NP em camundongos fêmeas e machos, quando avaliamos a expressão gênica de genes adipogênicos e lipogênicos nos depósitos dos tecidos adiposos visceral (epididimal ou perigonadal), subcutâneo (iguinal) e marrom. No tecido adiposo subcutâneo de machos observamos tendência no aumento da expressão do gene do *Ppary* e aumento significativo da expressão do gene da *Adiponectina*. Ainda nesses animais, no visceral observamos o aumento da expressão do gene do *Ppary* e *Fabpa*, e diminuição da expressão do gene da *Leptina*, e no marrom interscapular observamos

aumento da expressão do gene da *Fabpa*. Enquanto no subcutâneo das fêmeas o NP diminuiu a expressão do gene da *Adponectina*, no visceral aumentou a expressão do gene do *Ppary* e no marrom interescapular observamos tendência de diminuir *Ppary*. Observamos que as alterações desses genes foram mais visíveis nos machos do que nas fêmeas. Dessa forma, observamos um dimorfismo sexual relacionado ao efeito do NP.

Os hormônios sexuais parecem ter uma grande influência no tecido adiposo, no qual a atividade e concentração de receptores expressos nos tecidos adiposos branco e marrom se correlacionam com várias funções biológicas, dentre elas, o controle da biogênese mitocondrial e também sobre os receptores adrenérgicos e atividade lipolítica no tecido adiposo marrom (WADE e GRAY, 1979; MONJO et al., 2003; RODRIGUEZ-CUENCA et al., 2007; LAW et al., 2014). Esses hormônios também podem promover efeitos indiretos através de respostas hipotalâmicas que regulam o apetite influenciando a adiposidade (WADE e GRAY, 1979; ZENGIN et al, 2010; LAW et al., 2014).

Dados dos estudos anteriores indicam, que o 17β -estradiol e a progesterona promovem aumento do tamanho e número de gotículas lipídicas nas células do tecido adiposo marrom, enquanto a testosterona promove o aumento da capacidade metabólica da célula (RODRIGUEZ et al, 2002; LAW et al., 2014). Enquanto no tecido adiposo branco os esteroides sexuais podem ter influência sobre os tecidos adiposos regulando a massa gorda, podendo alterar o número e tamanho dos adipócitos, além da distribuição da gordura corporal apresentar de forma diferente dependendo do gênero (ANDERSON et al, 2001).

Os estrogênios desempenham um papel importante na regulação da deposição adiposa, como também regulam os principais eventos de desenvolvimento da adipogênese (ANDERSON et al, 2001; VOM SAAL et al., 2012). Assim, embora os fatores que regulam a proliferação ou diferenciação dos pré-adipócitos não sejam bem compreendidos, o estrogênio parece estar envolvido em seu desenvolvimento. Estudos demonstraram que o 17β -estradiol aumenta a adipogênese em fibroblastos 3T3-L1 de camundongo que podem se diferenciar em pré-adipócitos e eventualmente adipócitos, bem como pré-adipócitos humanos ou de animais em cultura (ANDERSON et al.,2001; LEA-CURRIE, MONROE e MCINTOSH, 1999; VOM SAAL et al., 2012).

Existem duas isoformas do ER, ESR1 e ESR2, cada isoformas e seus co-reguladores determinam nas células as consequências biológicas específicas em resposta a substâncias químicas estrogênicas (TSOU et al., 2017). O ESR1 é predominante expresso no tecido adiposo,

diferente do ESR2 que não é expresso no tecido adiposo (PEDERSEN et al., 2004). Dessa forma, o ESR1 possui um papel central na biologia dos adipócitos e no controle do metabolismo energético em resposta a substâncias químicas estrogênicas (TSOU et al., 2017). Em nosso estudo, como o NP é um composto estrogênico, analisamos a expressão gênica do *Esr1* nos tecidos adiposos branco visceral e subcutâneo de fêmeas e machos. Observamos uma diminuição significativa da expressão do *Esr1* no subcutâneo de fêmeas tratadas com a menor dose do NP 0,5 mg/kg/d. Uma redução de *Esr1* nas fêmeas promove um padrão de adiposidade "masculino", ou seja, aumento da deposição do tecido adiposo visceral por meio de remodelação hipertrófica e hiperplásica do tecido, mas sem a homeostase da glicose comprometida exibida pelos homens (DAVIS et al., 2013; LAW et al., 2014). Porém nos machos, observamos aumento na expressão gênica desse receptor no subcutâneo na menor concentração de NP e no marrom observamos o aumento dose dependente da expressão de *Esr1*. Diferente do estudo multigeracional de realizado por Zhang e colaboradores (2014) em foi observado uma diminuição do *Esr1*. Essas diferenças sugerem que o efeito do NP sobre a expressão do *Esr1* e, possivelmente, sobre a atividade estrogênica no tecido adiposo, possam ser dependentes do período da vida em que ocorre a exposição.

A adiponectina e a leptina são adipocinas importantes na regulação do metabolismo da glicose e lipídios, sinalização da insulina e vias inflamatórias (SHABANI, EMAMGHOLIPOUR e DOOSTI, 2017). As alterações da função fisiológica do tecido adiposo na obesidade incluem modificações do padrão de secreção da adiponectina e insulina (PETRAKIS et al., 2017). Em nosso estudo avaliamos a expressão dos genes da *Leptina* e *Adiponectina* nos tecidos adiposos de fêmeas e machos. Observamos diminuição da expressão da *Adiponectina* no subcutâneo das fêmeas e nenhuma alteração na expressão do gene da *Leptina* nos tecidos adiposos. Nos machos, observamos aumento da expressão do gene da *Adiponectina* no subcutâneo e diminuição da expressão do gene da *Leptina* no visceral. Geralmente, no tecido adiposo disfuncional a *Adiponectina* apresenta-se diminuída (PETRAKIS et al., 2017), conforme observamos nas fêmeas, porém não nos machos expostos ao NP. Entretanto, nossos dados são restritos à expressão do RNAm dos genes que codificam estes hormônios, não tendo sido avaliada sua concentração plasmática. Além disso, a relevância fisiológica das modificações da expressão gênica que encontramos é limitada pela ausência de alterações do ganho de peso ou da homeostase da glicose dos animais expostos ao NP em relação ao controle.

O *Ppary* e *Fabpa* são marcadores adipogênicos expressos nos adipócitos maduros. Em nosso estudo observamos nos animais tratados com NP o aumento da expressão do gene do *Ppary* no tecido adiposo subcutâneo das fêmeas e em todos os tecidos adiposos avaliados dos machos. Diferentemente da expressão do gene da *Fabpa* aumentou no visceral e marrom dos machos. Esses dados, em conjunto, sugerem um efeito obesogênico fraco do NP em cenário de dieta hiperlipídica e são consistentes com a observação de que não houve ganho de peso adicional ou modificação da tolerância à glicose nos animais tratados com NP, em relação ao controle.

Alguns DE podem alterar a homeostase da glicose, causando intolerância à glicose, hiperglicemia e resistência à insulina, como é caso das PCB (BAKER et al., 2013; KIRKLEY e SARGIS, 2014). Baker e colaboradores observaram que animais não obesos expostos aos PCB-77 apresentaram-se menos tolerantes à glicose e mais resistentes à insulina. Nesse mesmo estudo, foi apresentado o seguinte delineamento experimental: um grupo de animais expostos ao PCB-77 foi alimentado com dieta hiperlipídica por 12 semanas (fase de ganho de peso), em seguida voltaram a receber dieta normolipídica por 4 semanas (fase de perda de peso). Esse grupo de animais foi submetido ao TTG e TTI nas diferentes fases. Surpreendentemente, na fase de ganho de peso não foi observado o efeito do PCB-77 sobre a homeostase da glicose, porém na fase de perda de peso os animais mostraram piora da intolerância à glicose e sensibilidade à insulina (BAKER et al., 2013). Estudos anteriores mostraram que as concentrações plasmáticas do PCB aumentaram em indivíduos obesos com perda de peso, o que sugere uma possível justificativa para a alteração da homeostase da glicose no período de alimentação com dieta normolipídica e perda de peso (CHEVRIER et al., 2000).

Em nosso estudo, os animais também receberam dieta hiperlipídica e foram induzidos à obesidade. À semelhança do estudo anterior, de Baker et al. (2013), não foi observada diferença na homeostase da glicose entre os grupos que receberam somente veículo e aqueles que receberam NP (0,5 e 2,5 mg/kg). Todos mostraram-se intolerantes à glicose e hiperglicêmicos, de acordo com o esperado considerando a alimentação com dieta hiperlipídica. Assim como o PCB-77, o NP pode acumular-se no tecido adiposo, por ser um composto com características lipofílicas (LOPEZ-ESPINOSA et al., 2009). Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, em que camundongos *Swiss* foram tratados com dieta normolipídica, foi observada melhora da tolerância à glicose em animais tratados com NP quando comparados ao veículo (DIAS, 2015). Entretanto, devemos levar em consideração a utilização de um modelo animal diferente, uma vez que no presente estudo foram usados camundongos C57BL/6 e submetidos

a dieta hiperlipídica. Além das diferenças das linhagens, é possível que a dieta hiperlipídica tenha mascarado a observação de alterações leves da homeostase da glicose determinadas pelo NP.

No estudo de Yu et al (2018), em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta rica em sacarose e rica em gorduras (*High sucrose-high fat diet*) (23,53% de lipídeo + açúcar 66,14%) expostos ao NP por gavagem nas concentrações de 0,02 µg/kg/d, 0,2 µg/kg/d e 2 µg/kg/d, durante 180 dias. Os autores observaram que a exposição crônica a baixas doses de NP associada à referida dieta levou a resistência à insulina e deficiência de secreção de insulina pelas células β-pancreáticas. Devemos considerar que a dieta usada no estudo anterior além de possuir teor mais alto de lipídeos do que a dieta normolipídica, ela também possui teor de açúcar elevado, diferindo da usada em nosso estudo que possui somente alto teor de lipídeos.

Adachi e colaboradores (2015) examinaram a secreção de insulina em cultura de células das ilhotas pancreáticas de ratos após exposição aguda (60 min) ou exposição crônica (24 h) ao NP em concentrações de 0,1, 1, 10, 100 µg/L. A exposição aguda ao NP não alterou a liberação de insulina após a administração de sobrecarga de glicose, porém a secreção de insulina foi induzida com a exposição crônica ao NP via receptor estrogênico (ADACHI et al., 2015). Em nosso trabalho avaliamos a tolerância à glicose e insulina, não observamos nenhum efeito do NP *in vivo* na homeostase da glicose e sensibilidade à insulina quando alimentados com dieta rica em lipídeos.

Estudos *in vivo* mostram que a exposição aguda, por via oral durante 7 dias, ao NP nas concentrações de 1,5, 15 e 150 mg/kg/d diminuíram a concentração plasmática de glicose e aumentaram as concentrações de insulina plasmática (JUBENDRADAS et al, 2011). Além disso, foi observado que o NP causou dano oxidativo no pâncreas e hiperinsulinemia nos ratos, diminuiu expressão de proteínas do transportador de glicose, GLUT 2. O mesmo grupo de pesquisadores do estudo anterior, avaliou a exposição crônica ao NP nas mesmas doses (1,5, 150 e 1500 mg/kg) e via de administração, porém em um período mais prolongado, durante 45 dias. O NP alterou no fígado a sinalização da insulina e aumentou as concentrações plasmáticas de glicose e insulina. (JUBENDRADAS et al, 2012). Sugerindo que o tempo de exposição ao composto e a via de administração podem ter efeitos diferentes sobre a homeostase da glicose e como também sobre órgãos, como fígado e pâncreas. Em nosso estudo, usamos doses menores de NP (0,5 e 2,5 mg/kg/d) por um período maior (14 semanas) e via de exposição ao NP diferente.

Assim como são capazes de alterar a homeostase da glicose, alguns DE também podem alterar o metabolismo dos lipídeos e a função de órgãos importantes na regulação do metabolismo glicídico e lipídico, como o fígado. Em nosso estudo, analisamos os tecidos adiposos brancos visceral e subcutâneo, o tecido adiposo marrom e o fígado, que estão diretamente envolvidos na homeostase dos lipídeos. Não foi observada diferença entre a massa dos depósitos dos tecidos e do fígado nos animais tratados com NP, em comparação com os controles. Também não foi observada diferença morfológica entre os tecidos adiposos e hepático de animais tratados com NP, em comparação com o controle.

Ainda, para observar possíveis efeito do NP sobre o fígado e os lipídeos, foram realizadas análises bioquímicas no soro. Especificamente, foram determinadas as concentrações séricas das transaminases (ALT e AST), fosfatase alcalina e Gama-GT, além dos colesterol HDL e triglicerídeos. Nas fêmeas, observamos tendência de diminuição da ALT e da AST e, nos machos, de diminuição da AST de animais tratados com NP na dose mais alta, em comparação com o controle. Kazemi et al. (2016), em estudos realizados com ratos *Wistar* machos expostos ao NP por via oral, mostraram que doses mais baixas de NP (5, 50 e 125 μ g/kg) também tendem a diminuir as concentrações séricas de ALT, porém a aumentar a de AST, embora sem significância estatística. Ainda neste estudo, foi observado aumento significativo dose-dependente da fosfatase alcalina nos animais tratados com NP. Em nosso estudo, tanto as fêmeas quanto os machos mostraram tendência de aumento de dose-dependente da fosfatase alcalina sérica, porém não significativa. O aumento da concentração sérica destas enzimas hepáticas pode ser indícios de efeito nocivo hepático causado pelo NP (KAZEMI et al., 2016). Entretanto, foi observado nas fêmeas e machos tendência de diminuição não significativa de gama-GT, na dose de 2,5 mg/kg, que em conjunto nossos dados sugerem que o NP nas concentrações testadas não apresentou sinais de efeito tóxico sobre o fígado, embora os desfechos analisados não sejam considerados padrão ouro para determinação de toxicidade.

Na avaliação do colesterol HDL sérico, observamos nos machos aumento significativo nos animais tratados com a maior dose de NP. Esses dados foram semelhantes aos de Yu et al. (2017), que observaram que ratos *Sprague-Dawley* machos tratados com dieta hipercalórica e NP apresentaram aumento do colesterol HDL. Nesse mesmo estudo, foi observado pelos pesquisadores aumento dos triglicerídeos. Entretanto, no presente estudo foi observada tendência de diminuição dos triglicerídeos.

Em estudo multigeracional, Zhang et al. (2018) avaliaram o efeito do NP sobre o fígado de fêmeas e machos F1 e F2 submetidos a exposição ancestral (F0) ao NP através da avaliação das enzimas hepáticas e do perfil lipídico. Fêmeas grávidas (F0) foram expostas ao NP durante o período gestacional e lactação. O NP foi administrado por gavagem nas concentrações de 5, 25 e 125 µg/kg/d. Eles observaram diminuição das concentrações plasmáticas de HDL em fêmeas da F1 e não observaram alterações na ALT e AST nos animais F1 e F2 expostos ao NP (Zhang et al 2018). Em nosso estudo, em exposição concorrente, e fora do contexto multigeracional, observamos o aumento das concentrações plasmáticas de HDL nos machos, porém não observamos o mesmo nas fêmeas e não observamos alterações nas enzimas hepáticas de machos e fêmeas. O aumento do HDL em cenário de exposição concorrente poderia ser explicado pelos efeitos estrogênicos do NP.

Como mencionado anteriormente, as células SVF derivadas do tecido adiposo contém populações de células heterogêneas, dentre elas as células progenitoras/células-tronco mesenquimais, pré-adipócitos, células endoteliais, pericitos, células T e macrófagos M2. As células-tronco/progenitoras mesenquimais derivadas de SVF podem ser facilmente expandidas *in vitro* e têm o potencial de criar diversas linhagens de células (HAN et al., 2015). Experimentos *in vitro* demonstraram que os DE podem promover a diferenciação de células SFV em adipócitos maduros (CAMPIOLI et al., 2015) e alterações nas células mesenquimais derivadas do tecido adiposo, aumentando a diferenciação adipogênica, diminuindo a diferenciação osteogênica, ativando citocinas pró-inflamatórias, aumentando o estresse oxidativo e causando alterações epigenéticas (BATEMAN et al, 2017).

Para avaliar o efeito adipogênico do NP *in vitro*, usamos cultura primária de células SVF derivadas de depósitos de tecidos adiposos brancos subcutâneo e visceral de fêmeas e machos. Essas células possuem capacidade de se diferenciar em vários tipos de celulares, dentre eles em adipócitos (RODEHEFFER et al., 2008). Observamos o efeito do NP nas células SVF derivadas do subcutâneo de camundongos fêmeas sobre a expressão do gene marcador de adipócito maduro, *Fabpa*, que aumentou significativamente nas concentrações de 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M e nas células SVF derivadas do tecido adiposo do visceral das fêmeas observamos o aumento da expressão desse mesmo gene nas concentrações de 10^{-9} e 10^{-8} M. Porém, nas células SVF derivadas do tecido adiposo subcutâneo e visceral de machos não observamos nenhum efeito do NP estatisticamente significativo. Alguns estudos *in vitro*, observaram o potencial adipogênico do NP em cultura de células imortalizadas como os pré-adipócitos 3T3-L1. Masuno et al. (2003) observaram o efeito de NP sobre a proliferação celular e a formação de

adipócitos em culturas de células 3T3-L1 totalmente diferenciadas. Os seus resultados indicaram que o NP nas concentrações 5 e 10 µg/mL foi capaz de estimular a proliferação de células 3T3-L1, porém inibiu a expressão do marcador de adipócito maduro nas células 3T3-L1 na concentração de 10 µg/mL, após dois dias de indução da diferenciação (com IBMX, dexametasona e insulina) e tratamento com o DE durante 8 dias. Em um outro estudo, Pereira-Fernandes et al. (2013) observaram, nas células 3T3-L1, inibição da adipogênese em células expostas ao NP isoladamente durante 10 dias e em células expostas ao NP durante dois dias (indução) e à combinação de NP e insulina durante 8 dias. Eles observaram também, em ensaio de transativação, que o NP não ativou o PPAR γ , principal receptor na cascata adipogênica. Porém, contrariando os resultados encontrados pelos pesquisadores dos estudos anteriores, Hao et al. (2012) observaram que o NP nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M foi capaz de induzir a diferenciação de adipócitos murinos 3T3-L1 de forma dose-dependente. As células foram induzidas a diferenciação adipocitária apenas com insulina e expostas ao NP durante 8 dias.

Nossos dados contrastam com os descritos anteriormente e essas diferenças podem ser devidas às diferentes linhagens celulares, concentrações de NP e tempo de tratamento testados, além do coquetel adipogênico usado para estimular as diferentes vias da cascata adipogênica. Pereira-Fernandes et al. (2013) e Hao et al. (2012) usaram em seu estudo somente a insulina como estímulo da via adipogênica. Considerando que os DE são caracterizados por curvas dose-resposta não monotônicas, em que as estimativas de efeitos benéficos ou adversos não podem ser determinadas a partir da direção da inclinação da curva dose-resposta e que, assim como os hormônios eles funcionam em concentrações muito baixas (VANDENBERG et al., 2012), observamos essas características em nosso estudo com relação ao efeito do NP sobre as células SVF derivadas do tecido adiposo tratadas com concentrações crescentes do DE de 10^{-11} a 10^{-5} M, e na expressão do gene da *Fabpa*, marcador de adipócito maduro. Ou seja, muitos dos efeitos que ocorrem em resposta a doses baixas de hormônios não ocorrem em doses muito mais altas e, em muitos casos, são observados efeitos opostos de doses baixas e altas. Assim, a dose utilizada em experiências *in vitro* e *in vivo* deve ser levada em consideração na avaliação da relevância fisiológica dos resultados (VOM SAAL et al., 2012)

Observamos também em nosso estudo que a expressão do gene da *Fabpa* foi diferente em resposta à exposição do NP nas diferentes concentrações usadas (10^{-11} a 10^{-5} M), ou seja, nas células SVF derivadas do tecido adiposo subcutâneo o NP 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M aumentou significativamente a expressão do gene da *Fabpa*, porém nas células SVF derivadas do tecido adiposo do visceral observamos esse aumento somente nas concentrações de 10^{-9} e

10^{-8} M, podendo ser justificado pela diferença no comportamento entre os dois depósitos de tecido adiposo. O comportamento metabólico dos adipócitos maduros é diferente dependendo do depósito do tecido adiposo. Por exemplo, há diferenças na resposta lipolítica à estimulação adrenérgica entre os depósitos visceral e subcutâneo (OSTMAN et al., 1979; MORIMOTO, TSUJITA e OKUDA, 1997; ROSEN et al., 2000). Diferenças no comportamento das células de gordura podem ter consequências clínicas muito importantes; seres humanos (geralmente do sexo masculino) com adiposidade visceral aumentada têm um risco maior de resistência à insulina, dislipidemia e doença cardiovascular do que aqueles de peso equivalente, mas um grau mais alto de adiposidade subcutânea (REAVEN, 1988; ROSEN et al., 2000).

A cultura primária de células SVF utilizado em nosso estudo é um modelo relevante para analisar os efeitos dos DE quando comparada a linhagens imortalizadas de pré-adipócitos, pois mimetiza o cenário fisiopatológico de exposição a estes compostos. Foram observadas, por exemplo, alterações induzidas pelos DE em células mesenquimais, como as alterações epigenéticas, as quais podem predispor essas células a adipogênese, levando à obesidade mais tarde na vida (CREWS e MCLACHLAN, 2006; JANESICK e BLUMBERG, 2011; BATEMAN et al, 2017). Além disso, a exposição contínua ao longo da vida aos DE pode exacerbar ainda mais a situação, promovendo a adipogênese e alterando o metabolismo em uma população já suscetível à obesidade (HEINDEL et al., 2015; BATEMAN et al, 2017).

A exposição humana aos DE é de difícil quantificação, sabemos que estamos expostos a vários compostos ao mesmo tempo e por vias diferentes de exposição. Uma característica peculiar dos DE seria a impossibilidade de prever o efeito através da dose de exposição a eles. Em nosso estudo, avaliamos a exposição *in vivo* somente a duas concentrações (0,5 e 2,5mg/kg/d). Talvez essas concentrações não afetem de forma evidente o metabolismo dos animais, mas afetem o sistema reprodutor, o que não foi objetivo desse trabalho. Outra característica dos DE é a lipofilicidade, de forma que eles poderiam se acumular no tecido adiposo e não serem liberado na corrente sanguínea e, conseqüentemente, não produzirem efeito no organismo. Dessa forma, é possível que no contexto de perda de peso, induzida por restrição calórica, os DE fossem liberados do tecido adiposo e apresentassem algum efeito sobre a homeostase. Além disso, é possível que a dieta hiperlipídica utilizada, como 60% de seu conteúdo calórico representado por lipídeos, tenha mascarado um eventual efeito obesogênico fraco do NP. Seriam, assim, necessários estudos complementares com dieta com teor de lipídeos menor (30% de lipídeos) ou até mesmo dieta normolipídica (15% de lipídeos), que permitiria uma melhor observação do efeito do DE. Ainda, em nosso estudo, não observamos efeito do

NP em concentração ambientalmente relevante sobre a homeostase da glicose, em consistência com os dados de ausência de ganho de peso. Entretanto, observamos efeitos dismórfico sexuais sobre a expressão de genes relacionados à diferenciação e função do tecido adiposo *in vivo* e efeitos discretos e sexo e depósito-dependente sobre a adipogênese em cultura. O significado fisiológico destes dados precisaria ser confirmado por ensaios de expressão proteica ou atividade de alguns desses produtos, em complemento à expressão gênica. Por fim, a ausência de efeitos significativos da exposição ao NP sobre o peso e a homeostase corporal sugerem que os efeitos deste DE possam ser mais significativos quando a exposição ocorre em períodos críticos do desenvolvimento.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, observamos que a exposição de camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas ao NP, desde o início da puberdade até a vida adulta, nas concentrações de 0,5 e 2,5 mg/kg/d e em cenário de dieta hiperlipídica, não modificou o ganho de peso, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, e determinou modificações discretas na expressão de genes relacionados à adipogênese e lipogênese, na dependência do depósito de tecido adiposo e do sexo. Em células SVF derivadas do tecido adiposo subcutâneo e visceral de fêmeas, porém não de machos, o NP apresentou efeito adipogênico fraco porém significativo, com efeito concentração-resposta não monotônico. Esses dados sugerem que a exposição a concentrações ambientalmente relevantes do NP, fora de períodos críticos do desenvolvimento, não apresenta efeitos significativos sobre a biologia do tecido adiposo ou homeostase metabólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, T. et al. Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n.5, p. 713–719, 2005.

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 11, p. 327–32, 2000.

ALBERTI, K.G. et al., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v.120, n.16, p. 1640-5, 2009.

ANDERSON, L.A. et al., The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, p. 5045–5051, 2001.

BAILLIE-HAMILTON, P.F. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. **J Altern Complement Med.**, v.8, p. 185-92, apr 2002.

BAKER, N.A et al. Coplanar Polychlorinated Biphenyls Impair Glucose Homeostasis in Lean C57BL/6 Mice and Mitigate Beneficial Effects of Weight Loss on Glucose Homeostasis in Obese Mice. **Environmental Health Perspectives.**, v. 121, n. 1, p. 105-110, 2013.

BATEMAN, M. E. et al. The Effects of Endocrine Disruptors on Adipogenesis and Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells: A Review. **Frontiers in endocrinology.**, v. 7 p. 171, 2017.

BONTJE, D. et al. Integrated Risk Assessment: Nonylphenol Case Study. Report Prepared For The Who/Unep/Ilo International Programme On Chemical Safety. WHO/IPCS/IRA/12/04; 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/methods/Nonylphenol.pdf>> Acesso em: 09 de set. de 2017.

BROOKE, L.; THURSBY, G.; Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Washington DC, USA: Report for the United States EPA, Office of Water, Office of Science and Technology. 2005. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-03/documents/ambient-wqc-nonylphenol-final.pdf>> Acesso: 09 de set. de 2017.

BRULPORT, A; LE CORRE, L.; CHAGNON, M.C. Chronic exposure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces an obesogenic effect in C57BL/6J mice fed a high fat diet. **Toxicology**, v. 390, p. 43-52, 2017.

CAMPIOLI, E. et al. Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue. **Environ Res.**, v. 140, p. 145-56, 2015.

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

CHEVRIER, J. et al. Body weight loss increases plasma and adipose tissue concentrations of potentially toxic pollutants in obese individuals. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 24, n. 10, p. 1272-8, 2000.

CIAIS, D.; BAILLY, S. BMPs go for apelin to regulate angiogenesis. Focus on “inhibition of apelin expression by BMP signaling in endothelial cells”. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 303, p. C1127–C1128, 2012.

COELHO M, OLIVEIRA T, FERNANDES R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of Medical Science : AMS.**, v. 9, n. 2, p. 191-200, 2013.

Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.**, v. 162, n. 1, p.156-9., 1987.

COOKE, P.S. et al. The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 178, n. 1-2, p. 147-5, 2001.

CREWS, D.; MCLACHLAN, J.A. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. **Endocrinology**, v. 147, n. 6 Suppl, p. S4–10, 2006.

DARBRE, P.D. Endocrine disruption and human health. **New York: Academic**; 2015.

DARBRE, P.D. Endocrine Disruptors and Obesity. **Curr Obes Rep.**, n. 6, v. 1, p. 18–27, 2017.

DAVIS, K.E., et al. The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. **Mol Metab.** v. 2, p. 227–42, 2013.

DE COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. **J Environ Public Health**, v. 2012, p. 713696, 2012.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. In: (Ed.). **Endocr Rev. United States**, v.30, p.293-342, 2009.

DIAS, J. C. *Efeitos do nonilfenol sobre a massa corporal, adiposidade e homeostase da glicose em camundongos*. 2015. 80 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

DUBOIS, S.G. et al. Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 9, p. 1543–1552, 2006.

ELOBEID, M. A.; ALLISON, D. B. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. In: (Ed.). **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.** England, v.15, p.403-8, 2008.

Endocrinology Society, 2014. Disponível em: <<https://www.endocrine.org/-/media/endosociety/files/advocacy-and-outreach/important-documents/introduction-to-endocrine-disrupting-chemicals.pdf?la=en>> Acesso em: 3 de out. de 2019

Environment and Climate Research Programme of DG XII of the European Commission. EUR 17549, The European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Report of Proceedings Weybridge, UK, 1996. Environment and Climate Research Programme of DG XII of the European Commission; Weybridge, UK: 1996.

FERRARA, F et al. Alkylphenols in adipose tissues of Italian population. **Chemosphere.**, n. 7, p. 1044-9, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr.**, v. 83, p. S192–203, 2007.

GAO, Q.; HORVATH, T.L. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**; v. 294, n. 5, p. E817-26, 2008.

GORE, A. C. et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. **Endocrine Reviews.**, v. 36.6, n. 2015, p. E1–E150, 2015.

GORE, A.C; HEINDEL, J.J; ZOELLER, R.T. Endocrine disruption for endocrinologists (and others) **Endocrinology.**, v 147, p. S1–3, 2006.

GRAY, S.L; VIDAL-PUIG, A.J. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. **Nutr Rev.** v. 65, p. 7–12, 2007.

GRUN, F; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology.**, v. 147, n. 6 Suppl, pS50–S55, 2006.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. In: (Ed.). **Circulation.** United States, v.109, p.433-8, 2004.

GUENTHER, K. et al. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. **Environ Sci Technol.**, v. 36, p. 1676–80, 2002.

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

HAN. S., et al. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, v. 25, n. 2, p. 145-52, 2015.

HAO, C. J. et al. The endocrine disruptor 4-nonylphenol promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. In: (Ed.). **Cell Physiol Biochem.** Switzerland: Basel., v.30, p.382-94. 2012.

HEINDEL, J. J. et al. Endocrine disruptors and obesity. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 11, n. 11, p. 653-61, 2015.

HEINDEL, J.J, et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. **Reprod Toxicol.**, v. 68, p. 3-33, 2017.

JANESICK, A.S.; BLUMBERG, B. Obesogens: an emerging threat to public health. **Am J Ob Gynecol.**, v. 214, p. 559–65, 2006.

JANESICK, A; BLUMBERG, B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. **Birth Defects Research C.** v. 93, n. 1, p. 34–50, 2011.

JIE, Y et al. Mechanism of nonylphenol-induced neurotoxicity in F1 rats during sexual maturity. **Wien Klin Wochenschr.**, v. 128, n. 11-12, p. 426-34, 2016.

JOYNER, J.M.; HUTLEY, L.J.; CAMERON, D.P. Estrogen receptors in human preadipocytes. **Endocrine.**, n. 15, p. 225–230, 2001.

JUBENDRADASS, R.; D'CRUZ, S.C.; MATHUR, P.P. Short-term exposure to nonylphenol induces pancreatic oxidative stress and alters liver glucose metabolism in adult female rats. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 25, p. 77–83, 2011.

JUBENDRADASS, R; D'CRUZ, S.C.; MATHUR, P.P. Long-term exposure to nonylphenol affects insulin signaling in the liver of adult male rats. **Human & Experimental Toxicology.**, v. 31, n. 9, p. 868–76, 2012.

KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B.M.; SEALE, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 546-559, 2015.

KAZEMI, S. et al. Nonylphenol induces liver toxicity and oxidative stress in rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 479, n. 1, p. 17–21, 2016.

KELISHADI, R.; POURSAFA, P.; JAMSHIDI, F. Role of Environmental Chemicals in Obesity: A Systematic Review on the Current Evidence. **Journal of Environmental and Public Health.**, v. 2013, p. 896789, 2013.

KIRKLEY, A.G.; SARGIS, R.M. Environmental Endocrine Disruption of Energy Metabolism and Cardiovascular Risk. **Current diabetes reports.**, v. 14, n. 6, p. 494, 2014.

KWACK, S.J. et al. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. **J Toxicol Environ Health A.** v. 65, n. 5-6, p. 419-31, 2002.

LAFONTAN, M.; GIRARD, J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. **Diabetes Metab**, v. 34, n. 4 Pt 1, p. 317-27, 2008.

LAW, J., et al. The influence of sex steroids on adipose tissue growth and function. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 19, n. 1, p. 13-24, 2014.

LEA-CURRIE, Y.R.; MONROE, D.; MCINTOSH, M.K. Dehydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 123, p. 17–25, 1999.

LEE, P.C; LEE. W. In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. **Bull Environ Contam Toxicol.**, v. 57, p. 341–8, 1996.

LEFTEROVA, M. I. et al. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. **Genes Dev.**, v. 22, p. 2941-2952, 2008.

LIN, C.S., et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. **Histol. Histopathol.**, v. 25, p. 807–15, 2010.

LIU, X. et al. Effects of nonylphenol exposure on expression of cell receptors and secretory function in mouse Sertoli TM4 cells. **Toxicol Lett**, v. 37, n. 2, p. 608-16, mar 2014.

LIU, X., SHI, H. Regulation of Estrogen Receptor α Expression in the Hypothalamus by Sex Steroids: Implication in the Regulation of Energy Homeostasis. **Int J Endocrinol.**, v. 2015, p. 949085, 2015.

LOPEZ-ESPINOSA, M.J et al. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. **Chemosphere.**, v. 76, p. 847–852, 2009.

LOWE, C.E.; O'RAHILLY, S., ROCHFORD, J.J. Adipogenesis at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 2681-2686, 2011.

MANZANO, M.A. et al. Effect of concentration on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. **Bull Environ Contam Toxicol** , v. 61, p. 489–96, 1998.

MASUNO, H. et al. Effect of 4-nonylphenol on cell proliferation and adipocyte formation in cultures of fully differentiated 3T3-L1 cells. In: (Ed.). **Toxicol Sci. United States**, v.75, p.314-20, 2003.

MCKINLAY, R. et al. Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. **Environ. Int.** v. 34, p. 168–83, 2008.

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

Ministério da Saúde- Vigitel Brasil 2018, Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>> Acesso em: 05 de setembro de 2019.

MONJO, M., et al. Direct effects of testosterone, 17 beta-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. **Endocrinology.**, n. 144, p. 4923–30, 2013.

MORIMOTO, C.; TSUJITA, T.; OKUDA, H. Norepinephrine-induced lipolysis in rat fat cells from visceral and subcutaneous sites: Role of hormone-sensitive lipase and lipid droplets. **J. Lipid Res.**, v. 38, p. 132–138, 1997.

NADAL, A. et al Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 13, n. 9, p.536-546, 2017.

NAYLOR, et al Alkylphenol ethoxylates in the environment. **Journal of the American Oil Chemists Society.**, v. 69, n. 7, p 695–703s, 1992.

NEEL, B.A.; SARGIS, R.M. The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. **Diabetes.** v. 60, p. 1838-48, 2011.

NIELSEN, R. et al. Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. **Genes Dev.** v. 22, p. 2953-2967, 2008.

NIH- National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: <<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/index.cfm>> Acesso em: 04 set. 2019.

NIMROD e BENSON. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. **Crit Rev Toxicol.**, v. 26, n. 3, p. 335-64, 1996.

O'RAHILLY, S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. **Nature.**, v.462, n. November (7271), p. 307–314, 2009.

OSTMAN, J., et al. (1979) Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. **Metabolism.**, v.28, p. 1198–1205, 1979.

PAYNE, V. A., et al. C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. **Biochem. J.**, v. 425, p. 215-223, 2010.

PEREIRA-FERNANDES, A. et al. Evaluation of a screening system for obesogenic compounds: screening of endocrine disrupting compounds and evaluation of the PPAR dependency of the effect. **PLoS One.** v. 8, p.e77481, 2013.

PETRAKIS, D., et al. Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. **Int J Environ Res Public Health.**, v.14, n. 10, p. 1282, 2017.

PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S. Antibiotic administration and the development of obesity in children. **Int J Antimicrob Agents**, 2016.

PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION, Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies, **The Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1083 – 1096, 2009.

PRUSINSKI, L.; AL-HENDY, A.; YANG Q. Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets. **Gynecology and obstetrics research : open journal.**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2016.

RAJAPAKSE, N.; SILVA, E.; KORTENKAMP, A. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. **Environ Health Perspect** v.110,p.917–21, 2002.

RAMARATHNAM, N.; RUBIN, L.J.; DIOSADY, L.L. Studies on meat flavor 4. Fractionation, characterization, and quantitation of volatiles from uncured and cured beef and chicken. **J Agric Food Chem** v.41, p. 939–45, 1993b.

RANGWALA, S.M.; LAZAR, M.A. Transcriptional control of adipogenesis. **Annu Rev Nutr.** v.20, p. 535–559, 2000.

RASOULI, N; KERN, P.A. Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v.93.11 Suppl 1, p. S64–S73, 2008.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes.**, v. 37, p. 1595–1607, 1988.

RODEHEFFER, M.S.; BIRSOY, K.; FRIEDMAN, J.M. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. **Cell**, v. 135, p. 240-249, 2008.

RODRIGUEZ, A.M. et al. Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes. **Cell Mol Life Sci.**, v. 59, p. 1714–23, 2002.

RODRIGUEZ-CUENCA, S. et al. Sex steroid receptor expression profile in brown adipose tissue. Effects of hormonal status. **Cell Physiol Biochem.**, v. 20, p. 877–86, 2007.

ROSEN, E.D. et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes Dev.** v. 14, n. 11, p. 1293-307, 2000.

ROSEN, E.D., Two paths to fat. **Nat Cell Biol**, v. 17, n. 4, p. 360-361, 2015.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**,v. 156, n. 1-2, p. 20-44, 2014.

SAELY, C.; GEIGER, K.; DREXEL, H. Browns versus white adipose tissue: a mini-review. **Gerontol.**, v. 58, p. 120–2, 2012.

SEMPLE, R.K., CHATTERJEE, V.K., O'RAHILLY, S. PPAR γ and human metabolic disease. **J Clin Invest.**, v. 116, p. 581–589, 2006.

SHABANI, P.; EMAMGHOLIPOUR, S.; DOOSTI, M. Chapter One - CTRP1 in Liver Disease. **Advances in Clinical Chemistry**; v.79, p. 1-23, 2017.

SHOUCRI, B. et al. Retinoid X Receptor Activation Alters the Chromatin Landscape To Commit Mesenchymal Stem Cells to the Adipose Lineage. **Endocrinology**, v. 158, n. 10, p. 3109–3125, 2017.

SILVA, E.; RAJAPAKSE, N.; KORTENKAMP, A. Something from “nothing”: eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. **Environ Sci Technol** v.36, p. 1751–6, 2002.

SOARES, A et al. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environ Int.** v. 34, n. 7, p. 1033-49, 2008.

SOTO, A.M. et al. P-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. **Environ Health Perspect** v.92, p. 167–73, 1991.

SPALDING, K.L., et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, p.783–7, 2008.

TANG, Q.Q. e LANE, D.M. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81:1, p. 715-736, 2012.

TSOU, T.C. et al. Estrogenic chemicals at body burden levels attenuate energy metabolism in 3T3-L1 adipocytes. **J Appl Toxicol**. 2017.

UNEP, United Nations Environment Programme and WHO, State of the science of endocrine disrupting chemicals – 2012. Disponível em: < file:///D:/Downloads/9789241505031_eng.pdf > Acesso em : 04 de set. de 2017.

VANDENBERG, L.N., et al. Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? **Environ Health**; v. 13, n. 1, p. 46, 2014.

VANDENBERG, L.N., et al., Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocr Rev**, v. 33, 2012.

VOM SAAL, F.S., et al. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 354, n. 1-2, p. 74-84, 2012.

VOSS, J.D.; ATKINSON, R.L.; DHURANDHAR, N.V. Role of adenoviruses in obesity. **Rev Med Virol**, v. 25, n.6, p. 379-87, 2015.

WADE, G.N., GRAY, J.M. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. **Physiol Behav.**, v. 22, p. 583–93, 1979.

WALKER, C.L.; HO, S.M. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nature reviews Cancer.**, v. 12, p. 479–486, 2012.

WANG, Y.; SUL, H. S. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. **Cell Metab.** v.9, p. 287-302, 2009.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 facts on obesity (May,2017) Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>> Acesso em: 04 de set. de 2019

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Atualizado em 2017 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acesso em: 04 de set. de 2019

XI, Y.; LI, D.; SAN, W. Exposure to the endocrine disruptor nonylphenol alters structure and function of thyroid gland in rats. **Regul Pept.**, v.185, p. 52-6, 2013.

XIA, H., et al. Effects of Nonylphenol on immune function of female Sprague-Dawley rats. **Toxicological & Environmental Chemistry.**, v. 95, n. 4, 2013.

XIAO, J., et al. A study on bisphenol a, nonylphenol, and octylphenol in human urine amples detected by SPE-UPLC-MS **Biomed. Environ. Sci.**, v.24, n. 1, p. 40-46, 2011.

YANG, J., et al. The adverse effects of perinatal exposure to nonylphenol on carbohydrate metabolism in male offspring rats. **Int J Environ Health Res.**, v. 27, n. 5, p. 368-376, 2017.

YANG, T.J., et al. Determination of additives in cosmetics by supercritical fluid extraction on-line headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **Anal Chim Acta.**, v. 668, n. 2, p. 188-94, 2010.

YU, J. et al. Adverse Effects of Chronic Exposure to Nonylphenol on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Male Rats. Ed. Jonathan M. Peterson. **PLoS ONE** v. 12.7, 2017.

YU, J., et al. The adverse effects of chronic low-dose exposure to nonylphenol on type 2 diabetes mellitus in high sucrose-high fat diet-treated rats. **Islets.**; v10, n. 1, p. 1–9, 2018.

ZENGIN, A., et al. Neuropeptide Y and sex hormone interactions in humoral and neuronal regulation of bone and fat. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 21, p. 411–8, 2010.

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

ZHANG, H.Y., et al. Perinatal exposure to 4-nonylphenol can affect fatty acid synthesis in the livers of F1 and F2 generation rats. **Toxicology Research** v.7, n. 2, p. 283-292, 2018.

ZHANG, L. et al. Persistent organic pollutants modify gut microbiota–host metabolic homeostasis in mice through aryl hydrocarbon receptor activation. **Environ. Health Perspect.**, v.123, p. 679–688, 2015.



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

Brasília, 12 de abril de 2016.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**EFETTO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS C57BL/6.**", UnBDoC n.º 20581/2016, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 60. A presente aprovação é válida pelo período de 07/04/2016 a 12/09/2019.

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



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