

ARIANE KRAUSE PADILHA LORENZETT

**A ANTECIPAÇÃO DA PUBERDADE EM RATAS TRATADAS COM BISFENOL A  
ESTÁ RELACIONADA A ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA  
KISSPEPTINA**

GUARAPUAVA

2021

ARIANE KRAUSE PADILHA LORENZETT

**A ANTECIPAÇÃO DA PUBERDADE EM RATAS TRATADAS COM BISFENOL A  
ESTÁ RELACIONADA A ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DA  
KISSPEPTINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, UNICENTRO.

Orientador: Prof. Dra. Renata Marino Romano

GUARAPUAVA

2021

Catálogo na Publicação  
Rede de Bibliotecas da Unicentro

L869a Lorenzett, Ariane Krause Padilha  
A antecipação da puberdade em ratas tratadas com Bisfenol A está relacionada a alterações no padrão de Expressão da Kisspeptina / Ariane Krause Padilha Lorenzett. -- Guarapuava, 2021.  
xvi, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em Associação Ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2021.

Orientador: Renata Marino Romano  
Banca examinadora: Anderson Joel Martino Andrade, Weber Cláudio Nunes da Silva, Renata Marino Romano

Bibliografia

1. Desreguladores endócrinos químicos. 2. Toxicologia reprodutiva. 3. Bisfenol A. 4. Disfunção ovariana. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615



# Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

## TERMO DE APROVAÇÃO

**Ariane Krause Padilha Lorenzetti**

***"A antecipação da puberdade em ratas tratadas com Bisfenol A, está relacionada a alterações no padrão de Expressão da Kisspeptina".***

Dissertação aprovada em 19/02/2021 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:


---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Marino Romano  
Membro/Orientadora Unicentro.

---

Prof. Dr. Weber Cláudio Nunes da Silva  
Membro/Unicentro.

---

  
Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade  
Membro/UFPR.

Guarapuava - PR  
2021.

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Salvestore Renna – Pedro Salvador, 875 – Co. Postal 2010 – Fone: (42) 3021-1000 – FAX: (42) 3021-1090 – CEP 05.015-400 – GUARAPUAVA – PR

Campus ODEBRETE: Rua Símeão Camargo Varela de Sá, 55 – Fone/FAX: (42) 3029-6100 – CEP 05.040-000 – GUARAPUAVA – PR

Campus de Inati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Co. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3007 – CEP 04.500-000 – INATI – PR



## Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

### TERMO DE APROVAÇÃO

**Ariane Krause Padilha Lorenzetti**

*"A antecipação da puberdade em ratas tratadas com Bisfenol A, está relacionada a alterações no padrão de Expressão da Kisspeptina".*

Dissertação aprovada em 19/02/2021 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Marino Romano  
Membro/Orientadora Unicentro.

---

Prof. Dr. Weber Cláudio Nunes da Silva  
Membro/Unicentro.

---

Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade  
Membro/UFPR.

Guarapuava - PR  
2021.

Home Page: [www.unicentro.br](http://www.unicentro.br)

Campus Santa Cruz: Rua Salvatore Renna – Padre Salvador, 815 – Cx. Postal 3810 – Fone: (42) 3621-1366 – FAX: (42) 3621-1890 – CEP 85.015-408 – GUARAPUAVA – PR

Campus CEBETRO: Rua Síndico Camargo Varela de Sá, 23 – Fone/FAX: (42) 3629-8180 – CEP 85.040-365 – GUARAPUAVA – PR  
Campus de Ivaí: PR 185 – Km 07 – Ricosmo – Cx. Postal 21 – Fone: (42) 3421-3008 – FAX: (42) 3421-3907 – CEP 84.500-000 – IVAÍ – PR



# Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

## TERMO DE APROVAÇÃO

**Ariane Krause Padilha Lorenzetti**

*“A antecipação da puberdade em ratas tratadas com Bisfenol A, está relacionada a alterações no padrão de Expressão da Kisspeptina”.*

Dissertação aprovada em 19/02/2021 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Marino Romano  
Membro/Orientadora Unicentro.

---

Prof. Dr. Weber Cláudio Nunes da Silva  
Membro/Unicentro.

---

Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade  
Membro/UFRP.

Guarapuava - PR  
2021.

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Salvatoreanna Reina – Padre Salvador, 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-400 – GUARAPUAVA – PR

Campus CEDETE: Rua Símeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-6100 – CEP 85.040-000 – GUARAPUAVA – PR  
Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riosinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3007 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR

*“É preciso força pra sonhar e perceber que  
a estrada vai além do que se vê”*

Los Hermanos

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me permitido investir nessa jornada a qual eu tanto esperei, e graças a Ele, venci.

Agradeço imensamente aos meus pais, Zeli e Hideraldo, que sempre me incentivaram na busca pelo conhecimento e aprimoramento. Obrigada pelo apoio moral, financeiro, emocional e pelo amor e carinho que vocês sempre me deram. Amo vocês.

Ao meu esposo Guilherme, que esteve comigo em todos os momentos, desde a graduação, da mesma forma, me incentivou, me colocou para cima nos momentos que eu estava em dúvida ou desapontada. Obrigada pela seu amor e companheirismo sempre.

Ao meu irmão Caio, pelo seu apoio e sua capacidade de deixar meus dias mais leves, sua companhia é muito importante.

À Professora Dra. Renata, por ter me acolhido como orientanda. Obrigada por todos os ensinamentos tanto científicos como também os de vida. Agradeço por confiar em mim e minha capacidade e por todo o auxílio em todas as etapas deste trabalho.

Agradeço também as minhas companheiras de laboratório Isabela, Deborah e Jeane pelo incentivo e apoio em todos os momentos. Em especial agradeço à Isabela, pelo auxílio em todas as etapas do trabalho e pela paciência e companheirismo.

A todos aqueles que torceram por mim e que de alguma forma ajudaram na finalização deste trabalho.



## RESUMO

O sistema reprodutor feminino depende do desenvolvimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (HHO). A puberdade é um importante período onde ocorre reativação de vias endócrinas e mudanças na fisiologia corporal. O bisfenol A (BPA) é um composto estrógeno, sendo considerado um desregulador endócrino químico, o qual é utilizado na produção de plásticos e resinas epóxi, sendo matéria prima de embalagens de alimentos e diversos outros produtos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da puberdade em ratas Wistar expostas a doses abaixo da NOAEL (no observed adverse effect level) reprodutiva de BPA. Para isso, ratas Wistar recém desmamadas foram divididas em 3 subgrupos (pré púbere, puberdade e pós púbere), os quais foram tratadas com 5 mg/kg de peso corporal de BPA desde o dia pós-natal (DPN) 22 até o DPN 35, diariamente, por gavagem. A partir do DPN22 iniciou-se a avaliação da progressão da puberdade pela constatação da abertura do orifício vaginal. As ratas foram eutanasiadas conforme os três momentos de seu desenvolvimento reprodutivo: antes, à puberdade e após a constatação da puberdade, e o sangue, o hipotálamo, a hipófise e os ovários foram colhidos. A expressão de mRNA foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). No hipotálamo, foi realizada a avaliação dos seguintes genes: hormônio liberador de gonadotrofinas (*gnrh1*), receptor de estradiol alfa (*Esr1*), receptor de estradiol beta (*Esr2*) e o peptídeo kisspeptina (*kiss1*). Na hipófise foram avaliados a expressão do receptor de hormônio liberador de gonadotrofinas (*Gnrhr*), hormônio luteinizante (*lhb*), hormônio folículo estimulante (*fshb*), receptor de progesterona (*Pgr*), *Esr1* e *Esr2*. Já no ovário foram analisadas as expressões de mRNA do receptor do hormônio luteinizante (*Lhr*), receptor do hormônio folículo estimulante (*Fshr*), *Esr2* e *Pgr*. As dosagens séricas de LH e FSH foram realizadas por quimioluminescência. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias e comparações planejadas seguidas de pós testes de Dunnet (fase do desenvolvimento reprodutivo x controle; fase do desenvolvimento reprodutivo x tratado) e Sidak (controle x tratado x fase do desenvolvimento reprodutivo), Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn (idade à puberdade) usando os recursos dos software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e Statistica 7.0 (Statsoft. Inc). Considerou-se diferença estatística em todas as análises, quando  $p < 0,05$ . Os níveis séricos de FSH e LH não apresentaram diferença significativa. Na hipófise não houveram alterações com diferença significativa. No ovário houve uma diferença nos transcritos de *Esr2* entre as fases de desenvolvimento (pré púbere, puberdade e pós púbere) no grupo controle ( $p < 0,05$ ) e no grupo tratado também (pré púbere, puberdade e pós púbere) com ( $p < 0,001$ ). No hipotálamo houve diminuição dos transcritos de *gnrh1* entre as fases de desenvolvimento do grupo controle da idade pós púbere em relação à idade pré púbere ( $p < 0,05$ ). Também um aumento nos transcritos de *kiss1* entre as fases de desenvolvimento do grupo tratado na idade à puberdade ( $p = 0,01$ ) e na idade após a puberdade ( $p < 0,001$ ) quando comparadas à idade pré puberdade. Observa-se ainda no hipotálamo uma diferença entre os tratamentos, onde houve aumento nos transcritos de *kiss1* no grupo tratado em relação ao grupo controle, isso na idade pós púbere ( $p < 0,01$ ). Os transcritos *Esr2* alterações de border line ( $p = 0,07$ ). Esses resultados mostram que a antecipação da puberdade em ratas expostas ao BPA está relacionada a alterações na expressão da kisspeptina, sendo esta, relacionada ao desencadeamento da síntese e secreção de GnRH e a diminuições na expressão de *Esr2* no ovário, que podem estar relacionadas à uma dessensibilização do receptor. Tais alterações demonstram que exposições à BPA em doses abaixo da NOEAL podem causar comprometimento do sistema reprodutor feminino, trazendo consequências na vida adulta.

**Palavras chave:** Desreguladores endócrinos químicos; toxicologia reprodutiva; bisfenol A; disfunção ovariana.

## ABSTRACT

The female reproductive system depends on the development of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis (HHO). Puberty is an important period in which reactivation of endocrine pathways and changes in body physiology occur. Bisphenol A (BPA) is an estrogen compound, being considered a chemical endocrine disruptor, which is used in the production of plastics and epoxy resins, being the raw material for food packaging and several other products. The aim of this work was to evaluate the molecular mechanisms involved in the onset of puberty in Wistar rats exposed to doses below the reproductive BPA NOAEL (no observed adverse effect level). For this purpose, recently weaned Wistar rats were divided into 3 subgroups (pre-pubertal, puberty and post-pubertal), which were treated with 5 mg / kg BPA body weight from the postnatal day (PND) 22 to the PND 35, daily, by gavage. From the PND22, the evaluation of the progression of puberty started by finding the opening of the vaginal orifice. The rats were euthanized according to the three moments of their reproductive development: before, at puberty and after the discovery of puberty, and blood, hypothalamus, pituitary and ovaries were collected. mRNA expression was assessed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). In the hypothalamus, the following genes were evaluated: gonadotropin-releasing hormone (*gnrh1*), estradiol alpha receptor (*Esr1*), estradiol beta receptor (*Esr2*) and the kisspeptin peptide (*kiss1*). In the pituitary gland the expression of the gonadotropin releasing hormone receptor (*Gnrhr*), luteinizing hormone (*lhb*), follicle stimulating hormone (*fshb*), progesterone receptor (*Pgr*), *Esr1* and *Esr2* were evaluated. In the ovary, the mRNA expressions of the luteinizing hormone receptor (*Lhr*), follicle stimulating hormone receptor (*Fshr*), *Esr2* and *Pgr* were analyzed. Serum measurements of LH and FSH were performed by chemiluminescence. The data were analyzed by two-way ANOVA and planned comparisons followed by Dunnett post-tests (reproductive development x control phase; reproductive development x treated phase) and Sidak (control x treated x reproductive development phase), Kruskal-Wallis followed Dunn's post-test (age at puberty) using the features of the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and Statistica 7.0 (Statsoft. Inc). Statistical difference was considered in all analyzes, when  $p < 0.05$ . The serum levels of FSH and LH showed no significant difference. There were no changes in the pituitary gland with a significant difference. In the ovary, there was a difference in the *Esr2* transcripts between the development phases (prepubertal, puberty and postpubertal) in the control group ( $p < 0.05$ ) and in the treated group (prepubertal, puberty and postpubertal) with ( $p < 0.001$ ). In the hypothalamus, there was a decrease in *gnrh1* transcripts between the developmental stages of the post-pubertal age control group in relation to the pre-pubertal age ( $p < 0.05$ ). There was also an increase in *kiss1* transcripts between the developmental stages of the treated group at age at puberty ( $p = 0.01$ ) and at age after puberty ( $p < 0.001$ ) when compared to pre-puberty age. A difference between treatments is also observed in the hypothalamus, where there was an increase in the *kiss1* transcripts in the treated group in relation to the control group, this in post-pubertal age ( $p < 0.01$ ). *Esr2* transcripts border line changes ( $p = 0.07$ ). These results show that the anticipation of puberty in rats exposed to BPA is related to changes in the expression of kisspeptin, which is related to the triggering of GnRH synthesis and secretion and to decreases in the expression of *Esr2* in the ovary, which may be related to an desensitization of the receptor. Such changes demonstrate that exposures to BPA in doses below NOEAL can cause impairment of the female reproductive system, bringing consequences in adulthood.

**Keywords:** Chemical endocrine disrupters; reproductive toxicology; bisphenol A; ovarian dysfunction.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - <i>Primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) dos genes utilizados para o ensaio de PCR em tempo com suas respectivas sequências de referência.....	35
Quadro 2 - Padronização do ensaio de RT-qPCR para os genes <i>Esr2</i> , <i>Pgr</i> , <i>kiss1</i> , <i>Lhr</i> , <i>Fshr</i> e <i>Rpl19</i> no hipotálamo, hipófise e ovário.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação por <i>feedback</i> do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano. Fonte adaptada HALL, J.E. Guyton & Hall. Fundamentos de fisiologia 2012, 1052p.....	24
Figura 2 – Comparação estrutural do 17 $\beta$ -estradiol (A) com o Bisfenol A (B). Fonte Adaptado National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database.....	27
Figura 3 - Metodologia de pulverização dos tecidos hipotálamo, hipófise e ovário e extração do RNA total destes tecidos utilizando o método guanidina-fenol-clorofórmio através do reagente Trizol ®.....	33
Figura 4 – Curva de crescimento corporal das ratas dos grupos controle e tratados com 5 mg/Kg de BPA do DPN22 ao DPN35 de idade dos animais.....	38
Figura 5 – Gráfico da idade à puberdade das ratas tratadas com 5 mg/Kg de BPA comparadas à ratas controle.....	39
Figura 6 – Dosagens sérica de FSH (A) e LH (B) e ratas na idade pré púbere, púbere e pós púbere tratadas com 5mg/Kg de BPA e grupo controle.....	40
Figura 7 – Curva de dissociação (à direita) e curva padrão relativa (à esquerda). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios da <i>kiss1</i> (A), <i>Pgr</i> (B) no hipotálamo.....	42
Figura 8 – Curva de dissociação (à direita) e curva padrão relativa (à esquerda). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios da <i>Pgr</i> (A) na hipófise.....	43
Figura 9 – Curva de dissociação (à direita) e curva padrão relativa (à esquerda). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios da <i>Pgr</i> , <i>Esr2</i> , <i>Lhb</i> , <i>Fshb</i> , <i>Rpl19</i> no ovário.....	44
Figura 10 – Expressão dos transcritos de <i>Gnrh1</i> (A), <i>kiss1</i> (B), <i>Esr1</i> (C), <i>Esr2</i> (D) e <i>Pgr</i> (E) no hipotálamo de ratas na idade pré púbere, púbere e pós púbere tratadas com 5 mg/Kg de BPA e grupo controle. Utilizou-se o <i>Rpl19</i> como gene constitutivo.....	47
Figura 11 – Expressão dos transcritos de <i>Gnrhr</i> (A), <i>Fshr</i> (B), <i>Esr1</i> (C), <i>Esr2</i> (D), <i>Lhr</i> (E) e <i>Pgr</i> (F) na hipófise de ratas na idade pré púbere, púbere e pós púbere tratadas com 5 mg/Kg de BPA e grupo controle. Utilizou-se o <i>Rpl19</i> como gene constitutivo.....	48
Figura 12 – Expressão dos transcritos de <i>Esr2</i> (A), <i>Fshb</i> (B), <i>Lhb</i> (C) e <i>Pgr</i> (D) no ovário de ratas na idade pré púbere, púbere e pós púbere tratadas com 5 mg/Kg de BPA e grupo controle. Utilizou-se o <i>Rpl19</i> como gene constitutivo.....	49

Figura 13 – Mecanismo de ligação do estrogênio ao se receptor, juntamente com o mecanismo de agonismo e antagonismo do BPA frente aos receptores *Esr*.....50

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR - Androgen receptors (receptores androgênicos)

BPA -Bisfenol A

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CT - cycle threshold (“limiar do ciclo”)

DEQs - Desreguladores endócrinos químicos

DES- Dietilstilbestrol

DO – Densidade óptica

DPN – Dia pós-natal

ESR - Estrogenic receptors (receptores estrogênicos)

ESR1 – Type 1 or alpha estrogen receptor (receptor estrogênico tipo 1 ou alfa)

ESR2 – Type 2 or beta estrogen receptor (receptor estrogênico tipo 2 ou beta)

FSH - Follicle stimulating hormone (Hormônio folículo estimulante)

*Fshb* - Hormônio folículo estimulante tipo beta (gene)

Fshr - Receptor de hormônio folículo estimulante

GnRH - Gonadotropin releasing hormone (Hormônio liberador de gonadotrofinas)

GnRHR – Gonadotropin-releasing hormone receptor (Receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas)

HHG - Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

HHO - Eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano

HPO – Hypothalamic-pituitary-ovarian axis (Eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano)

IMC – Índice de massa corporal

*kiss1* - Neuropeptídeo kisspeptina

Kiss1r - Neuropeptídeo com receptor acoplado à proteína G

LH - Luteinizing hormone (Hormônio luteinizante)

*Lhb* - Hormônio luteinizante tipo beta (gene)

Lhr - Receptor de hormônio luteinizante

mESR - Receptores estrogênicos de membrana.

MKRN3 -Proteína Makorin ring finger protein 3

NOAEL - No Observed Adverse Effect Level (nível sem efeitos adversos observáveis)

PND – Post Natal Day (dia pós natal)

Pgr - Receptor de progesterona

RNA - Ácido ribonucleico

*Rpl19* - Proteína ribossomal 19

RT - Transcrição Reversa

SNC - Sistema nervoso central.

SOP - Síndrome do ovário policístico

THR – Thyroid receptors (receptores tireoidianos)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS QUÍMICOS (DEQs) .....	20
2.2 EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-OVARIANO (HHO) .....	21
3.2 BISFENOL A (BPA) .....	27
<b>3 HIPÓTESE CENTRAL</b> .....	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>30</b>
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
5.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	31
5.2 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS .....	31
5.2.1 <i>Sangue</i> .....	31
5.2.2 <i>Tecidos</i> .....	32
5.3 IDADE À PUBERDADE.....	32
5.3 CURVA DE CRESCIMENTO CORPORAL .....	32
5.4 IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVAS DE GENES RELACIONADOS COM O DESENCADEAMENTO DA PUBERDADE E AO CONTROLE DO EIXO HHO	32
5.4.1 <i>Pulverização e extração do RNA total dos tecidos</i> .....	32
5.4.2 <i>Reação de Transcrição Reversa (RT)</i> .....	34
5.4.3 <i>Confecção dos oligonucleotídeos (primers)</i> .....	34
5.4.4 <i>Padronização dos primers</i> .....	35
5.4.5 <i>Reação de quantificação por PCR em tempo real a partir da transcrição reversa (RT- qPCR)</i> .....	36
5.5 DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS .....	37
5.5.1 <i>FSH e LH</i> .....	37
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
6.1 CURVA DE CRESCIMENTO CORPORAL .....	38
6.2 IDADE À PUBERDADE.....	38
6.3 DOSAGENS SÉRICAS .....	39
6.4 CONSEQUÊNCIAS À EXPOSIÇÃO PRÉ PUBERE AO BPA NO EIXO HIPOTALÂMICO HIPOFISÁRIO OVARIANO.....	40
6.4.1 <i>Padronização dos Primers</i> .....	40
6.4.2 <i>Consequências à exposição pré pubere ao BPA no hipotálamo</i> .....	46



<i>6.4.3 Consequências à exposição pré pubere ao BPA na hipófise.....</i>	<i>47</i>
<i>6.4.4 Consequências à exposição pré pubere ao BPA no ovário.....</i>	<i>48</i>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>10 ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da sociedade no último século trouxe consigo o aumento da industrialização. A industrialização tem o intuito de produzir com maior velocidade e durabilidade de produtos e embalagens, com isso, emerge um assunto relativamente recente, os desreguladores endócrinos químicos (DEQs) (RAVICHANDRAN et al., 2019). Os DEQs são substâncias exógenas capazes de alterar diversas vias endócrinas, seja por via enzimática ou por alteração genética (BILA; DEZOTTI, 2007). Estas substâncias estão sendo amplamente estudadas devido à diária exposição ambiental a seres humanos e animais. Estima-se que o custo anual em saúde para tratamento de distúrbios endócrinos seja de 150 bilhões de euros na Europa (RAVICHANDRAN et al., 2019).

O bisfenol A (BPA) é considerado um DEQ (HUANG et al., 2017). É um estrogênio fraco se comparado as demais substâncias da classe, entretanto, a exposição ambiental está muito presente no dia a dia da população mundial (HUANG et al., 2017). Estima-se que o consumo global de BPA até 2022 seja de mais de 10,6 milhões de toneladas no mundo (ALMEIDA et al., 2018). Este composto é utilizado na produção de plásticos e resinas epóxi onde grande parte é matéria prima na produção de embalagens de alimentos e bebidas. Também está presente em roupas, selantes dentários, em efluente e até mesmo no ar (HUANG et al., 2012; PERETZ et al., 2014; VANDENBERG et al., 2009, 2010). A principal fonte de exposição é através dos alimentos, devido ao BPA ter a capacidade de, quando aquecido, lixiviar-se das embalagens para o alimentos e bebidas (BERGER et al., 2016; VANDENBERG et al., 2007a).

A toxicologia tradicional atenta-se em promover estudos de doses mais elevadas, muitas vezes no limite de letalidade. Efeitos de baixas doses são efeitos causados por uma substância em doses que possam representar uma exposição humana diária, onde muitas vezes, são diferentes dos efeitos de doses mais altas. Tais efeitos causam modificações e reprogramação de vias fisiológicas, muitas vezes silenciosas. Atualmente, diversos estudos tem sido realizados, com o intuito de alertar a população sobre a relevância deste problema (RAVICHANDRAN et al., 2019; VANDENBERG et al., 2012a; ZOELLER et al., 2012).

O desenvolvimento do sistema reprodutivo é um processo finamente regulado que inicia-se desde a vida fetal e vai até períodos pós puberdade (MAGIAKOU et al., 1997; PREVOT, 2015). A puberdade é um importante período onde ocorre reativação de vias endócrinas e desenvolvimento corpóreo, preparando o corpo para a procriação e perpetuação da espécie (MARCEAU et al., 2011). O sistema reprodutor feminino depende do desenvolvimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, juntamente com a presença dos

hormônios estrogênio e progesterona (PREVOT, 2015). Muitos compostos podem alterar este desenvolvimento, portanto, a exposição ambiental à inúmeros Desreguladores endócrinos torna-se uma problemática a ser considerada, pois muitos distúrbios relacionados a infertilidade, atraso ou puberdade precoce, alterações na diferenciação sexual cerebral tem aumentado consideravelmente (OLIVEIRA et al., 2017; SETTAS et al., 2014; VANDENBERG et al., 2009).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS QUÍMICOS (DEQs)

Desreguladores endócrinos químicos são substâncias exógenas de origem natural ou sintética que tem a capacidade de alterar as funções do sistema endócrino em sua totalidade (BACHEGA et al., 2011), interferindo na produção, liberação, metabolismo, excreção e ação dos hormônios em todos os sistemas do corpo (DECHERF; DEMENEIX, 2011). Estas substâncias estão amplamente difundidas no meio ambiente em concentrações na casa dos  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{ng L}^{-1}$  e até  $\text{pg L}^{-1}$ , promovendo assim, uma exposição diária, principalmente por meio de água e alimentos, mas também através do ar e do solo (BILA; DEZOTTI, 2007; MILEVA et al., 2014).

Os DEQs ligam-se aos receptores hormonais, promovendo ações agonistas e antagonistas. Na primeira, ocorre uma diminuição da ação dos hormônios naturais, mimetizando a ação do estrogênio endógeno, causando um *feedback* negativo, e a segunda impede a ligação dos hormônios endógenos aos respectivos receptores (COSTA et al., 2014). Além da ligação aos receptores hormonais, os DEQs têm a capacidade de alterar vias metabólicas, modificar cascatas enzimáticas e promover modificações gênicas por meio de mecanismos epigenéticos sem a comutação de nucleotídeos (BACHEGA et al., 2011; SCHUG et al., 2011). Estes mecanismos podem ser metilação do DNA, modificações de histonas e remodelação da cromatina (HO et al., 2017).

Nas últimas décadas, inúmeros compostos são lançados no ambiente, dos quais grande parte tem propriedades de bioacumulação e tendem a se perpetuar no ecossistema, prejudicando animais e seres humanos expostos (TAYLOR et al., 2011). Outras propriedades incluem alta lipofilicidade, permitindo passagem facilitada em barreiras celulares e biotransformação em componentes mais ou menos ativos, no qual concentrações mínimas já podem ser suficientes para promover diversas desregulações (BILA; DEZOTTI, 2007).

O tempo e a janela de exposição são muito importantes nesse aspecto, pois a exposição em certos períodos do desenvolvimento podem levar à consequências irreversíveis (HUNT et al., 2009). Um estudo de del Rio Gomez *et al* (2002) mostrou que a exposição de mulheres grávidas à policlorados geraram proles com anormalidades espermáticas, o que pode ocasionar deficiência na reprodução e/ou anormalidades nas próximas gerações.

Outra questão relacionada aos DEQs são os efeitos de baixa dose. Efeitos de baixa dose são efeitos ocasionados por substâncias que se encontram no ambiente em doses muito baixas,

muito abaixo da concentração mínima onde não são observados efeitos adversos, conhecida como NOAEL (no observed adverse effect level) na toxicologia tradicional (VANDENBERG et al., 2007a; WELSHONS; NAGEL; VOM SAAL, 2006). Estes efeitos promovem ações fisiológicas diferenciadas em relação as doses mais altas. De modo geral, esses compostos seguem um padrão de dose resposta não monotônica, de forma a não adotar uma curva dose resposta linear, na qual o aumento da concentração alavancaria os efeitos. Comumente, curvas de dose resposta não monotônicas apresentam-se na forma de “U” ou “U invertido”, onde o sinal oscila de um ponto positivo para negativos e vice versa dentro do intervalo analisado, sendo similares aos hormônios e vitaminas (CONOLLY; LUTZ, 2004; KOHN; MELNICK, 2002; MILEVA et al., 2014; VANDENBERG et al., 2012b).

Devido à diversidade de produtos que estão difundidos no ambiente, existe uma dificuldade de avaliar se um composto sozinho promove ações no organismo ou tem uma ação aditiva ou sinérgica com algum outro químico, devido à muitos DEQs agirem através de vias comuns (MAFFINI et al., 2006). Muitos estudos têm correlacionado a presença de químicos com desordens reprodutivas e até mesmo ao desenvolvimento de cânceres (COSTA et al., 2014). Desta forma, as análises em modelos animais são peças chave para o entendimento dos mecanismos e consequências da exposição à estas substâncias (MAFFINI et al., 2006).

## 2.2 EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-OVARIANO (HHO)

O eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (HHO) é essencial para o processo de desenvolvimento reprodutivo, sendo finamente regulado desde a vida fetal até o final da vida (MAGIAKOU et al., 1997; PREVOT, 2015). A diferenciação sexual é um processo que envolve diversas etapas como a diferenciação sexual cromossômica, fenotípica, gonadal, e hipotalâmica. A diferenciação sexual cromossômica ocorre durante a fecundação, onde é dependente da presença do gene *SRY* presente no cromossomo Y. Após esse processo, ocorre a determinação do sexo gonadal, o qual ocorre durante à sexta semana de gestação. Neste período fetal, ocorre a diferenciação das células sexualmente dimórficas pela ação da testosterona. Se o sexo cromossômico for masculino, o feto inicia a produção da testosterona através do gene *SRY*, desenvolvendo todo o sistema reprodutor masculino. Caso não haja a presença de testosterona, ocorre a diferenciação para formação do sistema reprodutor feminino, determinando, portanto, o sexo tubular interno e externo, característico da diferenciação sexual fenotípica. Por fim, ocorre a diferenciação sexual hipotalâmica, onde se determina se o hipotálamo irá trabalhar de forma cíclica, onde todo o mês ocorrem mudanças hormonais com o intuito de promover

ovulação e fecundação (feminino), ou se será acíclico, que funciona basicamente através do ciclo circadiano (masculino) (GARDINER; SWAIN, 2015).

O sistema reprodutor feminino é formado basicamente por ovários, trompas de Falópio, útero e vagina (HALL, J E, 2012). O processo de diferenciação do sistema reprodutor feminino em humanos ocorre por volta de décima sexta à décima oitava semana de gestação, no qual as células germinativas formam as oogonias. Estas por sua vez, passam a se proliferar e começam a sofrer meiose, mas estacionam na prófase I da meiose, passando a ser chamadas de oócitos. Os oócitos formam aglomerados celulares, formando folículos pré-primordiais. Na vigésima semana de gestação, existem cerca de 6 milhões de células, entretanto, nem todos estes folículos permanecerão (PARKER; SCHIMMER, 2006). Após o nascimento, até próximo ao sétimo mês, existe um período chamado de mini puberdade, no qual, picos de hormônios são liberados para que haja a concretização para maturação futura dos órgãos sexuais. Neste período inicia-se o processo de atresia, onde algumas destas células que não formaram um folículo sofrem apoptose, restando cerca de 1-2 milhões de células (LANCIOTTI et al., 2018). Estas células que permaneceram são aquelas que serão liberadas a cada ciclo menstrual ou estral das fêmeas após o início da puberdade.

Até o período pré-púbere, que em humanos é por volta dos 8-13 anos de idade e em roedores cerca de 22-35 dias, o sistema reprodutivo permanece silencioso (PICUT; REMICK, 2017; PREVOT, 2015). A puberdade é um processo de desenvolvimento no qual ocorre a reativação da pulsação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produção de esteroides pelas gônadas e crescimento corpóreo (MARCEAU et al., 2011). O início da atividade do eixo HHO na puberdade é decorrente de uma série de eventos que ocorrem no hipotálamo, hipófise e gônadas (Figura 1), promovendo a maturação sexual, por meio de diversos fatores intrínsecos, como hormonais por exemplo, ou extrínsecos, como fatores ambientais (GORE, 2008; HERBISON, 2016; PREVOT, 2015).

Foram documentados na literatura alguns fatores que podem regular a puberdade, estes são o neuropeptídeo kisspeptina (*kiss1*) e a proteína *Makorin ring finger protein 3* (*MKRN3*). O gene *kiss1* codifica a Kiss, um neuropeptídeo que se liga à um receptor acoplado à proteína G, o Kiss1r (SHIN, 2016). Os neurônios produtores da kiss são responsáveis pela liberação do neuropeptídeo, que por sua vez, estimula a geração de pulsos do GnRH, estão localizados no núcleo arqueado do hipotálamo e em fêmeas, ele está presente também na região rostral (HERBISON, 2016). Desta forma, a *kiss1* tem a capacidade sincronizar este conjunto neural, enviando sinais estimulatórios aos neurônios liberadores do GnRH, e assim, iniciar sua liberação pulsátil (HERBISON, 2016). Mas até o início da puberdade, a rede estimulatória está

de certa forma sendo inibida, este papel é realizado, dentre outros fatores, pela *MKRN3*. A *MKRN3* é um gene o qual sua principal função é promover a inibição da sinalização pulsátil do GnRH, também por meio da inibição da *kiss1* (ABREU et al., 2013; OJEDA; LOMNICZI, 2014). Contudo, essa inibição torna-se cada vez menor ao passo que a idade à puberdade se aproxima, juntamente com o aumento da ação excitatória da *kiss1*, até o momento em que a pulsação começa (ABREU et al., 2013; SHIN, 2016). Portanto, a desregulação ou mutação da *MKRN3* pode ocasionar uma puberdade precoce (SETTAS et al., 2014). Da mesma forma, se houver algum problema com a liberação da *kiss1*, pode ocorrer um atraso na puberdade (ABREU; KAISER, 2016a).

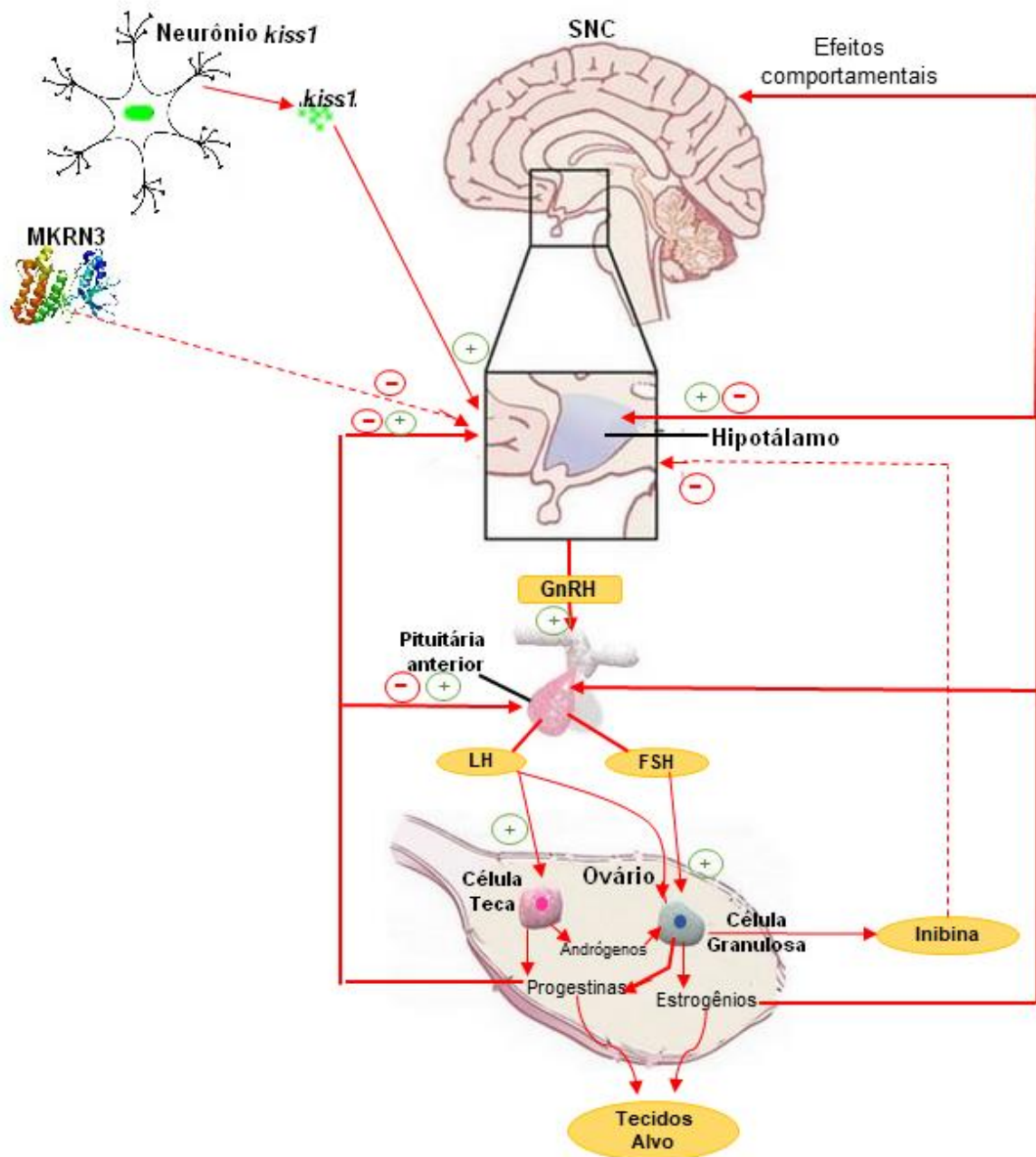


Figura 1 – Regulação por *feedback* do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano. Os efeitos estimulatórios estão representados por (+) e os efeitos de *feedback* negativo estão representados por (-). Os hormônios progestógenos e estrógenos agem tanto por *feedback* positivo como negativo no hipotálamo e hipófise, tudo depende do estágio do ciclo ovariano. A inibina age de forma inibitória no hipotálamo. Os neurônios da *kiss1* (kiseptina) que produzem o neuropeptídeo kiseptina que estimula o início puberdade agindo no hipotálamo. A proteína *makorin ring finger 3* (MKRN3) tem ação inibitória sobre o hipotálamo em relação ao início da puberdade. GnRH, hormônio liberador de gonadotropina; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; SNC, sistema nervoso central. Fonte: Adaptado HALL, J. E, 2012.

O hipotálamo feminino é cíclico, ou seja, a cada mês ocorre uma série de mudanças hormonais que culminam na ovulação e possível reprodução (HALL, J. E, 2012). No início do



ciclo, ocorre a geração pulsátil de GnRH no hipotálamo, este vai até a adenohipófise pelo sistema porta hipotalâmico-hipofisário e age em seu receptor, o GnRHR, e estimula a produção de dois hormônios, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Estes agem nas gônadas, ligando-se aos seus receptores nas células alvo (HALL, J; E., 2012). Sabe-se que pulsos alta amplitude de GnRH estimulam a liberação de LH e pulsos de baixa amplitude estimulam a liberação de FSH (KAISER et al., 1997). O FSH e LH são gonadotrofinas glicoproteicas. Estas possuem duas subunidades, a alfa ( $\alpha$ ) e a beta ( $\beta$ ). A subunidade  $\alpha$  é comum a todas as gonadotrofinas (FSH, LH, TSH [hormônio estimulante da tireoide] e hCG [gonadotrofina coriônica humana]), já a subunidade  $\beta$  é única para cada gonadotrofina, conferindo assim, especificidade de cada hormônio (CHILDS, 2006).

O FSH atua nos ovários através dos seu receptor, promovendo o recrutamento folicular terciário na fase exponencial de seu desenvolvimento e esteroidogênese. Ao recrutar alguns oócitos, inicia-se então uma fase proliferativa, onde através do estímulo do FSH, células granulosas e células da teca começam a circundar o folículo primordial. Cada folículo, também pela ação do FSH, começa a produzir estradiol, que é liberado na corrente sanguínea. Nas fases iniciais de crescimento exponencial dos folículos terciários ocorre um *feedback* negativo do FSH no hipotálamo, causando uma supressão da liberação de FSH, levando a atresia dos folículos terciários em crescimento, com exceção do folículo ovulatório que é maior, mais vascularizado e expressa maior quantidade de receptores para FSH, LH e estradiol e, portanto, é menos suscetível à atresia (TERASAWA; FERNANDEZ, 2001; HALL, J. E, 2012).

A combinação de FSH e estradiol também tem a função de estimular as células granulares a se tornarem mais sensíveis ao LH, portanto, por volta do 10 dia do ciclo, este hormônio tende a aumentar. Próximo ao dia da ovulação, ocorre um *feedback* positivo no hipotálamo, e quantidades crescentes de LH começam a ser liberadas. O LH tem função de auxiliar no final do crescimento folicular, promover a ovulação e também a produção de progesterona. Sabe-se que ocorre uma mudança na pulsação do GnRH que causa o surto de LH promovendo a ovulação (TERASAWA; FERNANDEZ, 2001; HALL, J. E, 2012).

Após a ovulação, o LH age sobre as células granulares e da teca, transformando-as em células produtoras de progesterona, formando o corpo lúteo. O corpo lúteo também produz um hormônio, chamado inibina, que inibe a liberação do FSH pelo hipotálamo, para que caso ocorra a fecundação, corpo lúteo continue produzindo mais progesterona, e dentre demais fatores, ocorre a inibição de novas ovulações. Entretanto, caso não haja fecundação, o corpo lúteo regride. Ocorre uma diminuição do estradiol e da progesterona na corrente sanguínea. Estes eventos geram um *feedback* negativo no hipotálamo que tende a voltar a pulsação para o

estímulo do FSH, reiniciando assim, o ciclo (TERASAWA; FERNANDEZ, 2001; HALL, J.E, 2012).

O estradiol e a progesterona têm papel importante no desenvolvimento das características secundárias da mulher e também na preparação para receber um embrião. O estradiol promove o desenvolvimento das características secundárias femininas, proliferação do endométrio, relaxamento e lubrificação do cérvix e da vagina, faz remodelação óssea juntamente com a calcitonina, auxilia na ovulação, faz deposição de gordura, dentre outros. Já a progesterona faz a proteção e revestimento do endométrio, contração do cérvix e da vagina, faz também proliferação de ductos mamários (HALL, J. E, 2012).

As células da teca produzem os andrógenos, androstenediona e testosterona, os quais tem a função do desenvolvimento de pelos pubianos e aumento do apetite sexual durante o período de ovulação. Entretanto a grande maioria destes hormônios são convertidos pela enzima aromatase, nas células granulares, em estradiol (HALL, J. E, 2012).

O eixo HHO é controlado por inúmeros genes, que codificam diversos fatores de transcrição, hormônios e seus receptores (ACHERMANN et al., 2002). A grande maioria dos receptores hormonais pertencem a superfamília de receptores nucleares, como os receptores androgênicos (AR) e estrogênicos (ESR). A ligação dos hormônios aos receptores nucleares leva a dimerização do receptor, o que auxilia a sua habilidade de ligar-se ao seu elemento de resposta cognato e reunir co-reguladores promovendo a expressão de genes-alvo (HEINLEIN; CHANG, 2002).

A puberdade é um período de transição, onde ocorrem inúmeras modificações fisiológicas que levam ao desenvolvimento corporal e psíquico. As evoluções que caracterizam a puberdade estão ligadas à ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (LEONARDI et al., 2017). Nesse período de desenvolvimento ocorre o crescimento corporal, aumento da deposição do tecido adiposo, relacionados também ao aumento e desenvolvimento das mamas, aparecimento de pelos pubianos, dentre outras características do amadurecimento reprodutivo (KHAN, 2019). É um período muito susceptível à perturbações externas, como medicamentos, plastificantes, gases, dentre outros (ABREU; KAISER, 2016b).

A perturbação dos esteroides sexuais e seus receptores nos períodos críticos de diferenciação do núcleo sexualmente dimórfico do hipotálamo pode alterar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), levando à ruptura da secreção de gonadotrofina, bem como a alterações no início da puberdade e fertilidade (CAVALLIN et al., 2018; DA CONCEIÇÃO et al., 2017; DE SOUZA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; ROMANO et al., 2012, 2010).

### 3.2 BISFENOL A (BPA)

O Bisfenol A (BPA) é uma substância sintética amplamente produzida no mundo. Foi sintetizado em 1930 no intuito de promover atividade estrogênica, sendo considerado um estrogênio fraco, substituído na época pelo dietilstilbestrol (DES) que era mais potente (VANDENBERG et al., 2009). Apesar do fracasso na aplicação médica, o BPA é utilizado na indústria química. Sua principal aplicação é na manufatura de plásticos policarbonatos e resinas epóxi que são matéria prima na produção de diversos produtos (HUANG et al., 2017; VANDENBERG et al., 2007a) como embalagens plásticas, revestimento de bebidas e alimentos enlatados, revestimento de encanamentos, selantes dentários, brinquedos, retardantes de chama, dentre outros (ALMEIDA et al., 2018; LEONARDI et al., 2017; YANG et al., 2015). Embora seja considerado um estrogênio fraco, diversos estudos mostram sua atividade como tal, sendo classificado como DEQ (HUANG et al., 2017).

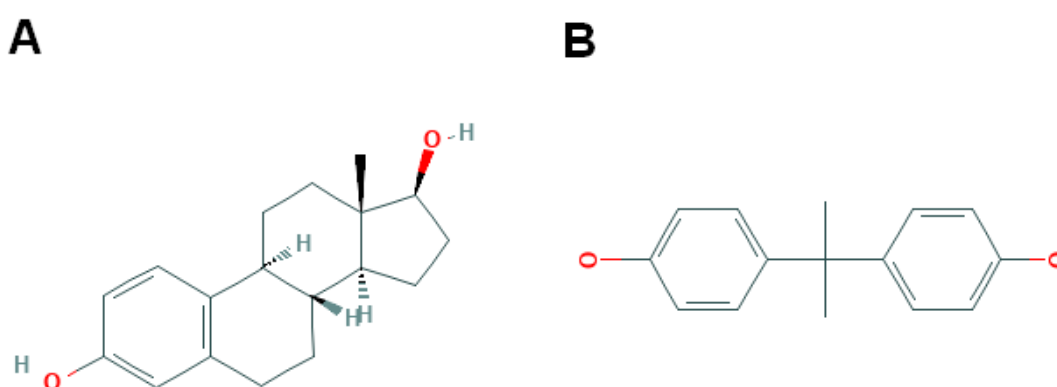


Figura 2 – Comparação estrutural do 17β-estradiol (A) com o Bisfenol A (B). O 17β-estradiol é produzido de forma endógena, promovendo ação hormonal potente. O BPA é classificado como fraco estrogênio, mas ainda assim, possui ação hormonal, podendo desregular o sistema endócrino. Fonte: Adaptado PubChem Substance 17β-estradiol e bisphenol A. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estradiol>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A> (acesso em 17/06/2019).

O BPA tem a capacidade de ser lixiviado das embalagens para os alimentos e bebidas na presença de calor, radiação ultravioleta, uso de forno micro-ondas, também em condições de acidez através da hidrólise do composto, sendo, portanto, a principal fonte de exposição diária. (BERGER et al., 2016; CHAPIN et al., 2008; VANDENBERG et al., 2007b). Outras formas de exposição são via leite materno (YE et al., 2006), através da pele, por inalação, dentre outros (CHAPIN et al., 2008). Devido esta ampla utilização, o BPA pode ser detectado como efluente

em mares e rios, sendo portanto outra fonte de exposição importante, pois os processo de purificação de águas geralmente não promovem a remoção de produtos químicos (HUANG et al., 2012). Estima-se que o consumo global de BPA até 2022 seja de mais de 10,6 milhões de toneladas no mundo (ALMEIDA et al., 2018).

A toxicocinética mais conhecida é por meio da ingestão oral, devido a esta ser uma das principais fontes de exposição ao BPA (ALMEIDA et al., 2018). Após ser absorvido, o BPA sofre um amplo metabolismo de primeira passagem, e passa pelo metabolismo de fase II através da enzima glicuronosiltransferase, onde ocorre a formação de BPA-glicuronídeo, que é um metabólito mais solúvel, sendo possível sua excreção por via urinária e também biliar. Em humanos, a maior parte é excretado por via urinária e, em roedores, a grande maioria do composto é eliminado por meio da bile (FAO/WHO, 2011; MILEVA et al., 2014; VOLKEL et al., 2002). Este metabólito não possui atividade hormonal (VOLKEL et al., 2002).

Entretanto, nem todo o BPA é biotransformado, pois parte dele tem a capacidade de ir para a corrente sanguínea na forma livre, possibilitando a ligação à diversos receptores como os receptores estrogênicos (ESRs), receptores androgênicos (ARs), receptores de hormônios tireoidianos (THR), dentre outros (MILEVA et al., 2014; TENG et al., 2013; VOLKEL et al., 2002; WETHERILL et al., 2007a).

Os receptores estrogênicos Esr1 e Esr2 são uns dos principais alvos do BPA, devido a este ser considerado um mimetizador do estrogênio endógeno. O BPA tem a capacidade de ligar-se à estes receptores promovendo alterações na atividade dos hormônios naturais e desregulando portanto, todo o eixo HHO (WETHERILL et al., 2007a). Além da ligação à estes receptores nucleares, o BPA ainda tem a habilidade de se ligar aos receptores estrogênicos de membrana (mESRs) (MILEVA et al., 2014; NADAL et al., 2000).

Uma revisão sistemática realizada por Huang e colaboradores (2017) investigou a ingestão média diária mundial de BPA, mostrando que, apesar de ser, em média, quase a mesma quantidade ingerida por adultos e crianças, as crianças tem uma menos desenvolvida capacidade de metabolização pelo fígado das crianças, portanto permanece em maior concentração sérica. A concentração sérica em adultos foi de 30,46 ng/kg/dia e em crianças em média foi o dobro, cerca de 60,08 ng/kg/dia (HUANG et al., 2017).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos da América e a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar juntamente com a Organização Mundial da Saúde, a ingestão diária considerada segura de BPA é de até 50µg/kg/dia (BOLOGNESI et al., 2015). Apesar de ser considerada uma dose segura de exposição, que é abaixo da NOAEL reprodutiva (50mg/kg/dia), diversas pesquisas mostram que o BPA exerce um efeito de baixa

dose, ou seja, em concentrações ambientais muito baixas, na casa dos ng, pg, ele tem a capacidade de mimetizar os efeitos dos hormônios endógenos e promover a desregulação de diversos eixos do sistema endócrino (GIOIOSA et al., 2015; ZOELLER et al., 2012).

No trabalho de Oliveira e colaboradores (2017), ratas Wistar prenhes tratadas com 0,5mg/kg/dia e 5mg/kg/dia originaram filhotes com atraso na idade à puberdade devido à uma alteração na expressão gênica levando à reprogramação de todo o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (OLIVEIRA et al., 2017). Wisniewski *et al* (2015) também encontraram modificações espermáticas em proles de machos adultos onde as mães foram tratadas com 5mg/kg/dia e 25mg/kg/dia de BPA, na qual observou-se queda na qualidade, motilidade e reserva espermática (WISNIEWSKI et al., 2015). Lee e colaboradores (2003) mostraram que o BPA também exerce efeito antiandrogênico, inibindo a ligação da testosterona endógena de forma não competitiva.

Adolescentes e mulheres adultas diagnosticadas com síndrome do ovário policístico (SOP) apresentam níveis elevados de BPA, sugerindo um papel potencial desse agente químico na patogênese dessa complexa síndrome. Palioura e Diamanti-Kandarakis (2015) sugerem que o BPA “poderia alterar permanentemente a regulação neuroendócrina, reprodutiva e metabólica, favorecendo o desenvolvimento de SOP em mulheres geneticamente predispostas, ou poderia acelerar e / ou exacerbar o curso natural da síndrome durante a exposição ao ciclo de vida”. As pacientes apresentam desregulação reprodutiva e metabólica com secreção anormal de gonadotrofinas, maturação folicular ovariana interrompida, secreção de hormônios esteroides e resistência à insulina. A interação de componentes genéticos e ambientais pode contribuir para a expressão fenotípica final da SOP (PALIOURA; DIAMANTI-KANDARAKIS, 2015).

Um estudo de Zhang e colaboradores (2012) mostrou que a exposição das mães ao BPA gerou proles com oócitos com anormalidades cromossômicas. Karavan e colaboradores (2012) também encontrou uma diminuição de folículos primordiais e aumento de folículos antrais, (BERGER et al., 2016; KARAVAN; PEPLING, 2012). Além destas, o BPA pode alterar inúmeras vias de regulação hormonal, alterando partes chave do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (CASERTA et al., 2014).

Exposições BPA causaram defeitos no trato reprodutor feminino e masculino (RICHTER et al., 2007), alterações na diferenciação sexual cerebral (RUBIN et al., 2006), anormalidades em oocistos e espermatozoides (SUSIARJO et al., 2007; WISNIEWSKI et al., 2015), aumento de casos de cânceres malignos em idade adulta (HO et al., 2006; HUNT et al., 2009; VANDENBERG et al., 2009), dentro outros.

### 3 HIPÓTESE CENTRAL

A exposição pré pubere ao BPA gera alterações à programação epigenética do sistema neuroendócrino, afetando, portanto, a expressão de genes importantes para o funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano.

### 4. OBJETIVO GERAL

Elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da puberdade em ratas Wistar expostas a doses abaixo da NOAEL reprodutiva de BPA.

#### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a expressão relativa de genes relacionados com o desencadeamento da puberdade;
- b) Avaliar a expressão relativa de genes relacionados ao controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG):
  - b.1) No hipotálamo (*Gnrh1*, *Esr1*, *Esr2*, *kiss1*)
  - b.2) Na hipófise (*Gnrhr*, *Lhb*, *Fshb*, *Esr1*, *Esr2*, *Pgr*)
  - b.3) No ovário (*Lhr*, *Fshr*, *Esr2*, *Pgr*).
- d) Realizar as dosagens séricas de LH e FSH nas diferentes fases de desenvolvimento (pré púbere, puberdade e pós púbere) e nos grupos controle e tratado com BPA;

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) recém-desmamadas (dia pós-natal 22, DPN22), obtidas do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram aleatoriamente divididos inicialmente em dois grupos (controle e tratado) e estes grupos foram subdivididos em 3 subgrupos contendo 10 animais. Os subgrupos em questão tinham relação com o período de desenvolvimento o qual se realizou a eutanásia, que foi na idade pré púbere (próximo ao 25-27º dia), durante a puberdade (entre 28-32º dia) e após a identificação da puberdade (entre 33-35º dia). As ratas foram acomodadas em caixas de polipropileno (43x43x20 cm) com uma camada de 5 cm de maravalha, e alimentadas com ração comercial (Nuvilab CR-1, Quimtia, PR, Brasil) e água *ad libitum*. A sala de manutenção foi mantida em ciclo 12:12 horas claro/escuro e temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Todos os procedimentos estavam de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICENTRO, sob o parecer nº 004/2019.

O BPA foi solubilizado em óleo de milho e administrado por gavagem uma vez ao dia do DPN22 ao DPN35. A dose utilizada foi a de 5 mg/kg, que corresponde a uma dose dez vezes menor que a NOAEL reprodutiva, mas que já foi utilizada em estudos prévios do nosso grupo com efeito sobre o eixo HHG em machos (OLIVEIRA et al., 2017). O protocolo experimental foi baseado no preconizado pela EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) para o estudo dos desreguladores endócrinos químico (GOLDMAN et al., 2000).

### 5.2 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

#### 5.2.1 Sangue

Os animais foram eutanasiados em cada período de desenvolvimento sob anestesia geral contendo 60mg/kg de quetamina, 10mg/kg de xilazina e 3mg/kg de acepromazina via intraperitoneal. A coleta de sangue foi por punção cardíaca e após foi centrifugado a 3.500 rpm (Excelsa II 206 BL, São Paulo, SP, Brasil) por 15 minutos. Separou-se o soro em alíquotas individuais e este foi mantido a  $-80^\circ\text{C}$  para as análises hormonais.

### 5.2.2 Tecidos

As amostras foram colhidas antes, durante e após a identificação do início da puberdade com os animais devidamente anestesiados. Assim, dividiu-se 10 ratas na pré-puberdade, 10 ratas na puberdade e 10 ratas na pós-puberdade, totalizando 60 animais, 30 de cada um dos grupos (controle e BPA). Os tecidos estudados (hipotálamo, hipófise e ovário) foram rapidamente excisados (< 3 min), imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C até as posteriores análises.

### 5.3 IDADE À PUBERDADE

A puberdade em fêmeas é relacionada com a abertura do canal vaginal. Assim, a abertura vaginal foi verificada diariamente nas fêmeas a partir do dia pós-natal 22 (DPN22) por visualização externa. Os animais foram imobilizados com a mão esquerda e com a mão direita, a pele ao redor da genitália externa foi gentilmente manipulada para visualizar a abertura vaginal (GOLDMAN et al., 2000).

### 5.4 CURVA DE CRESCIMENTO CORPORAL

O crescimento corporal é um importante parâmetro de desenvolvimento e se correlaciona positivamente com a maturação do eixo HHG. Os animais foram pesados em balança de precisão uma vez ao dia durante todo o período experimental (GOLDMAN et al., 2000).

### 5.5 IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVAS DE GENES RELACIONADOS COM O DESENCADEAMENTO DA PUBERDADE E AO CONTROLE DO EIXO HHO

#### 5.5.1 Pulverização e extração do RNA total dos tecidos

Os tecidos foram pulverizados em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo. Posteriormente alíquotas foram transferidas para tubos tipo eppendorff e armazenadas à -80°C.

A extração do RNA total do hipotálamo, hipófise e ovários foi realizada pelo método guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987) através da utilização do Reagente Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, USA). Foi utilizado todo o tecido da hipófise,



hipotálamo e ovário para a extração do RNA total. O tecido pulverizado foi homogeneizado em 500µL do reagente Trizol® durante 1 minuto através do agitador vórtex. Em seguida as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 100µL de clorofórmio no tecido, foi homogeneizado em vórtex por 15 segundos e novamente as amostras ficaram por 5 minutos à temperatura ambiente (21°C). O próximo passo foi a separação de fases por meio da ultracentrifugação à 12000 × g, durante 5 minutos à 4°C. O RNA fica na fase aquosa e esta foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado com 250µL de isopropanol 100%, incubado de um à três dias à -20°C, dependendo das características do tecido. Após esse período, as amostras foram centrifugadas à 12000 × g, durante 30 minutos à 4°C. Removeu-se o sobrenadante, permanecendo apenas o sedimento de RNA. Este foi lavado com 500µL de etanol 75%, brevemente agitados e novamente centrifugados à 12000 × g, durante 5 minutos à 4°C. Este processo de lavagem foi realizado 2 vezes. Então, descartou-se os sobrenadantes e as amostras permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente para secagem. Ao final, as amostras foram ressuspensas com 15 à 50 µL de água livre de RNase (figura 3).

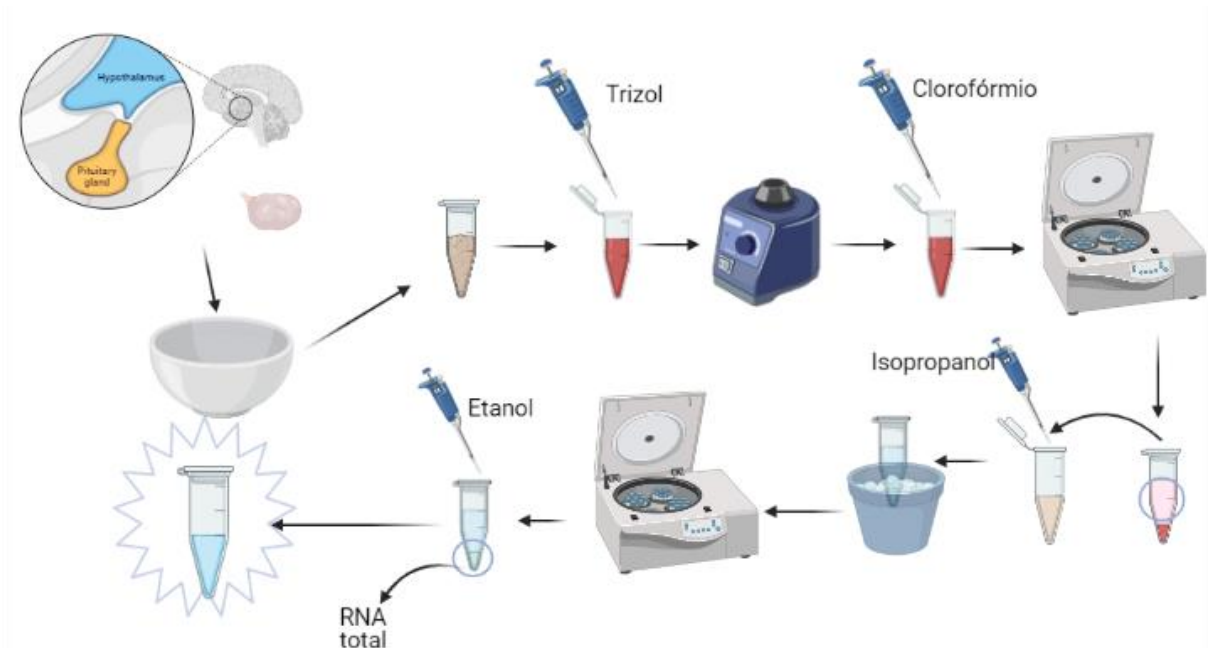


Figura 3 – Metodologia de pulverização dos tecidos hipotálamo, hipófise e ovário e extração do RNA total destes tecidos utilizando o método guanidina-fenol-clorofórmio através do reagente Trizol® (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). Ilustração criada através do BioRender.com

A concentração do RNA total foi estimada através da densidade óptica (DO) da solução obtida, utilizando nano espectrofotômetro Kasvi (modelo K23-0002), onde se determinou a absorbância do RNA em 260 nm e o grau de pureza foi determinado pela razão A260nm/280nm.

Após a quantificação, foi feita a análise da integridade do RNA por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em tampão TBE. As amostras restantes foram armazenadas a -80 °C.

Extração também foi feita manualmente com auxílio de um bastão de vidro. Esta foi necessária devido ao pequeno volume tecidual da hipófise, pois se fosse pulverizada em gral e pistilo seria perdido muito material. Desta forma, adicionou-se 250µL de reagente Trizol® no tubo eppendorf contendo a hipófise congelada. Com o bastão de vidro o tecido foi friccionado contra as paredes do tubo até a total homogeneização. Em seguida, acrescentou-se mais 250µL do reagente Trizol®. As etapas subsequentes foram iguais as já citadas acima.

### *5.5.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)*

Após a extração, 2,5 µg de RNA total foram submetidos à reação de transcrição reversa (RT) para a síntese de fitas de DNA complementar à fita de mRNA (cDNA), através do kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) utilizando como primer o oligo(dT), de acordo com as instruções do fabricante. Desta forma, foi adicionado em cada amostra 0,5 µL de oligo dT (0,5µg/µl), em seguida incubou-se a 70 °C por 5 min, no intuito de abrir a fita de RNA. No próximo passo, adicionou-se 0,5 mM de cada dNTP, 2 µL de GoScript 5X buffer, 0,25 µL de inibidor de RNase (Rnasin), 0,5 µL de enzima (200U/µl) M-MLV Reverse Transcriptase e água livre de nucleases qsp 10 µL. A reação sucedeu-se num ciclo de 25 °C por 5 min e em seguida a 42 °C por 60 min (Termociclador Axygem Maxygene modelo THERM-1000). Para cada reação obteve-se 10 µL de solução com concentração final de cDNA estimada em 250 ng/µL. As amostras foram armazenadas a -20 °C até subsequentes análises de PCR em tempo real.

### *5.5.3 Confeção dos oligonucleotídeos (primers)*

Os transcritos com as sequências de referência dos genes de interesse foram obtidos pelo GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os oligonucleotídeos foram confeccionados através do recurso Pick Primer, disponível no GenBank, que para conseguir uma maior especificidade do gene de interesse e não ocorrer a amplificação do DNA genômico, escolhe-se ao menos uma região de junção entre dois exons distintos. Os pares de oligonucleotídeos foram verificados quanto à ligações complementares pelos recursos do OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). O quadro 1 traz os nomes dos genes, as sequências dos oligonucleotídeos e o número da sequência de referência utilizada.

Quadro 1 - *Primers forward (F) e reverse (R)* dos genes utilizados para o ensaio de PCR em tempo com suas respectivas sequências de referência.

Gene	Prime (5'-3')	Sequência de referência
<b>Ers1</b> (Receptor de estradiol 1)	F: CCATATCCGGCACATGAGTA R: TGAAGACGATGAGCATCCAG	NM_012689.1
<b>Ers2</b> (Receptor de estradiol 2)	F: CTCACGTCAGGCACATCAGT R: TGTGAGCATTGAGCATCTCC	NM_012754.1
<b>Gnrh1</b> (Hormônio liberador de gonadotrofinas)	F: AGGAGCTCTGGAACGTCTGAT R: AGCGTCAATGTCACTCGG	NM_012767.2
<b>Fshr</b> (Receptor de hormônio folículo estimulante)	F: TCACTGGCTGTGTCATTGCTC R: AGATCTCTATTTTCTCCAGGTCTC	NM_199237.1
<b>Lhr</b> (Receptor de hormônio luteinizante)	F: AGTGGAGCCTTCCAGGGGGC R: AGGAAGACAGGGCGATGAGCGT	NM_012978.1
<b>Gnrhr</b> (Receptor de hormônio liberador de gonadotrofina)	F: GCTGCCTGTTCATCATCCCT R: CTGTAGTTTGCCTGGGTCCT	NM_031038.3
<b>Pgr</b> (Receptor de progesterona)	F:GGGCATGACAACACAAAGCC R:GTAAGTTCCGGAAACCTGGC	NM_022847.1
<b>Lhb</b> (Hormônio luteinizante)	F: ATGAGTTCTGCCAGTCTGC R: GTGGGTGGGCATCAGAAGAG	NM_012858.2
<b>Fshb</b> (Hormônio folículo estimulante)	F: AAGTCGATCCAGCTTTGCAT R: GTCCCAGGCCTTTACAGTG	NM_001007597.1
<b>Rpl19</b> (Proteína ribossomal 19)	F: CAATGAAACCAACGAAATCG R: TCAGGCCATCTTTGATCAGCT	NM_031103.1
<b>kiss1</b> (Neuropeptídeo kipeptina)	F: GGAGCCACTGGCAAAAATGG R: GCCAGGCATTAACGAGTTCC	NM_181692.1

#### 5.5.4 Padronização dos primers

Foi necessário padronizar os primers a partir de amostras controles dos tecidos hipotálamo, hipófise e ovário. Dessa forma, foram feitas diluições seriadas do cDNA obtido da reação de transcrição reversa para a construção de uma curva padrão relativa. Os pontos da curva foram submetidos a reações de PCR em tempo real com cada primer confeccionado. Nessas reações, espera-se que, à medida que diminui a quantidade de amostra presente em cada

ponto da curva, o número de ciclos necessários para emitir a mesma fluorescência, aumente proporcionalmente, desta forma, espera-se a diferença de 1 ciclo de PCR entre as concentrações para que elas emitam a mesma quantidade de fluorescência. Nessas condições, a eficiência de ligação do primer à sua região de interesse fica à 100 %, e o ideal é que fique entre 90 e 110 % (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram utilizados dois reagentes: kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UGD (Life Technologies Corporation, Van Allen Carlsbad, CA, USA) e kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Life Technologies, Van Allen Carlsbad, CA, USA). A diferença entre estes é basicamente a forma de conservação, o PowerUp pode ser conservado em geladeira e tem maior estabilidade à temperatura ambiente em relação ao Kit Platinum, mas eles funcionam da mesma maneira. Para confirmar a especificidade da reação, obteve-se uma curva de dissociação, utilizando como base a temperatura de dissociação (melt point), no qual ocorre um aquecimento lento das amostras, desde 58 °C a 95 °C, resultando em um único pico da curva por amostra, onde a temperatura de melt é aquela onde ocorre 50% da dissociação das duplas fitas.

#### 5.5.5 Reação de quantificação por PCR em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR)

A avaliação da expressão relativa dos genes responsivos ao eixo HHO foi feita pelo método de PCR quantitativo em tempo real com os recursos do equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore). Este ensaio promove etapas de amplificação e a detecção é realizada por meio de um sinal fluorescente fornecido pelo reagente Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix (Life Technologies) e kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Life Technologies) onde quanto mais DNA é produzido a cada ciclo da PCR maior é a fluorescência emitida. A quantidade relativa de mRNA dos genes estudados foi comparada com os níveis de mRNA do gene constitutivo de todas as amostras, a proteína ribossomal L19 (*Rpl19*).

As condições de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial à uma temperatura de 95 °C por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 30 segundos para anelamento e extensão para o kit Platinum, enquanto o kit PowerUp as condições de amplificação iniciaram com uma desnaturação à 95°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C por 1 minuto para o anelamento e extensão, respectivamente. A quantificação relativa foi calculada pelo método de  $2^{\Delta\Delta Ct}$  a partir do *cycle threshold* (Ct) fornecido pelo equipamento (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001)

## 5.6 DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS

### 5.6.1 FSH e LH

Os níveis séricos de FSH e LH foram determinados pelo ensaio de imunoquimioluminescência com os recursos do kit Luminex xMAP technology (Milliplex MAP rat pituitary panel, Billerica, MA, USA). Esta técnica faz a coloração interna de microesferas com dois diferentes corantes fluorescentes, no qual cada esfera colorida está relacionada a um anticorpo específico, podendo gerar cerca de 100 combinações distintas. Ocorre a captura do analito pela esfera correspondente e em seguida é adicionado o anticorpo biotinizado de detecção e incubado com estreptavidina ficoeritrina, que completa a reação. Por fim, é promovida uma excitação com um laser e cada microesfera é identificada de forma individual pelos processadores de sinais digitais que quantificam o ensaio através da emissão de fluorescência.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram primeiramente submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov e o teste de homocedasticidade de Bartlett. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de ANOVA de duas vias, seguidas por pós testes de Dunnet e Sidak, através de comparações planejadas, avaliando-se o efeito do tempo (antes, durante e após o início da puberdade) e do tratamento (0 ou 5 mg BPA/kg). As análises estatísticas foram realizadas com os recursos do software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e Statistica 7.0 (Statsoft. Inc). Foram consideradas diferenças estatísticas quando o valor de p foi menor que 0,05.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CURVA DE CRESCIMENTO CORPORAL

A evolução do peso e crescimento das ratas é um parâmetro muito importante para avaliar se o BPA afeta o desenvolvimento e metabolismo dos animais. Após o desmame (DPN22) as ratas foram pesadas diariamente até a eutanásia. A Figura 4 mostra a curva de evolução do peso das ratas do grupo controle e das tratadas. Pode-se observar que os gráficos estão quase que sobrepostos, sendo muito similares. Este é um parâmetro importante a ser delimitado, pois assim, se pode determinar se houveram alterações no eixo que são relacionadas ao crescimento. A justificativa dos tamanhos amostrais dos dados a seguir foi que utilizaríamos um número maior de animais, mas devido a problemas relacionados à pandemia, os biotérios acabaram não fornecendo os animais cujo o n foi inicialmente estipulado, sendo assim, demos continuidade aos estudos com o número amostral reduzido, por hora.

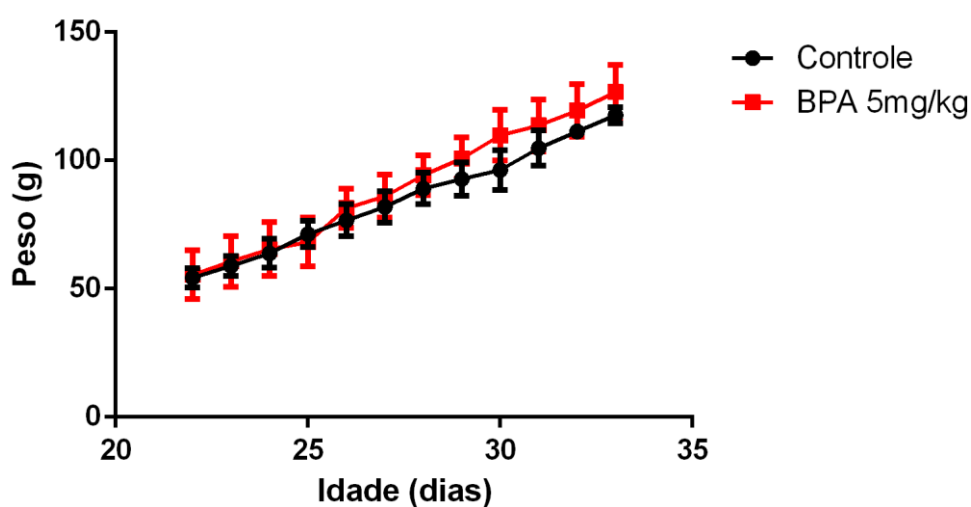


Figura 4 – Curva de crescimento corporal das ratas dos grupos controle e tratados com 5 mg/Kg de BPA do DPN22 ao DPN35 de idade dos animais. n=5/grupo

### 6.2 IDADE À PUBERDADE

Em relação a idade à puberdade, houve uma diferença entre as medianas, quase que imperceptível na figura, entretanto, o grupo controle apresentou uma mediana de 30,7 dias e o grupo tratado de 29,8 dias, mostrando assim, que houve um adiantamento na puberdade das

ratas tratadas com 5 mg/Kg de BPA, cerca de 1 dia de adiantamento comparadas as ratas do grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 5). Existem os intervalos interquartis, o qual é utilizado em análises não paramétricas, que é o caso deste dado, o que nos mostra o tamanho das bandas. O intervalo interquartil do grupo controle foi de [29;32,7] dias, e o intervalo interquartil do grupo tratado com BPA foi de [28;31] dias, reforçando, portanto, 1 dia de adiantamento na puberdade das ratas tratadas em relação às ratas do grupo controle.

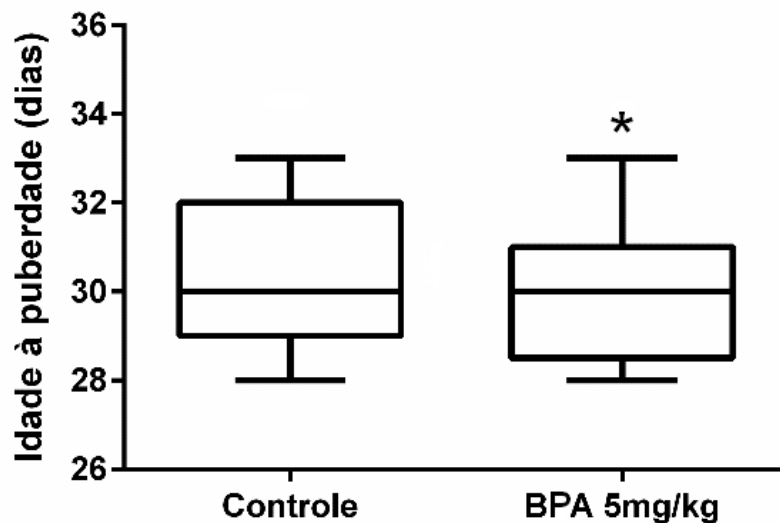


Figura 5 – Gráfico da idade à puberdade das ratas tratadas com 5 mg/Kg de BPA comparadas às ratas controle. Os dados estão expressos em mediana e intervalo interquartil (Kruskal-Wallis e pós- teste Dunn); \* diferença de  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. Mediana do grupo controle: 30,7; Intervalo interquartil controle [29;32,7]. Mediana do grupo tratado: 29,8; Intervalo interquartil do grupo tratado [28;31].  $n=5$ /grupo. BPA: Bisfenol A.

### 6.3 DOSAGENS SÉRICAS

As dosagens séricas de LH e FSH realizadas não mostraram diferenças significativas entre as ratas controle e as ratas tratadas com 5mg/Kg de BPA (figura 6).

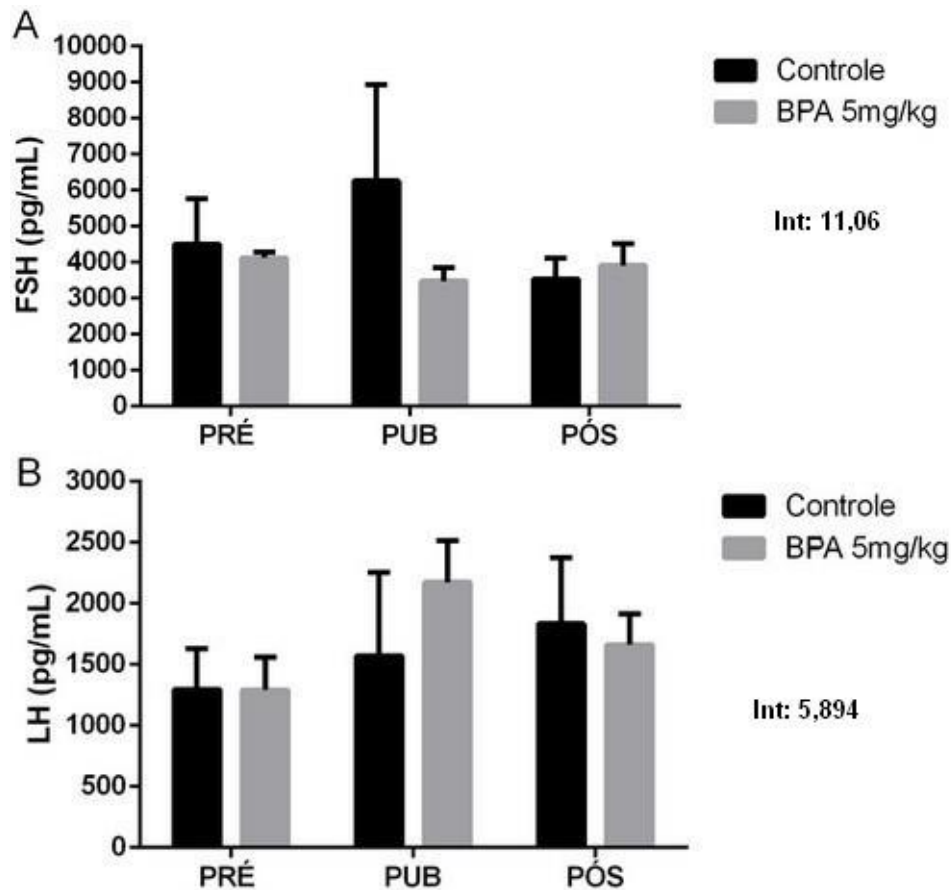


Figura 6 – Dosagens séricas de FSH (A) e LH (B) de ratas na idade pré púbere, púbere e pós púbere tratadas com 5mg/Kg de BPA e grupo controle. Os valores estão representados em média  $\pm$  E.P.M. (Two-way ANOVA [comparações planejadas] e pós-testes de Dunnet e Sidak),  $n=3$ /grupo. FSH: hormônio folículo estimulante. LH: hormônio luteinizante. BPA: Bisfenol A. E.P.M: Erro padrão da média. Int: interação entre os grupos (%).

#### 6.4 CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO PRÉ PUBERE AO BPA NO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-OVARIANO

##### 6.4.1 Padronização dos Primers

A padronização dos primers tem o intuito de promover análises com maior confiabilidade, auxiliando na amplificação dos genes e conferindo maior especificidade. Desta forma, curvas de diluição seriada foram feitas e submetidas à reação de PCR para a obtenção da curva padrão relativa e da eficiência da reação, com limiares de detecção em torno de 100 % e também foi possível otimizar as quantidades de primer e de cDNA usados em cada reação de quantificação relativa de cada transcrito. Alguns primers já haviam sido padronizados e



testados em outros trabalhos do laboratório. Estes foram *Gnrh1*, *Esr1*, *Esr2* no hipotálamo, *Gnrhr*, *Lhb*, *Fshb*, *Esr1*, *Esr2* na hipófise. Portanto, utilizou-se a concentração para 1  $\mu\text{M}$  de primer e quando necessário as doses foram ajustadas para 0,8 e 0,1  $\mu\text{M}$  de primers que não foram padronizados anteriormente para chegar em uma concentração que garantisse uma boa eficiência da reação. O quadro 2 mostra as concentrações de primer, de cDNA e a eficiência em cada Kit e em cada tecido.

Quadro 2 - Padronização do ensaio de RT-qPCR para os genes *Esr2*, *Pgr*, *Kiss1*, *Lhr*, *Fshr* e *Rpl19* no hipotálamo, hipófise e ovário.

Tecido	Gene	Concentração de primer ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de cDNA (ng)	Eficiência (%)	Kit
Hipotálamo	<i>kiss1</i>	0,1	50	96%	PowerUp
Hipotálamo	<i>Pgr</i>	0,1	50	91%	PowerUp
Hipófise	<i>Pgr</i>	0,1	50	102%	Platinum
Ovário	<i>Pgr</i>	0,1	50	101%	PowerUp
Ovário	<i>Esr2</i>	0,8	50	112%	Platinum
Ovário	<i>Lhr</i>	1	50	130%	Platinum
Ovário	<i>Fshr</i>	1	50	107%	Platinum
Ovário	<i>Rpl19</i>	1	50	111%	Platinum

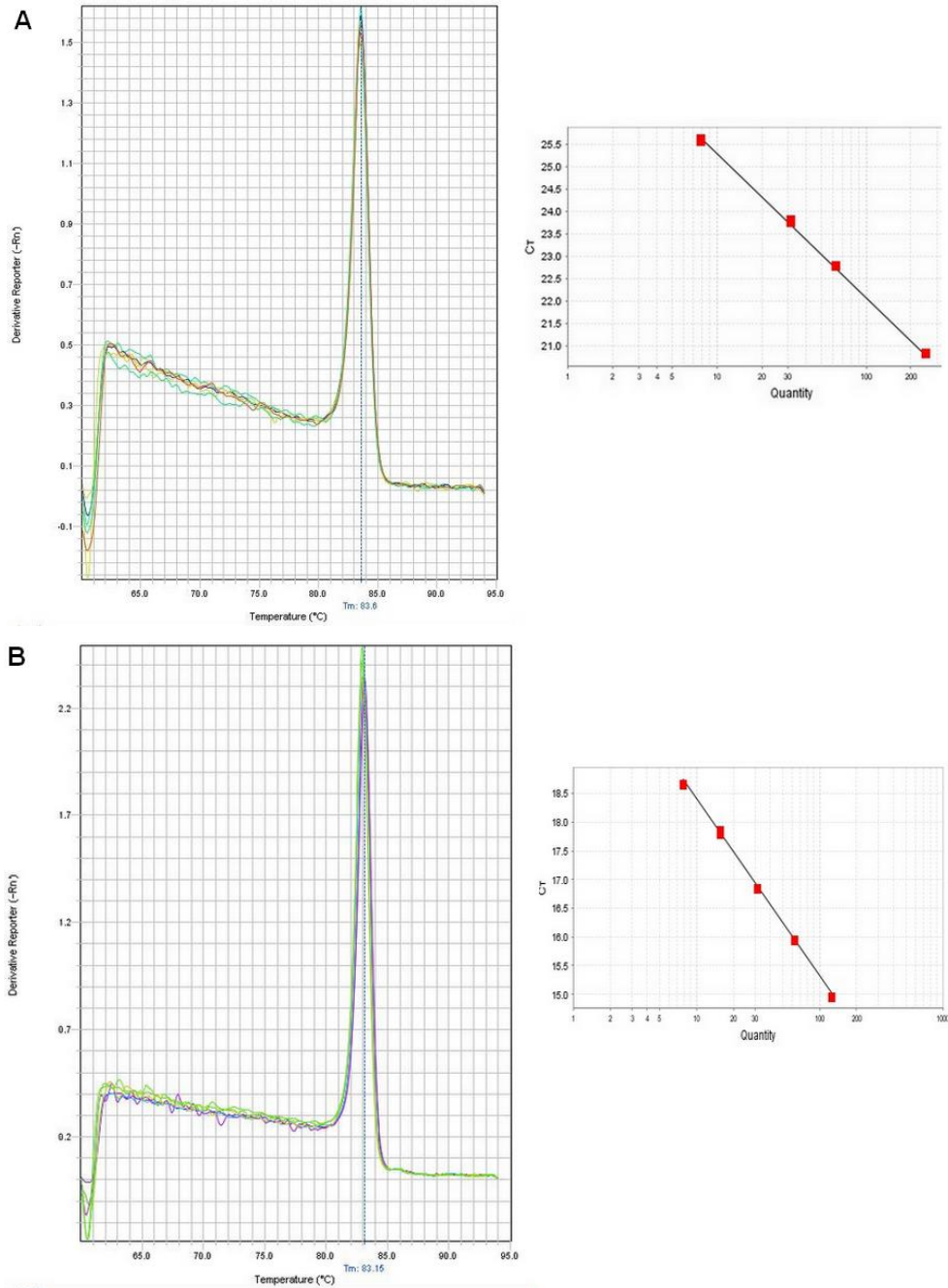


Figura 7 – Curva de dissociação (à direita) e curva padrão relativa (à esquerda). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios da *kiss1* (A), *Pgr* (B) no hipotálamo. *kiss1*: receptor de kisseptina. *Pgr*: receptor de progesterona.

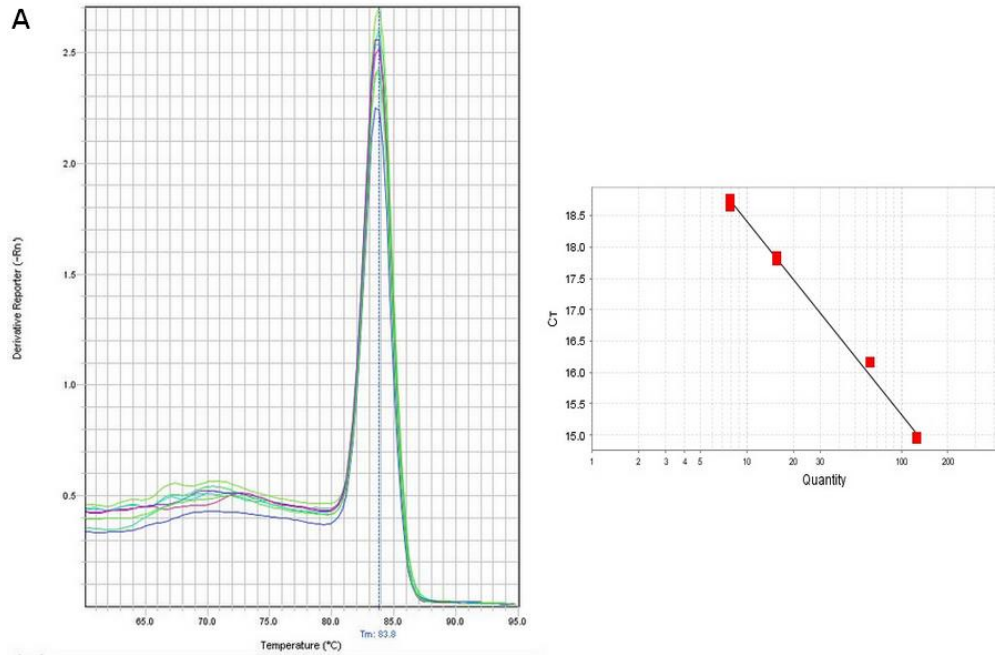
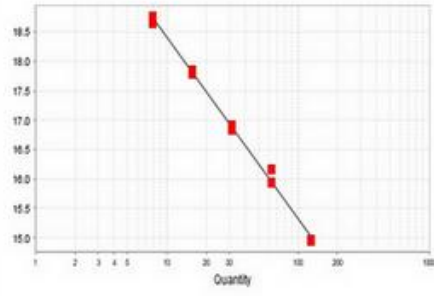
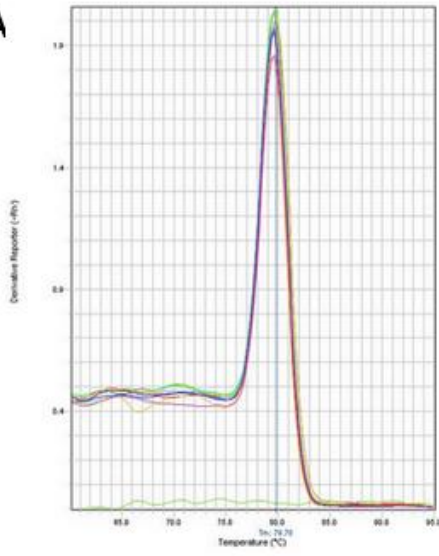
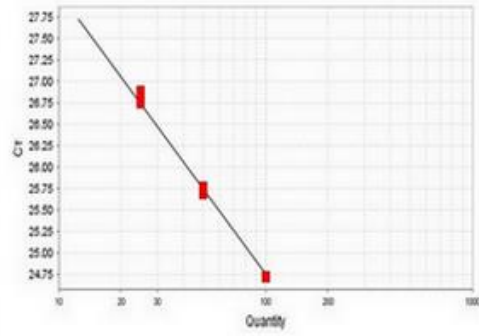
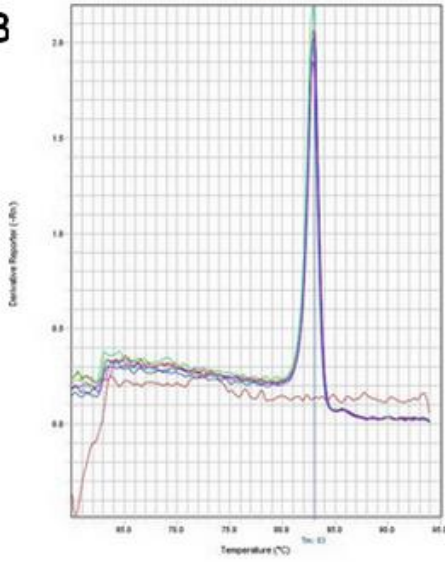


Figura 8 – Curva de dissociação (à direita) e curva padrão relativa (à esquerda). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios da *Pgr* (A) na hipófise. *Pgr*: receptor de progesterona.

**A**



**B**



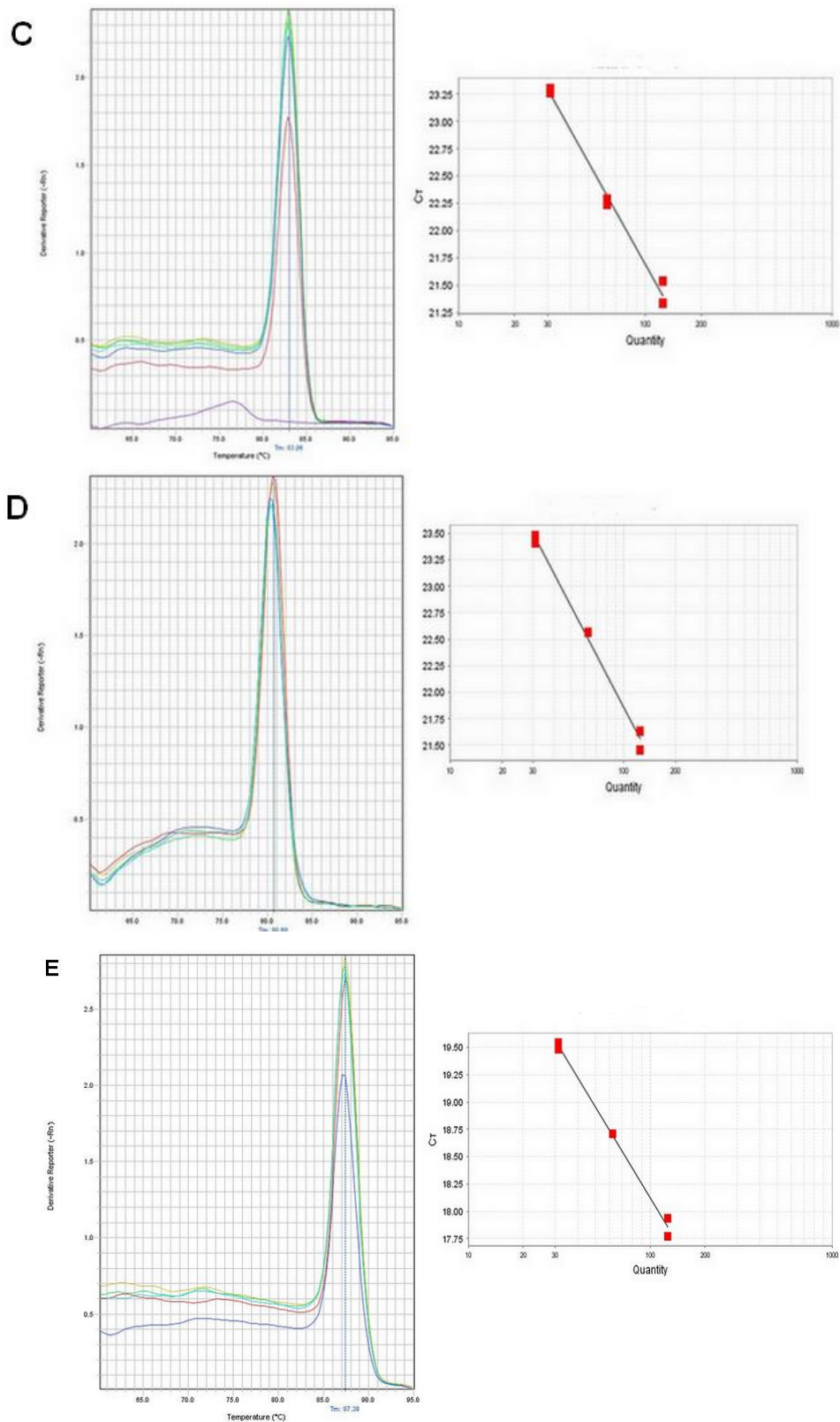


Figura 9 – Curva de dissociação (à direita) e curva padrão relativa (à esquerda). As imagens mostram a especificidade da reação e a eficiência de amplificação para os ensaios da *Rpl19* (A), *Pgr* (B), *Esr2* (C), *Fshr* (D) e *Lhr* (E) no ovário. *Rpl19*: proteína ribossomal 19. *Pgr*: receptor de progesterona. *Esr2*: receptor de estradiol tipo 2. *Fshr*: receptor de hormônio folículo estimulante. *Lhr*: receptor do hormônio lueínizante

#### 6.4.2 Consequências da exposição pré-púbere ao BPA no hipotálamo

A exposição ao BPA no período pré-púbere causou algumas alterações no hipotálamo. Houve uma diferença entre as fases de desenvolvimento do grupo controle, onde ocorreu a diminuição nos transcritos de *Gnrh1* da idade pós-púbere em relação à idade pré-púbere ( $p < 0,05$ ) (figura 10A). Na figura 10B, também se observa uma diferença entre as fases de desenvolvimento do grupo tratado, no qual mostra um aumento dos transcritos de *kiss1* na idade à puberdade ( $p = 0,01$ ) e na idade após a puberdade ( $p < 0,001$ ) quando comparadas à idade pré-puberdade. Ainda na figura 10B, é possível visualizar uma diferença entre os tratamentos, o qual, o grupo que recebeu 5mg/Kg de BPA teve um aumento nos transcritos de *kiss1* em relação ao grupo controle, isso na idade pós-púbere ( $p < 0,01$ ). Os transcritos *Esr2* apresentaram uma tendência à diminuição na expressão de mRNA em diferentes fases de desenvolvimento, onde mostrou-se um pouco menor na idade à puberdade em relação à idade pré-púbere do grupo tratado com BPA ( $p = 0,07$ ), isso pode ser considerado uma alteração de *border line*, onde os dados estão dentro de um intervalo muito próximo à relevância estatística. Os demais genes (*Esr1* e *Pgr*) não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

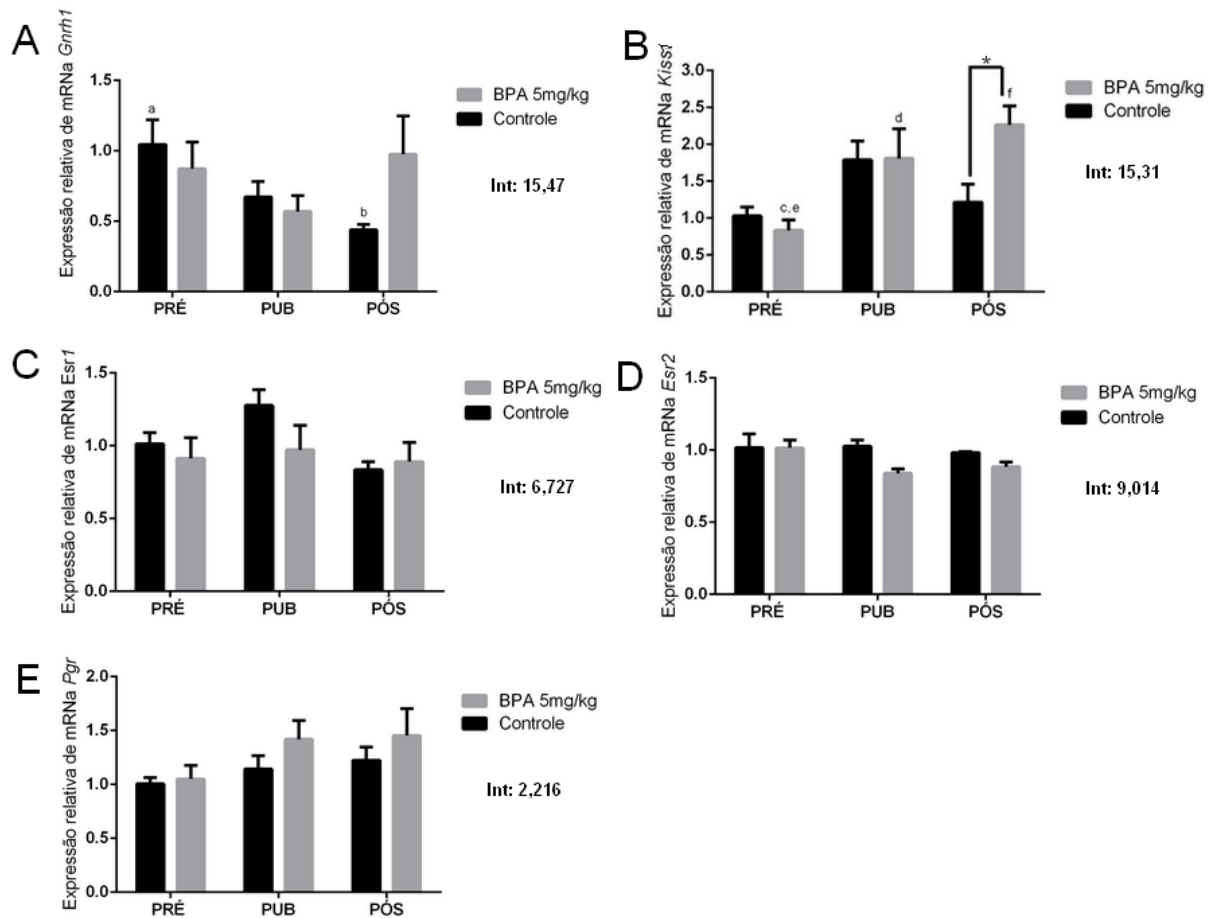


Figura 10 – Expressão dos transcritos de *GnRH1* (A), *kiss1* (B), *Esr1* (C), *Esr2* (D) e *Pgr* (E) no hipotálamo de ratas na fase pré-púbere, púbere e pós-púbere tratadas com 5 mg/Kg de BPA e grupo controle. Utilizou-se o *Rpl19* como gene constitutivo. Os valores estão representados em média  $\pm$  E.P.M. (Two-way ANOVA [comparações planejadas] e pós-testes de Dunnet e Sidak),  $n=5$ /grupo. a,b ( $p=0,05$ ) em relação ao grupo controle pré pubere; c,d ( $p=0,01$ ) em relação ao grupo tratado pré pubere, e,f ( $p<0,001$  em relação ao grupo tratado pré púbere ); \* ( $p=0,01$ ) em relação ao grupo controle pós púbere. *Rpl19*: proteína ribossomal 19. *Pgr*: receptor de progesterona. *Esr1*: receptor de estradiol tipo 1. *Esr2*: receptor de estradiol tipo 2. *kiss1*: receptor de kipeptina. Int: interação entre os grupos (%).

#### 6.4.3 Consequências à exposição pré pubere ao BPA na hipófise

Na hipófise não houve diferenças estatísticas, entretanto, a maioria dos dados apresentou tendência.

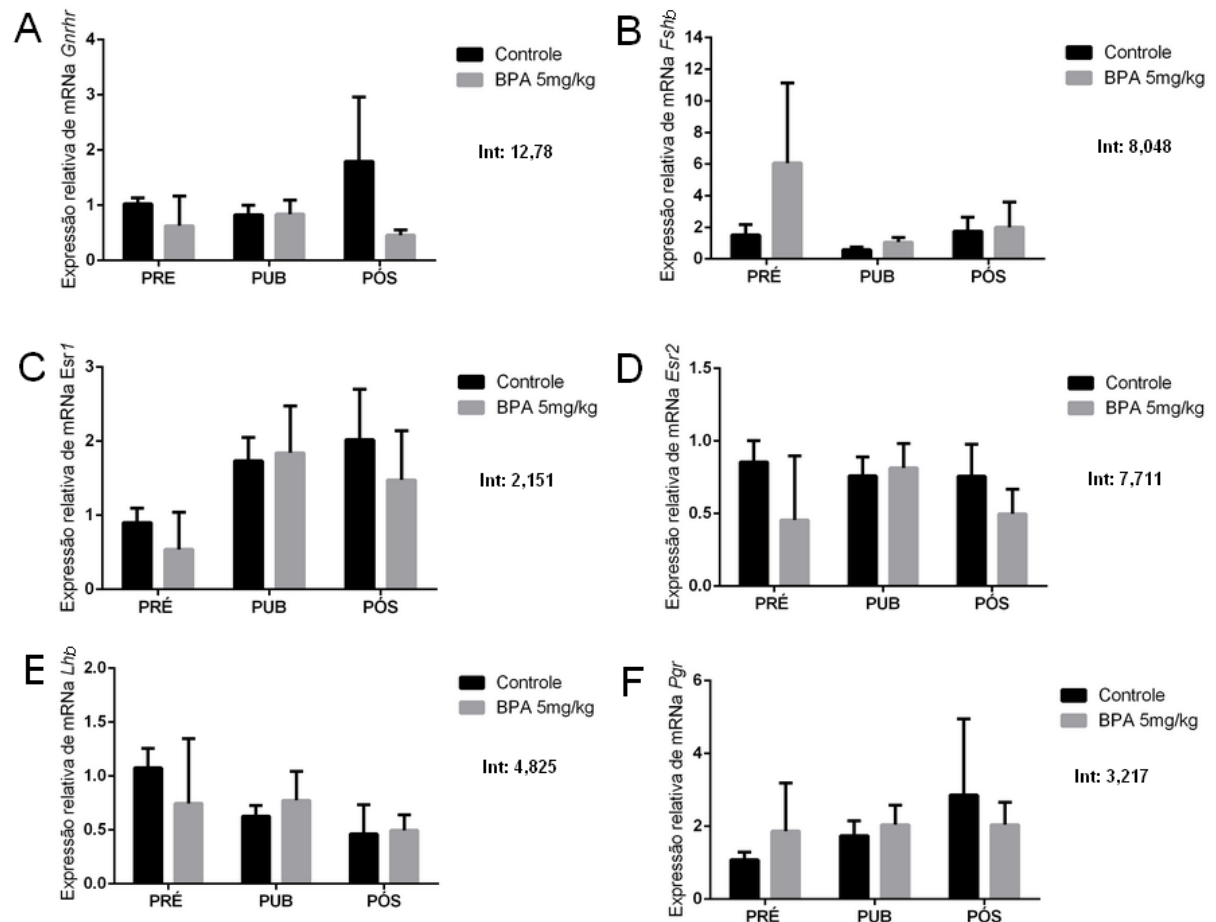


Figura 11 – Expressão dos transcritos de *Gnhr* (A), *Fshb* (B), *Esr1* (C), *Esr2* (D), *Lhb* (E) e *Pgr* (F) na hipófise de ratas na fase pré-púbere, púbere e pós-púbere tratadas com 5 mg/Kg de BPA e grupo controle. Utilizou-se o Rpl19 como gene constitutivo. Os valores estão representados em média  $\pm$  E.P.M. (Two-way ANOVA [comparações planejadas] e pós-testes de Dunnett e Sidak),  $n=3-5$ /grupo. *Pgr*: receptor de progesterona. *Esr1*: receptor de estradiol tipo 1. *Esr2*: receptor de estradiol tipo 2. *Gnhr*: receptor do hormônio liberador de gonadotrofina. *Fshb*: hormônio folículo estimulante do tipo beta. *Lhb*: hormônio luteinizante do tipo beta. Int: interação entre os grupos (%).

#### 6.4.4 Consequências da exposição pré-pubere ao BPA no ovário

No ovário houve uma diferença nos transcritos de *Esr2* entre as fases de desenvolvimento (pré púbere, puberdade e pós púbere) no grupo controle ( $p < 0,05$ ) e no grupo tratado também (pré púbere, puberdade e pós púbere) com  $p < 0,001$  (figura 12A). Enquanto *Fshr*, *Pgr* e *Lhr* não apresentaram diferença estatística significativa nem entre as fases de desenvolvimento e nem com relação aos diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ).



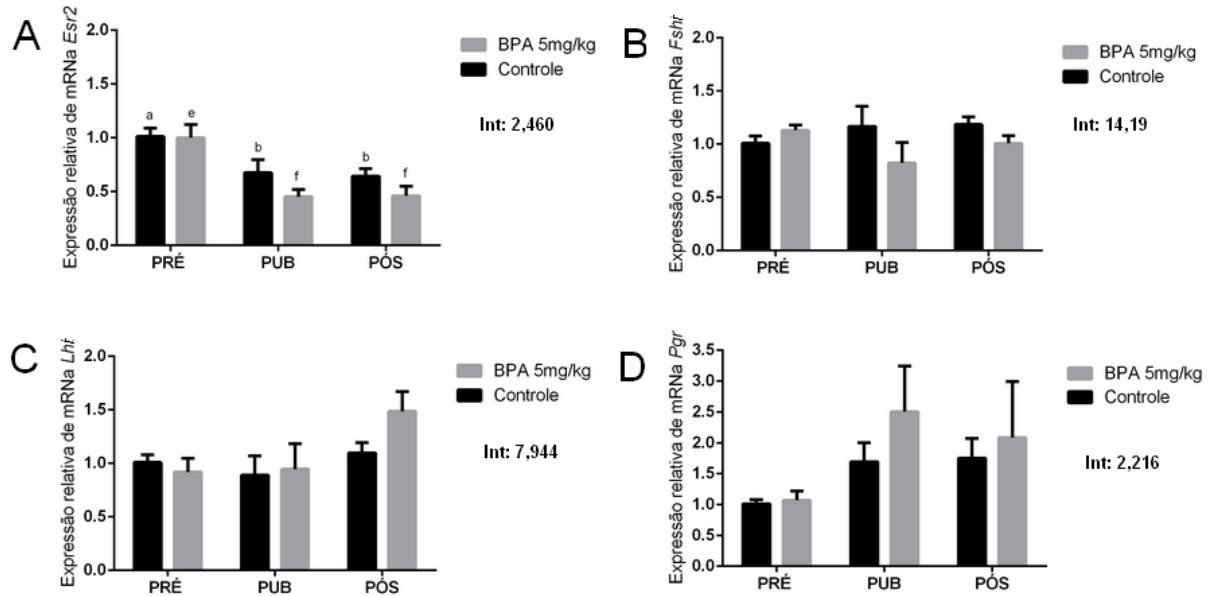


Figura 12 – Expressão dos transcritos de *Esr2* (A), *Fshr* (B), *Lhr* (C) e *Pgr* (D) no ovário de ratas na fase pré-púbere, púbere e pós-púbere tratadas com 5 mg/Kg de BPA e grupo controle. Utilizou-se o *Rpl19* como gene constitutivo. Os valores estão representados em média  $\pm$  E.P.M. (Two-way ANOVA [comparações planejadas] e pós-testes de Dunnett e Sidak),  $n=5$ /grupo. a,b ( $p<0,05$ ); e,f ( $p=0,001$ ). *Pgr*: receptor de progesterona. *Esr2*: receptor de estradiol tipo 2. *Fshr*: receptor do hormônio folículo estimulante do tipo beta. *Lhr*: receptor do hormônio luteinizante do tipo beta. Int: interação entre os grupos (%).

## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve o intuito de avaliar o efeito da exposição peripuberal a uma baixa dose de bisfenol A e identificar possíveis mecanismos envolvidos no desencadeamento da puberdade precoce em ratas Wistar. Buscou-se assim simular uma possível exposição ambiental ao uso de produtos contendo BPA, durante a fase pré-púbere, a qual é um período crítico no desenvolvimento das características reprodutivas.

O BPA é considerado um mimetizador de estrogênio, ou seja, ele se liga ao receptor do hormônio, agindo de forma similar a ele ou até deslocando o hormônio endógeno por estar em sua forma livre. O estrogênio é o principal hormônio feminino, responsável pelo início e controle da puberdade, além de inúmeros processos fisiológicos da mulher, como o desenvolvimento corporal (STAHLHUT; WELSHONS; SWAN, 2009; VANDENBERG et al., 2009) (figura 13).

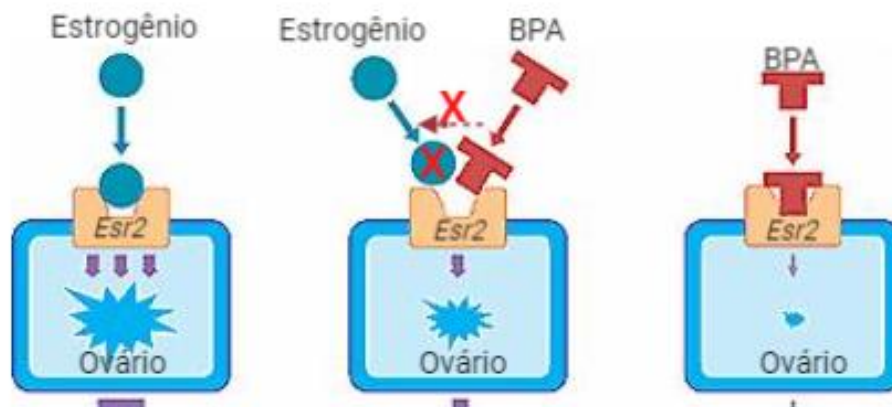


Figura 13 – Mecanismo de ligação do estrogênio ao seu receptor, juntamente com o mecanismo de agonismo e antagonismo do BPA frente aos receptores *Ers* (STAHLHUT; WELSHONS; SWAN, 2009; VANDENBERG et al., 2009). Adaptado. Fonte: <https://imgbin.com/png/m6YPacu3/receptor-antagonist-agonist-antagonist-dopamine-png>

No presente estudo, não houve alterações significativas no crescimento e peso das ratas tratadas com BPA em relação ao grupo controle (figura 4). O estudo de Adewale (2011) mostrou que os efeitos decorrentes à exposições à 50 mg/kg de BPA pode ser idade dependente, onde as mulheres obtiveram um aumento significativo no peso corporal de forma tardia, na idade adulta, entretanto, mantiveram-se normais na puberdade (ADEWALE et al., 2011). Sabe-se que os adipócitos são sensíveis ao estrogênio, pois expressam os genes *Esr1* e *Esr2*, desta

forma, o BPA pode estar desregulando essa via fisiológica, por antagonismo principalmente, causando consequências na vida adulta como obesidade e diminuição da resistência à insulina (ADEWALE et al., 2011; HUGO et al., 2008; SANTOS-SILVA et al., 2018).

Nas últimas décadas, foram relatadas inúmeras alterações reprodutivas. Observa-se que crianças tem entrado cada vez mais cedo na puberdade, e isto pode estar sendo associado a fatores ambientais como a exposição a plastificantes, herbicidas, agrotóxicos e até mesmo fatores comportamentais, como a exposição à conteúdos áudio-visuais carregados de erotismo, também fatores nutricionais e de estilo de vida (VANDENBERG et al., 2010). Em meninas, o adiantamento da puberdade vem aumentando lentamente, em que a idade à menarca vem sofrendo modificações com o passar dos séculos (HOYT et al., 2020; LEE et al., 2019). Por exemplo, na Coreia, em 1925 a idade média à menarca era de 16 anos, e em 1994 passou a ser de 12,6 anos. (CHO et al., 2010; LEE et al., 2019). Um estudo comparativo feito por pesquisadores da Universidade do Bronx mostrou que o adiantamento na menarca em meninas foi associado ao aumento do IMC, sintomas antissociais e depressivos e aumento do abuso de drogas em relação à meninas do grupos controle, ou seja, que entraram na puberdade na idade média ideal (HOYT et al., 2020).

No presente estudo, os dados mostram que houve um adiantamento na idade à puberdade das ratas tratadas com 5mg/kg de BPA em cerca de 1 dia (figura 5). Pode parecer pouco, mas se extrapolarmos os dados, levando em consideração o rápido desenvolvimento de ratos, seria o equivalente à cerca de 3 meses em humanos (ANDREOLLO et al., 2012). Esse adiantamento na puberdade ocorreu em exposições ao BPA em doses abaixo da NOAEL, onde não se espera que hajam efeitos adversos, entretanto, a exposição diária ao composto apresentou efeitos indesejáveis ao eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano. Esses efeitos de baixas doses são geralmente silenciosos e podem apresentar consequências a longo prazo (VANDENBERG et al., 2012a).

A exposição ao BPA no período pré-púbere ocasionou um aumento na expressão da *kiss1* no hipotálamo no grupo tratado em relação ao grupo controle (figura 10B). Ruiz-Pino (2019) e colaboradores também encontraram esta alteração (RUIZ-PINO et al., 2019). Segundo Mueller (2014) o mecanismo de ação pelo qual o BPA age no hipotálamo é através da ativação direta da expressão da *kiss1*, o que modifica a ligação do estrogênio endógeno ao receptor, causando a desregulação da via de iniciação da puberdade (MUELLER; HEGER, 2014). Este achado condiz com o aumento dos transcritos de *Gnrhl* no hipotálamo no grupo tratado pós-púbere (figura 10A), explicando também o adiantamento da puberdade (figura 5). Sabe-se que

a *kiss1* tem o papel crucial na iniciação da puberdade, pois esta estimula a pulsação de GnRH (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY; COLLEDGE, 2010).

Não foram encontradas diferenças na concentração de LH e FSH em relação aos grupos controle versus tratados, em todos os subgrupos (pré púbere, puberdade e pós púbere) (figura 6). Sabe-se que o BPA tem a capacidade de influenciar na produção do FSH e LH, o que pode afetar toda a produção gonadal via eixo, por feedback negativo, e causar alterações na produção de estrogênio e progesterona (ZAID; OTHMAN; KASSIM, 2018). Hanaoka e colaboradores (2002) encontraram uma correlação entre altos níveis de BPA na urina e diminuição sérica de FSH e consequentemente uma deficiência na produção de progesterona (HANAOKA et al., 2002).

Com relação aos dados da hipófise (figura 11), não apresentaram diferenças entre os grupos. Alterações via eixo hipotalâmico hipofisário podem ocorrer em pontos específicos no eixo, como o que se observou neste trabalho. Fernandez e colaboradores (2009) observaram uma diminuição na liberação de LH basal induzida por aumento de GnRH causado pela exposição ao BPA, devido à possivelmente uma desregulação no pulso de GnRH levando à uma dessensibilização do *GnRHr* na hipófise (FERNÁNDEZ et al., 2009). Existe a necessidade de aumentar o tamanho amostral para que se consigam resultados com maior representatividade estatística.

Em relação a diminuição dos transcritos de *Esr2* no ovário (figura 12) Wei e colaboradores (2020) também encontraram essa diminuição, mostrando que antes da puberdade as ratas tinham quantidade maior de receptores no ovário comparado à idade adulta (WEI et al., 2020). Sabe-se que o BPA é um mimetizador do estrogênio, ou seja, liga-se aos receptores *Esr* e *mEsr* ou *Gper*, deslocando ou bloqueando a ligação do estrogênio endógeno (WETHERILL et al., 2007b). Devido ao excesso deste desregulador na idade pré-púbere, fisiologicamente, inicia-se a produção de uma maior quantidade de receptores para suprir a necessidade deste excesso. Entretanto, devido a esta constante ativação do receptor, acredita-se que pode ocorrer uma dessensibilização do mesmo, no qual diminui-se consideravelmente em quantidade durante e após a idade púbere (ALONSO-MAGDALENA et al., 2012).

Kundakovic e colaboradores (2013) observaram uma diminuição nos transcritos de *Esr* no hipotálamo em proles de fêmeas tratadas com BPA. Essa diminuição ocorreu devido uma hipometilação do gene, causando assim uma redução dos níveis de transcritos de *Esr* nas demais vias do eixo. Acredita-se que possa ter ocorrido mecanismos adicionais nessa regulação epigenética (CASERTA et al., 2014; KUNDAKOVIC et al., 2013). No presente trabalho não ocorreu diminuição dos transcritos de *Esr2* no hipotálamo, mas apresentou uma tendência,

conhecida como *border-line*, além disto, diminuiu no ovário. Um provável efeito cascata pode ter levado à desregulação inicial no hipotálamo o que reflete em todo o eixo da fisiológico do sistema reprodutor ou até mesmo, um efeito diretamente no ovário.

O impacto a saúde humana e selvagem causada pelo BPA tem sido fortemente reportada. Todos os dados encontrados na literatura buscam demonstrar o BPA como um desregulador endócrino químico, e como tal, pode agir em diferentes vias fisiológicas e com curvas dose resposta não monotônicas. Este é um dos principais desafios das pesquisas envolvendo estes tipos de compostos, pois doses respostas não monotônicas não seguem um padrão (CONOLLY; LUTZ, 2004), o que se pode observar em tantos trabalhos, dados discrepantes uns dos outros, portanto torna-se mais instigante a procura por mecanismos celulares a respeito deste tema.

Existe uma relevância científica do bisfenol A na sociedade devido à grande quantidade de produtos em insumos fabricados a base deste. Como se tem descoberto, não apenas na parte reprodutora, o BPA pode afetar vias metabólicas importantes, levando ao desenvolvimento de diabetes (PROVVISIERO et al., 2016; TUDURÍ et al., 2018), obesidade (DABEER et al., 2020; MIRMIRA; EVANS-MOLINA, 2014), aumentando a prevalência de doenças como a depressão (ALMEIDA et al., 2018). Por essa razão a importância de conhecer os mecanismos pelos quais esse desregulador age e quais as implicações nas futuras gerações.

No presente trabalho, mostramos, por exemplo, que a expressão de genes reguladores do eixo HHO foi alterada no hipotálamo em uma dose dez vezes menor do que a NOAEL reprodutiva. Esta dose também, pode ter reduzido a expressão de receptores de estradiol do tipo beta nos ovários. Tratando-se de uma dose muito baixa, alguns parâmetros não sofreram alterações, como por exemplo, expressos de hormônio luteinizante e folículo estimulante do tipo beta na hipófise e em níveis séricos, mostrando que, não existe uma dose resposta linear e nem uma alteração em todas as vias do eixo HHO, desta forma, muitas pesquisas trazem um nível de segurança relativo à estas doses. Por esta razão a comunidade científica segue em busca de novos resultados e explicações para tentar montar este quebra cabeça que é o sistema endócrino.

## 8 CONCLUSÕES

A antecipação da puberdade em ratas expostas ao BPA está relacionada a alterações na expressão da kisspeptina no hipotálamo, que estão relacionadas ao desencadeamento da síntese e secreção de GnRH.

Diminuições na expressão de *Esr2* no ovário podem estar relacionadas à uma dessensibilização do receptor.

Tais alterações demonstram que exposições à BPA em doses abaixo da NOEAL podem causar comprometimento do sistema reprodutor feminino, uma vez que o período pré-púbere é suscetível a desreguladores endócrinos químicos, como o BPA, gerando, portanto, consequências na vida adulta.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. P. et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 26, p. 2467–2475, jun. 2013.

ABREU, A. P.; KAISER, U. B. Pubertal development and regulation. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 254–264, mar. 2016a.

ABREU, A. P.; KAISER, U. B. Pubertal development and regulation. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 254–264, mar. 2016b.

ACHERMANN, J. C. et al. Genetic Causes of Human Reproductive Disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2447–2454, 2002.

ADEWALE, H. B. et al. The impact of neonatal bisphenol-A exposure on sexually dimorphic hypothalamic nuclei in the female rat. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 1, p. 38–49, jan. 2011.

ALMEIDA, S. et al. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 6, p. 1503–1517, 2018.

ALONSO-MAGDALENA, P. et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, n. 2, p. 201–207, 2012.

ANDREOLLO, N. A. et al. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, 2012.

BACHEGA, T. A. S. S. et al. **Os interferentes endócrinos ambientais precisam receber a atenção dos endocrinologistas brasileiros** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* scielo , , 2011.

BERGER, A. et al. The effects of in utero bisphenol A exposure on the ovaries in multiple generations of mice. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 60, p. 39–52, abr. 2016.

BERGER, R. G.; SHAW, J.; DECATANZARO, D. Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 26, n. 2, p. 94–99, out. 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências** *Química Nova* scielo , , 2007.

BOLOGNESI, C. et al. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. **EFSA Journal**, 2015.

CASERTA, D. et al. Bisphenol A and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 37, 9 maio 2014.

CAVALLIN, M. D. et al. The hypothalamic-pituitary-testicular axis and the testicular function are modulated after silver nanoparticle exposure. **Toxicology research**, v. 7, n. 1, p. 102–116, jan. 2018.

CHAPIN, R. E. et al. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 83, n. 3, p. 157–395, jun. 2008.

CHILDS, G. V. CHAPTER 29 - Gonadotropes and Lactotropes. In: NEILL, J. D. (Ed.). . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. Third Edit ed. St Louis: Academic Press, 2006. p. 1483–1579.

CHO, G. J. et al. Age at menarche in a Korean population: secular trends and influencing factors. **European journal of pediatrics**, v. 169, n. 1, p. 89–94, jan. 2010.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, abr. 1987.

CONOLLY, R. B.; LUTZ, W. K. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 151–157, jan. 2004.

COSTA, E. M. F. et al. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 153–161, mar. 2014.

D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W. H. The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction. **Physiology**, v. 25, n. 4, p. 207–217, 1 ago. 2010.

DA CONCEIÇÃO, R. R. et al. Anatomical specificity of the brain in the modulation of Neuroglobin and Cytoglobin genes after chronic bisphenol a exposure. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 6, p. 1843–1851, 18 dez. 2017.

DABEER, S. et al. Transgenerational effect of parental obesity and chronic parental bisphenol A exposure on hormonal profile and reproductive organs of preadolescent Wistar rats of F1 generation: A one-generation study. **Human & experimental toxicology**, v. 39, n. 1, p. 59–76, jan. 2020.

DE SOUZA, J. S. et al. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. **Toxicology**, v. 377, p. 25–37, fev. 2017.

DECHERF, S.; DEMENEIX, B. A. The obesogen hypothesis: a shift of focus from the periphery to the hypothalamus. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 14, n. 5–7, p. 423–448, 2011.

DEL RIO GOMEZ, I. et al. Number of boys born to men exposed to polychlorinated byphenyls. **Lancet (London, England)**, v. 360, n. 9327, p. 143–144, jul. 2002.

FAO/WHO. **Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Report of Joint FAO/WHO**



**Expert Meeting and Report of Stakeholder Meeting on Bisphenol A** World Health Organization Geneva, , 2011.

FERNÁNDEZ, M. et al. Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 5, p. 757–762, maio 2009.

GARDINER, J. R.; SWAIN, A. Chapter 7 - Sex Determination and Differentiation. In: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Eds.). . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)**. Fourth Edi ed. San Diego: Academic Press, 2015. p. 267–292.

GIOIOSA, L. et al. Risk Evaluation of Endocrine-Disrupting Chemicals: Effects of Developmental Exposure to Low Doses of Bisphenol A on Behavior and Physiology in Mice (*Mus musculus*). **Dose-response : a publication of International Hormesis Society**, v. 13, n. 4, p. 1559325815610760, 2015.

GOLDMAN, J. M. et al. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, n. 2, p. 135–196, mar. 2000.

GORE, A. C. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 358–374, jun. 2008.

HANAOKA, T. et al. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. **Occupational and environmental medicine**, v. 59, n. 9, p. 625–628, set. 2002.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 2, p. 175–200, abr. 2002.

HERBISON, A. E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 8, p. 452–466, 20 ago. 2016.

HO, S.-M. et al. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. **Cancer research**, v. 66, n. 11, p. 5624–5632, jun. 2006.

HO, S.-M. et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 68, p. 85–104, 2017.

HOYT, L. T. et al. Timing of puberty in boys and girls: Implications for population health. **SSM - population health**, v. 10, p. 100549, abr. 2020.

HUANG, R. et al. Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 143–152, nov. 2017.

HUANG, Y. Q. et al. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. **Environment international**, v. 42, p. 91–99, jul. 2012.

HUGO, E. R. et al. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release

from human adipose tissue explants and adipocytes. **Environmental health perspectives**, v. 116, n. 12, p. 1642–1647, dez. 2008.

HUNT, P. A. et al. The Bisphenol A Experience: A Primer for the Analysis of Environmental Effects on Mammalian Reproduction<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 5, p. 807–813, 1 nov. 2009.

KAISER, U. B. et al. Differential Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Pulse Frequency on Gonadotropin Subunit and GnRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels *in Vitro*<sup>1</sup>. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1224–1231, 1 mar. 1997.

KARAVAN, J. R.; PEPLING, M. E. Effects of estrogenic compounds on neonatal oocyte development. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 34, n. 1, p. 51–56, ago. 2012.

KHAN, L. Puberty: Onset and Progression. **PEDIATRIC ANNALS** •, v. 48, n. 4, 2019.

KOHN, M. C.; MELNICK, R. L. Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. **Journal of molecular endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 113–123, ago. 2002.

KUNDAKOVIC, M. et al. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 24, p. 9956 LP – 9961, 11 jun. 2013.

LANCIOTTI, L. et al. Up-To-Date Review About Minipuberty and Overview on Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Activation in Fetal and Neonatal Life. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 410, 2018.

LEE, H. J. et al. Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. **Toxicological Sciences**, v. 75, n. 1, p. 40–46, 12 jun. 2003.

LEE, J. E. et al. Early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals and pubertal development in girls. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 24, n. 2, p. 78–91, jun. 2019.

LEONARDI, A. et al. The Effect of Bisphenol A on Puberty: A Critical Review of the Medical Literature. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 9, set. 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 C T Method. **METHODS**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 39, n. 11, p. 806–812, nov. 2007.

MAFFINI, M. V et al. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 254–255, p. 179–186, jul. 2006.

MAGIAKOU, M. A. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 816, p. 42–56, 1997.

MARCEAU, K. et al. Individual differences in boys' and girls' timing and tempo of puberty: modeling development with nonlinear growth models. **Developmental psychology**, v. 47, n. 5, p. 1389–1409, set. 2011.

MILEVA, G. et al. Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 7, p. 7537–7561, jul. 2014.

MIRMIRA, P.; EVANS-MOLINA, C. Bisphenol A, obesity, and type 2 diabetes mellitus: genuine concern or unnecessary preoccupation? **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 164, n. 1, p. 13–21, jul. 2014.

MUELLER, J. K.; HEGER, S. Endocrine disrupting chemicals affect the gonadotropin releasing hormone neuronal network. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 44, p. 73–84, abr. 2014.

NADAL, A. et al. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 21, p. 11603–11608, out. 2000.

OJEDA, S. R.; LOMNICZI, A. Puberty in 2013: Unravelling the mystery of puberty. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 2, p. 67–69, fev. 2014.

OLIVEIRA, I. M. et al. Delayed onset of puberty in male offspring from bisphenol A-treated dams is followed by the modulation of gene expression in the hypothalamic-pituitary-testis axis in adulthood. **Reproduction, fertility, and development**, v. 29, n. 12, p. 2496–2505, nov. 2017.

PALIOURA, E.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and endocrine disrupting chemicals (EDCs). **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 16, n. 4, p. 365–371, dez. 2015.

PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. CHAPTER 8 - Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts. In: NEILL, J. D. (Ed.). . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. Third Edit ed. St Louis: Academic Press, 2006. p. 313–336.

PERETZ, J. et al. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. **Environmental health perspectives**, v. 122, n. 8, p. 775–786, ago. 2014.

PICUT, C. A.; REMICK, A. K. Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologist's Perspective. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 1, p. 195–205, 2017.

PREVOT, V. Chapter 30 - Puberty in Mice and Rats. In: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. (Eds.). . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)**. Fourth Edi ed. San Diego: Academic Press, 2015. p. 1395–1439.

PROVVISIERO, D. P. et al. **Influence of bisphenol a on type 2 diabetes mellitus** *International Journal of Environmental Research and Public Health* MDPI AG, , 1 out. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5086728/?report=abstract>. Acesso em: 8 set. 2020

RAVICHANDRAN, G. et al. Food advanced glycation end products as potential endocrine disruptors: An emerging threat to contemporary and future generation. **Environment international**, v. 123, p. 486–500, fev. 2019.

RICHTER, C. A. et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 24, n. 2, p. 199–224, 2007.

ROMANO, M. A. et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663–673, 26 abr. 2012.

ROMANO, R. M. et al. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 4, p. 309–317, abr. 2010.

RUBIN, B. S. et al. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. **Endocrinology**, v. 147, n. 8, p. 3681–3691, ago. 2006.

RUIZ-PINO, F. et al. Environmentally Relevant Perinatal Exposures to Bisphenol A Disrupt Postnatal Kiss1/NKB Neuronal Maturation and Puberty Onset in Female Mice. **Environmental health perspectives**, v. 127, n. 10, p. 107011, out. 2019.

SANTAMARÍA, C. et al. Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 158, p. 220–230, abr. 2016.

SANTOS-SILVA, A. P. et al. Short-Term and Long-Term Effects of Bisphenol A (BPA) Exposure During Breastfeeding on the Biochemical and Endocrine Profiles in Rats. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 50, n. 6, p. 491–503, jun. 2018.

SCHUG, T. T. et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 127, n. 3–5, p. 204–215, nov. 2011.

SETTAS, N. et al. Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 99, n. 4, p. E647-51, abr. 2014.

SHIN, Y.-L. An update on the genetic causes of central precocious puberty. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 21, n. 2, p. 66–69, jun. 2016.

STAHLHUT, R. W.; WELSHONS, W. V; SWAN, S. H. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 5, p. 784–9, maio 2009.

SUSIARJO, M. et al. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. **PLoS genetics**, v. 3, n. 1, p. e5, jan. 2007.

TAYLOR, J. A. et al. Similarity of Bisphenol A Pharmacokinetics in Rhesus Monkeys and

Mice: Relevance for Human Exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 4, p. 422–430, abr. 2011.

TENG, C. et al. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. **Chemico-biological interactions**, v. 203, n. 3, p. 556–564, maio 2013.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological Mechanisms of the Onset of Puberty in Primates\*. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 1, p. 111–151, 1 fev. 2001.

TUDURÍ, E. et al. **Timing of exposure and Bisphenol-A: Implications for diabetes development** *Frontiers in Endocrinology* Frontiers Media S.A., , 31 out. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6220716/?report=abstract>. Acesso em: 8 set. 2020

VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 24, n. 2, p. 139–177, 2007a.

VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 139–177, 2007b.

VANDENBERG, L. N. et al. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 1, p. 75–95, 1 fev. 2009.

VANDENBERG, L. N. et al. Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1051–4, ago. 2010.

VANDENBERG, L. N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine reviews**, v. 33, n. 3, p. 378–455, jun. 2012a.

VANDENBERG, L. N. et al. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 3, p. 378–455, 1 jun. 2012b.

VOLKEL, W. et al. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. **Chemical research in toxicology**, v. 15, n. 10, p. 1281–1287, out. 2002.

WEI, Y. et al. Maternal exposure to bisphenol A during pregnancy interferes ovaries development of F1 female mice. **Theriogenology**, v. 142, p. 138–148, jan. 2020.

WELSHONS, W. V.; NAGEL, S. C.; VOM SAAL, F. S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. **Endocrinology**, v. 147, n. 6 Suppl, p. S56-69, jun. 2006.

WETHERILL, Y. B. et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 24, n. 2, p. 178–198, 2007a.

WETHERILL, Y. B. et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 178–198, 2007b.

WISNIEWSKI, P. et al. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm

quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. **Toxicology**, v. 329, p. 1–9, mar. 2015.

YANG, O. et al. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. **Journal of cancer prevention**, v. 20, n. 1, p. 12–24, mar. 2015.

YE, X. et al. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 831, n. 1–2, p. 110–115, fev. 2006.

ZAID, S. S. M.; OTHMAN, S.; KASSIM, N. M. Protective role of *Ficus deltoidea* against BPA-induced impairments of the follicular development, estrous cycle, gonadotropin and sex steroid hormones level of prepubertal rats. **Journal of Ovarian Research**, v. 11, n. 1, 26 nov. 2018.

ZHANG, H.-Q. et al. Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 5, p. 5651–5657, maio 2012.

ZOELLER, R. T. et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097–4110, set. 2012.

## 10 ANEXOS

## ANEXO A – Aprovação do comitê de ética

Universidade Estadual do Centro-Oeste  
UNICENTRO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Protocolo: 002/2019      Data de entrada: 21/03/2019

Interessado: Dra. Renata Marino Romano

Ofício nº 004/2019 – CEUA/UNICENTRO      Guarapuava, 05 de Abril de 2019.

exposição química em teste de consequências no desenvolvimento ovariano

ovariano

Finalidade: Pesquisa

Data de Início: 01/07/2019

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: “Desregulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano após a exposição química ao bisfenol a: consequências na puberdade e no desenvolvimento ovariano”, protocolo número 002/2019, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, na reunião do dia 05 de Abril.

2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:


- Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
- Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
- **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Programa:      Pesquisador: Profª. Renata Marino Romano  
Atenciosamente,

(01/07/2019 a 30/06/2021) (pag 20-40)

VOTO DO RELATOR:

Conclusão: Tendo em vista o apresentado, o Projeto foi considerado **Aprovado**.



A Senhora  
Profª. Renata Marino Romano  
UNICENTRO-CEDETEG

Ingresso com recursos próprios por estudante do UNICENTRO