

# TRANSFERÊNCIA DO BISFENOL A (BPA) NA GESTAÇÃO<sup>1</sup>

## *BISPHENOL A (BPA) TRANSFERENCE IN GESTATION*

Michele Regina Worst<sup>2</sup>, Antonio Sergio Varela Junior<sup>3</sup>,  
Pablo Elias Martinez<sup>4</sup> e Carine Dahl Corcini<sup>5</sup>

### RESUMO

Estudos já demonstraram o efeito negativo na reprodução de machos após a exposição ao Bisfenol A (BPA) durante a gestação, lactação e até na fase adulta, porém os resultados são de pouco tempo após a exposição. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da exposição ao BPA durante a gestação na reprodução de animais em final de vida reprodutiva. As fêmeas de camundongos receberam via gavagem BPA (40, 80 e 200 µg/p/dia), água (controle) e o controle positivo Dietilestilbestrol (DES 6,5 µg//dia) durante o período gestacional (5°-21° dia). A avaliação da função reprodutiva de camundongos machos expostos durante a gestação foi realizada aos 8 meses de idade (animais em final de vida reprodutiva). O BPA aumentou a apoptose em células Leydig, mióides e espermáticas, além da quantidade de aromatase no testículo. Em conclusão, a exposição gestacional ao BPA afeta os filhotes durante todo o período de organogênese, causando a longo prazo alterações em órgãos reprodutivos, que podem comprometer a função reprodutiva até a andropausa, pois causa diminuição da testosterona e o aumento do estradiol.

**Palavras-chave:** Vida reprodutiva, Testículo, Aromatase, Contaminante ambiental.

### ABSTRACT

*Studies have already demonstrated the negative effect on the reproduction of males after exposure to Bisphenol A (BPA) during gestation, lactation and even adulthood, but the results are short-term after exposure. This study aims to evaluate the effect of exposure to BPA during gestation on reproduction of animals at the end of their reproductive life. Female mice received via gavage BPA (40, 80 and 200 µg/w/day), water (control) and the positive control Diethylstilbestrol (DES 6.5 µg/w/day) during the gestational period (5-21<sup>th</sup> day). The evaluation of the reproductive function of male mice exposed during gestation was performed at 8 months of age (animals at the end of reproductive life). BPA increased apoptosis in Leydig, myoid and sperm cells, in addition to the amount of aromatase in the testis. In conclusion, gestational exposure to BPA affects offspring throughout the period of organogenesis, causing long-term changes in reproductive organs, which can compromise reproductive function until andropause, as it causes a decrease in testosterone and increase in estradiol.*

**Keywords:** *Reproductive life, Testis, Aromatase, Environmental contaminant.*

<sup>1</sup> Tese de doutorado.

<sup>2</sup> ORCID: 0000-0001-6135-5487. E-mail: micheleworst@yahoo.com.br

<sup>3</sup> ORCID: 0000-0003-4901-5118. E-mail: varelajras@gmail.com

<sup>4</sup> ORCID: 0000-0002-3994-2551. E-mail: pabloeliasm@gmail.com

<sup>5</sup> ORCID: 0000-0001-5683-7801. E-mail: corcinicd@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A década de 1950 foi considerada como uma nova era na indústria química. Os avanços nas indústrias farmacêuticas criavam uma expectativa de as pessoas terem uma vida melhor através da química; e o desenvolvimento de substâncias químicas utilizadas no combate a pragas na agricultura, que aumentariam em grande quantidade a produção de alimentos (BONZI *et al.*, 2013). Mais tarde, o livro de Carson ganhou forças com o surgimento de má-formação fetal associado ao uso do medicamento antiabortivo, o Dietilestilbestrol (DES), por mulheres entre as décadas de 1950 a 1970, apresentando efeitos teratogênicos como câncer de vagina, deformações irreversíveis no útero e infertilidade nas filhas expostas ao DES (SOTO, SONNENSCHNEIN, 2002). Estes problemas só foram identificados anos mais tarde, quando as filhas de mães tratadas com DES chegaram à puberdade. Essas patologias não afetaram somente o sexo feminino, pois os meninos expostos durante a gravidez ao DES apresentaram criptorquidia (não descida dos testículos da cavidade abdominal para o saco escrotal) (COLBORN *et al.*, 2002).

De acordo com Fuller *et al.* (2022), hoje é impossível viver em um mundo sem contaminantes, é utopia achar que não estão disseminados por toda parte e vemos diariamente que a prevenção e os cuidados com meio ambiente são muitos escassos. O estilo de vida pode ser crucial na saúde dos seres vivos, como também a exposição crônica a substâncias químicas presentes no meio ambiente pode interferir nas funções biológicas naturais dos organismos, acarretando em inúmeros distúrbios (HARISON *et al.*, 1997).

Um dos contaminantes ambientais importantes é o Bisfenol A (BPA) [2,2-(4-4-dihidroxidifenil)], originado de duas moléculas de fenol ligadas a uma molécula de acetona, daí o nome Bisfenol A (STAPLES *et al.*, 1998). Na década de 1940 a 1950, o BPA começou a ser usado (por possuir uma estabilidade superior, flexibilidade e resistência). Hoje, cerca de 99,9% do BPA produzido é utilizado em vários produtos, como policarbonatos (garrafas pets, mamadeiras, lentes, copos, DVD, etc.) e resinas epóxi (revestimento interno de embalagens metálicas, complexos dentários para obturações e embalagens de remédios e ligantes em tintas de impressão) (FULLER *et al.*, 2022), entre outros. Os seres humanos se contaminam por ingestão, pois o BPA é liberado de embalagens plásticas para os alimentos quando aquecido ou quando os alimentos são guardados por muito tempo (FULLER *et al.*, 2022). Desde 2011, no Brasil é proibida a adição de BPA na composição dos plásticos de mamadeiras e os mesmos devem conter a indicação “Livre de BPA” (ANVISA, 2011).

Estudos têm relatado que a exposição de machos ao BPA oralmente em doses de 2, 20 ou 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em várias fases do desenvolvimento conduz a alterações de peso corporal, peso e histologia dos órgãos reprodutores masculinos, sendo que análises de espermatozoides do epidídimo mostraram que estes não foram afetados pela exposição ao BPA (NAGAO *et al.*, 2002). Porém, Kobayashi *et al.* (2009) não encontrou alterações reprodutivas em ratos tratados com baixas doses de BPA.

Em trabalho realizado com ratos adultos tratados com BPA via oral por dia, estes apresentaram: alterações nos pesos em diferentes tecidos reprodutivos (redução nos testículos e epidídimo; aumento na próstata, sem alteração nas vesículas seminais; redução na mobilidade e concentração dos espermatozoides de forma dose-dependente; redução da atividade de superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutathiona-redutase e glutathiona peroxidase; aumento nos níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (CHITRA *et al.*, 2003).

Chitra *et al.* (2003) sugerem que os efeitos do BPA, em doses graduais, diminuem o sistema de defesa antioxidante e induzem o estresse oxidativo nos espermatozoides de ratos, ou seja, o BPA induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no esperma dos epidídimos dos ratos, além de concentração e motilidade espermática.

Os trabalhos mencionados anteriormente e muitos outros estudos sobre BPA e o sistema reprodutor masculino sempre testam a exposição na gestação, na lactação ou até mesmo na vida adulta, vendo as consequências em pouco tempo após a exposição ou ao cessar a exposição, porém não encontramos trabalho no sentido de verificar se a exposição ocorreu na gestação, e se esse fator interfere até o final da fase reprodutiva do macho.

Desta forma, esse trabalho visa a demonstrar o efeito das exposições ao BPA na vida gestacional e o efeito no final da vida reprodutiva de machos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande (Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil - FURG) com o protocolo CEUA número P038/2011.

Camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) com 40 dias de idade foram obtidos no Biotério Central da FURG e utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos e aclimatados por 1 semana em gaiolas de policarbonato, com temperatura controlada (23°C±1) e fotoperíodo (ciclo de 12h claro/12h escuro, com luz às 6h e desligado às 18h). Foi dado aos animais água em garrafas de vidro e uma dieta de ração para camundongos sem soja e à vontade (Nuvilab CR-1 NUVITAL, Jundiaí, SP, Brasil) (RICHTER *et al.*, 2007). Após esse período, os camundongos fêmeas e machos foram acomodados em gaiolas (5 fêmeas:1 macho) para o acasalamento. A gravidez foi detectada pela observação da presença do tampão vaginal (pela manhã). Na presença de tampão vaginal, foi considerado dia gestacional 0 (DG 0).

As camundongas gestantes foram isoladas em gaiolas individuais e no DG 5 iniciou o tratamento, para evitar o potencial induzido pelo BPA, malformação durante os primeiros dias de gestação e problemas no período de implantação do blastocisto (NAKAMURA *et al.*, 2006). As camundongas gestantes foram distribuídas em cinco grupos: água (controle- veículo, n=5), BPA (40, 80 e 200 µg/p/dia,

n=7, 5 e 8, respectivamente) e Dietilestilbestrol - DES 6,5 µg/p/dia (controle positivo, n=5). DES e BPA foram dissolvidos em 0,01% de etanol absoluto e posteriormente em água. Todas as fêmeas foram pesadas diariamente e foi calculado o volume das doses (100 µl - 200 µl) que foi aplicado por gavagem, pois esta via de exposição é a mais próxima da exposição humana, e desta forma, o BPA pode ser metabolizado pelo fígado. No momento do presente estudo, a dose de ingestão diária humana aceitável pela EPA e FDA é de 50 µg/p/dia (VANDENBERG *et al.*, 2007). As gestantes receberam os tratamentos administrados até o parto (DG 21). Os recém-nascidos, pós-natal dia 1 (DPN 1) foram pesados no dia do nascimento e no dia do desmame (DPN 21), sexados e medida a Distância Anogenital (DAG). Após 8 meses (DPN 240), os camundongos machos foram eutanasiados e por laparotomia coletados os testículos.

Nos estudos histológicos, foram utilizados 5 testículos por grupo, fixados em paraformaldeído 4% durante 12 h, armazenados em álcool 70%, processados para desidratação em série graus etanol, diafanizados em xilol, incluídos em Paraplast Xtra (Sigma® - P3808) e seccionados no micrótomo (Leica® RM 2255) (CARSON, HLADIK, 2009). A histomorfometria e a análise histopatológica foram realizadas por meio de cortes testiculares em 6 µm e corados com Hematoxilina e Eosina. Após, os cortes testiculares foram fotografados em microscópio óptico (MO) com câmera digital (Olympus® - DP 72) em 400x.

Para histomorfometria, os túbulos seminíferos foram classificados como com (n=5) ou sem espermatozoides (n=5) para as amostras e a medida do menor diâmetro, espessura das estruturas epiteliais e dos túbulos seminíferos centrais foi realizada através do software Image J®. Para a histopatologia, utilizou-se o MO, avaliou-se e quantificou-se as modificações na estrutura dos testículos: quantidade de espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozoides e células de Leydig; estromal (inflamação ou fibrose); hipotrofia; atrofia; retardo na linhagem espermática; fibrose e vacúolo. As alterações encontradas foram pontuadas e expressas como: 0 - sem alterações; 1 - alterações leves (menos de 25% do campo analisado); 2 - alterações moderadas (em 25 a 50% do campo analisado) e 3 - alterações severas (mais de 50% do campo analisado). Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (SEM) (para histomorfometria) e a classificação das alterações foi colocada em forma de tabela.

Para os Ensaios de Imuno-histoquímica, foram utilizados 3 cortes de testículos com 2 µm (para Túnel) e 6 µm (para Aromatase) em lâminas histológicas previamente tratadas com solução de Poli-L-lisina (P8920 Sigma®). Além disso, o Paraplast foi removido com xilol, reidratado em concentração decrescente de álcool, hidratado em água destilada, lavado duas vezes ou 10 minutos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e três vezes em 0,05% Triton X-100 por 10 minutos cada. Ao final do processo, as lâminas foram fotografadas em microscópio eletrônico (EM) com câmera digital (Olympus® - DP 72).

O Teste de Marcação Apoptótica por Túnel foi realizado utilizando lâminas de testículo, a recuperação antigênica em tampão citrato a 100 °C por 20 minutos, após todos os procedimentos seguidos conforme descrito pelo fabricante do kit (Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Assay; N°s de catálogo C10245, C10246, C10247), lavado em PBS e montagem da lâmina com Fluoromount™ (F4680) Sigma-Aldrich®. Para análise, foram fotografados aproximadamente 10 campos ópticos, totalizando 20 túbulos seminíferos por amostra em cada tratamento e quantificadas as células testiculares apoptóticas (Leydig, Sertoli, células mióides- Peritubular Myoid e Espermáticas (independente do estágio de maturação)). Os dados foram expressos em número de células apoptóticas  $\pm$  SEM.

A marcação da enzima aromatase foi realizada com o antígeno recuperado em tampão citrato a 100 °C por 1 h, duas lavagens em PBS por 20 minutos, ligação inespecífica bloqueada do anticorpo primário por incubação por 2 h em temperatura ambiente com uma solução contendo 10% de soro normal de cabra e 4% de albumina sérica bovina (BSA). Em seguida, as amostras foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário anti-aromatase (coelho IgG) de camundongo (1:100) na presença de Triton X-100 0,05%. O controle positivo foi incubado apenas com 0,05% Triton X-100. Após três lavagens com 0,05% Triton X-100 por três vezes por 10 minutos cada, as amostras foram incubadas com um anticorpo secundário de burro anti-rato IgG conjugado com AlexaFluor 555 (1:200) por 2 h e depois o núcleo foi marcado com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) por 1 minuto, lavado em PBS, água destilada e a lâmina montada com Fluoromount™ (F4680) Sigma-Aldrich®.

Para esta análise, 20 campos ópticos foram fotografados para cada amostra por tratamento e quantificada a expressão da aromatase nas células. Os dados foram expressos em número de aromatase  $\pm$  SEM.

As análises estatísticas foram realizadas usando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey não pareado. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis análise de variância unidirecional por níveis) com comparações múltiplas de níveis médios para todos os grupos ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

A espermatogênese não foi alterada na exposição masculina durante o período gestacional por transferência materna quando exposta ao BPA e DES. A histopatologia testicular (dados não apresentados) não apresentou alterações em camundongos expostos durante a gestação (“*in utero*”), bem como nos parâmetros histomorfométricos (Tabela 1) dos túbulos seminíferos em nenhum dos grupos de tratamento.

**Tabela 1** -Efeitos do Bisfenol A (BPA) (40, 80 e 200 µg/p/dia), Dietilestilbestrol (DES) 6,5 µg/p/dia (controle positivo) e Água (controle) em camundongo adulto macho (*Mus musculus*) 8 meses-idade exposta por transferência materna durante o período gestacional (GD 5-GD 21) em Histomorfometria em túbulos seminíferos (sem espermatozoides ou com espermatozoides). n=4-5 animais por grupo e 20-25 túbulos por animais/grupo. \*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística P< 0,05.

COM CÉLULAS ESPERMÁTICAS				
Tratamento	n	Diâmetro Menor (A)	Espessura do epitélio (B)	Diferença (A)-(B)
Água	25	343,60 ± 8,21 <sup>a</sup>	90,56 ± 8,11 <sup>a</sup>	253,08 ± 11,81 <sup>a</sup>
BPA 40	25	343,48 ± 6,48 <sup>a</sup>	88,16 ± 6,96 <sup>a</sup>	255,32 ± 8,92 <sup>a</sup>
BPA 80	25	353,52 ± 5,36 <sup>a</sup>	92,28 ± 5,84 <sup>a</sup>	261,24 ± 7,93 <sup>a</sup>
BPA 200	20	336,85 ± 6,52 <sup>a</sup>	88,95 ± 5,05 <sup>a</sup>	247,9 ± 6,59 <sup>a</sup>
DES 6,5	25	346,96 ± 7,95 <sup>a</sup>	99,72 ± 7,23 <sup>a</sup>	247,24 ± 8,35 <sup>a</sup>
SEM CÉLULAS ESPERMÁTICAS				
Tratamento	n	Diâmetro Menor (A)	Espessura do epitélio (B)	Diferença (A)-(B)
Água	25	341,44 ± 8,29 <sup>ab</sup>	90,4 ± 9,1 <sup>a</sup>	251,04 ± 13,58 <sup>a</sup>
BPA 40	25	349,6 ± 7,04 <sup>ab</sup>	77,76 ± 2,23 <sup>a</sup>	271,84 ± 7,39 <sup>a</sup>
BPA 80	25	355,44 ± 8,24 <sup>b</sup>	83,12 ± 3,86 <sup>a</sup>	272,32 ± 6,82 <sup>a</sup>
BPA 200	20	324,0 ± 7,37 <sup>a</sup>	76,4 ± 4,0 <sup>a</sup>	247,6 ± 7,27 <sup>a</sup>
DES 6,5	25	348,32 ± 7,15 <sup>ab</sup>	84,12 ± 5,39 <sup>a</sup>	264,2 ± 7,94 <sup>a</sup>

Fonte: Construção do Autor

Quando analisada a apoptose no testículo, em diferentes tipos de células testiculares (Figura 1) os tratamentos com BPA e DES induziram um aumento no número de células de Leydig apoptóticas (Figura 1A). O número de células de Sertoli apoptóticas (Figura 1B) nos túbulos seminíferos foi maior do que o número de células de Leydig apoptóticas no tratamento DES. O BPA 200 diminuiu o número de células mióides apoptóticas (Figura 1C) nos túbulos seminíferos do testículo quando comparado com os outros grupos. Quando avaliado o número de células espermáticas apoptóticas (Figura 1D), BPA 40 e DES apresentaram aumento das células mortas quando comparados ao grupo Água.

Após a marcação da aromatase nos túbulos seminíferos dos testículos (Figura 2), foi detectado aumento da presença da enzima aromatase (Figura 2A) de acordo com o aumento da dose de BPA. Na Figura 2B, pode-se observar que o BPA 40 não se diferenciou do grupo controle, mas o BPA 80, BPA 200 e DES apresentaram aumento da presença de aromatase principalmente nos túbulos seminíferos. O DES apresentou a marcação de aromatase maior quando comparado ao BPA.

## DISCUSSÃO

A exposição de camundongos fêmeas durante o período gestacional (por 16 dias) transferiu o BPA para os filhotes, e após os 8 meses de idade os organismos tiveram tempo suficiente para tentar recuperar os danos causados pelo BPA. Observamos alterações importantes no tecido testicular (apoptose nas células testiculares) e houve um aumento notável na presença de aromatase nas gônadas.

Esses resultados mostram que o BPA aumenta a concentração da enzima aromatase, que aumenta a conversão de testosterona (T) em estradiol (E2), o que levaria a um aumento de E2 e diminuição dos níveis de T. Por outro lado, níveis mais elevados de apoptose nas células de Leydig podem levar a uma menor produção de T (KIM *et al.*, 2010). Assim, todos esses fatores juntos podem levar a uma queda na espermatogênese (RAMOS *et al.*, 2003). Além disso, podemos considerar que os efeitos estrogênicos do BPA não foram tão fortes porque não afetaram significativamente a DAG medida no DPN 21.

Em nosso estudo, a histopatologia testicular não mostrou alterações em camundongos expostos ao BPA *in utero* e também os túbulos seminíferos não apresentaram diferença estatística nos parâmetros histomorfométricos (Tabela 1) em todos os tratamentos. La Rocca *et al.* (2011) expuseram camundongos durante DG 10-16 ao BPA e DES; estes não apresentaram alterações nos testículos e na próstata. Ema *et al.* (2001) e Ramos *et al.* (2003) expuseram ratos durante a gestação (a primeira em duas gerações) e não foram observadas alterações histopatológicas observáveis. Este fato pode estar relacionado com a constante estimulação das defesas antioxidantes e a pequena geração de espécies reativas de oxigênio que não desencadeariam um dano tecidual visível (AGARWAL *et al.*, 2014). Estudo sobre infertilidade em homens mostrou que altos níveis de citocromo C no plasma seminal indicam dano mitocondrial significativo por ROS. Existem evidências consideráveis de que a interrupção das funções mitocondriais (ou seja, perda do potencial transmembranar, transição da permeabilidade e liberação do citocromo C levando ao comprometimento do transporte de elétrons) é um evento importante em muitas mortes celulares apoptóticas (YANG *et al.*, 1997).

A apoptose, descrita como a morte celular programada, é um fenômeno fisiológico caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas celulares que levam à morte de uma célula. Pode parecer estritamente regulado por fatores extrínsecos e intrínsecos e pode ser desencadeado por uma ampla variedade de estímulos. Exemplos de estímulos extrínsecos que são potencialmente importantes no apoptose de células testiculares são irradiação ou exposição a toxinas (ou seja, xenoestrogênios) (AGARWAL *et al.*, 2014). A integridade da mitocôndria é estabelecida pela presença do citocromo C no espaço interno da membrana. Altos níveis de ROS perturbam as membranas interna e externa. Isso resulta na liberação da proteína do citocromo C, que ativa as caspases (9 e 3) promovendo a apoptose (WANG *et al.*, 2003).

O outro aspecto é o fato do BPA estar induzindo alterações epigenéticas durante a exposição fetal, resultando na predisposição à carcinogênese em órgãos reprodutores masculinos (PRINS *et al.*, 2008). Observamos um grande número de apoptose nas células de Leydig (Figura 1A). Estas células têm como principal função a síntese de T, mas neste estudo foi demonstrado que o BPA induz a célula de Leydig, conseqüentemente pode estar diminuindo a concentração de T, muito importantes para o processo de espermatogênese (KIM *et al.*, 2010). Alguns pesquisadores associaram a exposição ao BPA à diminuição dos níveis de T no sexo masculino (RAMOS *et al.*, 2003). Iniciou-se a organogênese do trato reprodutivo masculino e a diferenciação celular nos testículos entre DG 16- 19 (em roedores).

Nossos dados indicam que BPA e DES aumentaram o número da enzima aromatase (Figura 2) (a aromatase converteu T em E2). A morte da célula de Leydig reduziu a produção de T associada à aromatização do testículo pelo BPA, gerando por consequência um aumento de E2. Muitos estudos relacionaram o efeito do DES com o potencial estrogênico induzindo alterações nos níveis das enzimas da esteroidogênese (StAR e aromatase), como também alteram a expressão de receptores (diminuem o AR e aumentam os ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) (RAMOS *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2010). O período de desenvolvimento fetal é considerado muito vulnerável, são muito sensíveis aos xenoestrogênios como no processo de organogênese e desenvolvimento do trato reprodutivo, pois as células testiculares são muito sensíveis à síntese de estrogênio ou à atividade da aromatase. Outros trabalhos relacionaram a exposição ao BPA às alterações no Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada (HPG), provocando variações na síntese dos hormônios reprodutivos (Hormônio Liberador de Gonadotropina - GnRH, Hormônio Luteinizante - LH, Hormônio Folículo Estimulante - FSH e T) (RAMOS *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2010). Em resumo, o BPA causa preocupação porque baixas doses de exposição em camundongas grávidas induzem alterações nos parâmetros reprodutivos da prole masculina até o final de sua vida reprodutiva.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O BPA transferido para o feto via placenta (por 16 dias) afetou o desenvolvimento embrionário inicial (fase de organização) das estruturas reprodutivas masculinas e do eixo hormonal. Essa exposição precoce ao BPA resultou na observação, após longo prazo, do comprometimento do sistema reprodutivo de camundongos machos. Problemas na capacidade reprodutiva dos machos podem afetar sua reprodução e colocar em risco sua perpetuação. Além disso, outro ponto que é crucial destacar é que este estudo abre uma nova frente, e o que ocorrerá com a população exposta no período de andropausa, como a reposição hormonal terá seu efeito uma vez que houve a redução das células que fariam essas respostas. Muitas perguntas ainda terão que ser respondidas.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. *et al.* Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World. J. Mens. Health.* v. 32, n. 1, p. 1-17, 2014.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução N°41/2011 -Dispõe sobre a proibição de uso de Bisfenol A em mamadeiras destinadas à alimentação de lactantes e dá outras providências. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0041\\_16\\_09\\_2011.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0041_16_09_2011.html). Acesso em: fev. 2023.

BONZI, Ramón Stock. **Meio século de Primavera silenciosa**: um livro que mudou o mundo. Editora UFPR. p. 207-215. 2013.

CARSON, F.L.; HLADIK, C. Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3Rd Edition. **Chicago: American Society for Clinical Pathology Press**. 409p. 2009.

CHITRA, K.C. *et al.* Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. **Toxicol**, n. 185, p. 119-27, 2003.

COLBORN, T. *et al.* **O futuro roubado**. Tradução: Cláudia Buchweitz. Porto Alegre, Brasil: L&PM, 2002.

EMA, M. *et al.* Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. **Reprod. Toxicol**, v. 15, p. 505-523, 2001.

FULLER R. *et al.* Pollution and health: a progress update. **The Lancet** v. 6, p. e535, 2022.

HARISON, P.T.C. *et al.* Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? **The Science of the Total Environment** v. 205, p. 97-106, 1997.

KIM, J.Y. *et al.* Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2up-regulation in rat testicular Leydig cells. **Toxicol. Lett.** v.193, p. 200-208, 2010.

KOBAYASHI, K. *et al.* Effects of gestational and lactational exposure to bisphenol A on development and reproduction in F1 rat offspring. **Toxicol Lett**, v.189S, p. S257-S273, 2009.

LA ROCCA, J. *et al.* Effects of In Utero Exposure to Bisphenol A or Diethylstilbestrol on the Adult Male Reproductive System. **Birth Defects Res. (Part B)**. v. 92, n. 526-533, 2011.

NAKAMURA, K. *et al.* Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol. A. **J. Neurosci. Res**, v. 84, p. 1197-1205, 2006.

NAGAO, T. *et al.* Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 2, p. 123-130, 2002.

PRINS, G.S. *et al.* Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.** v. 102, p. 134-8, 2008.

RAMOS, J.G. *et al.* Bisphenol A Induces Both Transient and Permanent Histofunctional Alterations of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Prenatally Exposed Male Rats. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3206-3215, 2003.

RICHTER, C.A. *et al.* *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reprod. Toxicol.**, v. 24, p. 199-224, 2007.

STAPLES, C.A. *et al.* A Review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. Disruptores endocrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades. **Gac Sanit [online]**, v. 16, n.3, p. 209-211, 2022.

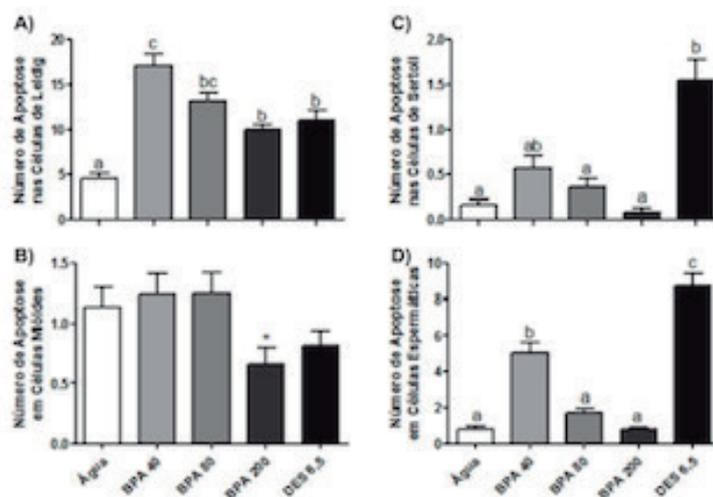
VANDENBERG, L.N. *et al.* Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reprod. Toxicol**, v. 24, p. 139-177, 2007.

WANG, X. *et al.* Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil. Steril.** v. 80, p. 531-535, 2003.

YANG, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**. v. 275, p. 1129-1132, 1997.

**Figura 1** - Efeitos do Bisfenol A (BPA) (40, 80 e 200 µg/p/dia), Dietilestilbestrol (DES) 6,5 µg/p/dia (controle positivo) e Água (controle) no número de células apoptóticas pelo teste de Túnel em testículo de camundongo adulto macho (*Mus musculus*) de 8 meses exposto por transferência materna durante o período gestacional (GD 5-GD 21).

A) Apoptose em células de Leydig; B) Apoptose em células mióides; C) Apoptose em células de Sertoli e D) Apoptose em células espermáticas. n=3 animais por grupo. Valores seguidos de letras diferentes mostraram-se significativos pelo teste post-hoc de Tukey e \* representam diferença por contrastes lineares ortogonais (P < 0,05).



**Figura 2** - Efeitos de Bisfenol A (BPA) (40, 80 e 200 µg/p/dia), Dietilestilbestrol (DES) 6,5 µg/p/dia (controle positivo) e Água (controle) na marcação de aromatase em testículo de adulto masculino camundongo (*Mus musculus*) de 8 meses exposto por transferência materna durante o período gestacional (GD5-GD21). A) Marcação de aromatase. Na coluna, respectivamente: DAPI-rotulagem (azul), um marcador nuclear, AlexaFluor 555 (vermelho), marcador de aromatase e mescla de ambas as imagens para cada marcador e grupo; em linha, os grupos Água, BPA 40, BPA 80, BPA 200 e DES 6,5, as setas brancas indicam a aromatase e B) Número de Aromatase nos túbulos seminíferos nos testículos. Valores seguidos por letras diferentes mostraram-se significativos por Kruskal-Wallis não-paramétrico. n=3 animais por grupo e 20 campos ópticos cada.

