

PATRICIA WISNIEWSKI

FUNÇÃO ESPERMÁTICA E REPRODUTIVA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO
BISFENOL A NO PERÍODO PRÉ-ADULTO

Guarapuava

2013

PATRICIA WISNIEWSKI

FUNÇÃO ESPERMÁTICA E REPRODUTIVA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO
BISFENOL A NO PERÍODO PRÉ-ADULTO

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano

Guarapuava

2013

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

W815f Wisniewski, Patricia
Função espermática e reprodutiva em ratos Wistar expostos ao Bisfenol A no período pré-adulto / Patricia Wisniewski. -- Guarapuava, 2013
xii, 78 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 em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2013

Orientador: Marco Aurélio Romano
Banca examinadora: Najeh Maissar Khalil, Guilherme de Medeiros Bastos

Bibliografia

1. Farmácia. 2. Bisfenol A. 3. Desregulação endócrina. 4. Espermatogênese. 5. Testes funcionais. 6. Comportamento sexual. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615.7

TERMO DE APROVAÇÃO

PATRICIA WISNIEWSKI

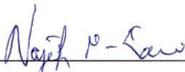
FUNÇÃO ESPERMÁTICA E REPRODUTIVA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO AGENTE BISFENOL A NO PERÍODO PRÉ-ADULTO

Dissertação aprovada em 22/11/2013 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:



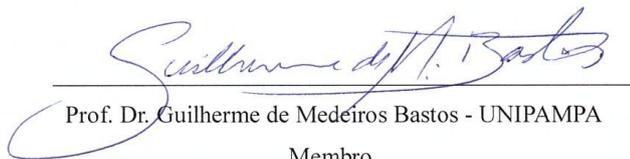
Prof. Dr. Marco Aurélio Romano - Orientador - UNICENTRO

Presidente



Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil - UNICENTRO

Membro



Prof. Dr. Guilherme de Medeiros Bastos - UNIPAMPA

Membro

GUARAPUAVA-PR

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, que abre e fecha portas nos guiando pela vida.

À Minha família que desde sempre me proporcionou oportunidades únicas e que me trouxeram a esse caminho.

Ao meu noivo, Ernesto Francisco Reis Filho, que esteve ao meu lado nos momentos mais críticos da pesquisa e escrita.

Ao professor, orientador e amigo Marco Aurélio Romano, pela paciência e dedicação, a mim e ao meu trabalho; à sua esposa, Renata Marino Romano, pelas inúmeras dicas e ajudas.

À colega de trabalho e amiga, Franciele Tatiana Mathias, em quem me apoiei e me espelhei, e com quem muito aprendi.

Aos colegas de pós-graduação com quem dividi as dúvidas desse período e passei muitos momentos.

Às amigadas que suportaram a minha ausência.

Às alunas do laboratório de Toxicologia Reprodutiva da UNICENTRO pela ajuda no trabalho técnico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

A todos, que direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar aqui.

RESUMO

O bisfenol A (BPA) é um monômero do plástico policarbonato amplamente utilizado na indústria para fabricação de embalagens, resinas epóxi e outros materiais. Vários são os efeitos já evidenciados como causados pelo BPA, entre eles toxicidade testicular e alterações reprodutivas em modelos animais, e relatos da exposição humana ao químico. A polimerização incompleta dos produtos à base de BPA durante a fabricação, e a despolimerização induzida por alteração de temperatura causam a liberação do composto e de seus derivados para o meio, podendo ser detectados em alimentos enlatados, líquidos engarrafados, no ar que respiramos e como contaminante de rios. Neste trabalho, propôs-se testar a hipótese de que o BPA desregula o sistema endócrino e reprodutivo. Avaliou-se as possíveis alterações em 30 ratos wistar, em idade pré-adulta, expostos por 40 dias a 0mg/kg, 5mg/kg e 25mg/kg de BPA. Observou-se a evolução do peso corporal, peso do testículo e epidídimo (dividido nas porções cabeça, corpo e cauda); avaliou-se a concentração média de espermatozoides na amostra coletada; análise de patologias espermáticas; análise funcional, avaliada pela coloração com DAB, observando a atividade mitocondrial indiretamente, integridade de membrana plasmática pela coloração com Eosina/Nigrosina, e integridade acrossomal, pela coloração de Pope; pela avaliação do dano ao material genético do espermatozoide; avaliação da produção espermática, reservas espermáticas e tempo de trânsito espermático; avaliação do comportamento sexual e orientação sexual; e, pelo perfil hormonal avaliado em LH, FSH, testosterona e estradiol. Os resultados observados no estudo foram avaliados por análise de variância e os testes de comparação entre médias, e, teste de Kruskal-Wallis com as comparações pelos testes de Friedman e Mann-Whitney. Os valores paramétricos foram expressos em média e erro-padrão da média e, para dados não paramétricos, em mediana e intervalos interquartílicos. Considerou-se diferença estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05. Demonstrou-se que o produto dificulta a evolução do peso corporal; altera o peso relativo de cabeça e cauda de epidídimo; diminui concentração de espermatozoides; não altera morfologia espermática; diminui atividade mitocondrial na peça intermediária do espermatozoide; diminui integridade de membrana plasmática do

espermatozoide e diminui integridade de acrossoma; não causa alteração no DNA espermático; altera a orientação sexual, por diminuir a preferência por cobaias fêmeas receptivas; altera o comportamento sexual, diminuindo a latência para primeira monta e intromissão, e o número de ejaculações em um período determinado; diminui a produção diária de espermatozoides e a eficiência da espermatogênese; diminui a reserva espermática; retarda o trânsito epididimário dos espermatozoides; diminui os hormônios LH, FSH e testosterona; e, aumenta o hormônio estradiol no soro. Conclui-se que o produto causou desmasculinização dos animais tratados.

Palavras-chave: 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano. Funcionalidade espermática. Reprodução.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a monomer of polycarbonate plastic widely used in industry for the manufacture of packaging, epoxy resins and other materials. There are many effects previously seen as caused by BPA, among them testicular toxicity, reproductive changes in animal models and reports of human exposure to the chemical. The incomplete polymerization of BPA based products during manufacture and depolymerization induced by temperature's change cause release of the compound and its derivatives into the environment and can be detected in canned foods, bottled liquids, in the air we breathe, and contaminant of rivers. In this research, we propose to test the hypothesis that BPA disrupts endocrine and reproductive systems. We evaluate the possible changes in 30 male wistar rats, in pre-adult phase, exposed for 40 days to 0mg/kg, 5mg/kg and 25mg/kg of BPA, and observe the evolution of body weight; testis and epididymis (divided into portions head, body and tail) weight; the mean concentration of sperm in the sample collected and sperm pathologies; the functionality of spermatozoon by observing mitochondrial activity, plasma membrane and acrosomal integrity; damage to the genetic material of the sperm; evaluation of sperm production, sperm reserves and sperm transit; we evaluated the sexual behavior and sexual orientation; and the hormonal profile in LH, FSH, testosterone and estradiol. The results observed were judged by statistical methods such as analysis of variance and comparison of means; Kruskal-Wallis test with comparisons by Freedman and Mann-Whitney tests. The parametric values were expressed as mean and standard error of the mean, and nonparametric data, as median and interquartile ranges. Statistical difference was considered when the p value was less than 0,05. We demonstrate that the product block the evolution of body weight; it alters the relative weight of the head and tail of the epididymis; it decreases the sperm concentration; it doesn't alter morphology; it decreases mitochondrial activity in the sperm midpiece; it declines plasma membrane integrity of the sperm and decreases acrosome integrity; it does not cause changes in sperm DNA; it alters sexual orientation, by decreasing the preference for receptive females; it alters sexual behavior by decreasing latency to the first mount and intromission, and the number of ejaculations in a period; it declines daily sperm production and

efficiency of spermatogenesis; it decreases sperm reserves; it slows the transit of epididymal spermatozoa; it declines hormones LH, FSH and testosterone in serum, and increases the hormone estradiol. We concluded that the product caused demasculinization of treated animals.

Key-words: 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane. Sperm functionality. Reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do Bisfenol A e do Dietilestilbestrol.....	12
Figura 2 – Esquema do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.....	16
Figura 3 – Desenho Experimental.....	20
Figura 4 – Desenho esquemático da arena utilizada na avaliação da orientação sexual.....	26
Figura 5 – Lâminas de coloração DAB. Em A, espermatozoide classificado como classe I; em B, classe II; em C, classe III; e em D, classe IV, indicados pelas setas.....	36
Figura 6 - Lâminas de coloração Eosina/Nigrosina. Em A: espermatozoides com membrana íntegra; em B, espermatozoide com membrana não íntegra.....	36
Figura 7 – Lâminas de coloração de Pope. Em A, espermatozoide com acrossoma íntegro; em B, espermatozoide com acrossoma não íntegro.....	37
Figura 8 – Fotomicrografia de espermatozoides classe I corados com brometo de etídio pela técnica de avaliação da integridade de DNA do núcleo do espermatozoide.....	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Evolução do peso corporal nos animais experimentais, grupo controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). Análise multivariada de variâncias (MANOVA) pelo procedimento de modelo linear generalizado (GLM) e pós teste de Tukey.....	31
Gráfico 2 – Dosagem hormonal de LH no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.....	41
Gráfico 3 – Dosagem hormonal de FSH no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.....	41
Gráfico 4 – Dosagem hormonal de Testosterona no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.....	42
Gráfico 5 – Dosagem hormonal de Estradiol no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Peso corporal, peso testicular, e das porções do epidídimo para os animais do grupo controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). X ± EPM, ANOVA/HSD Tukey.....	32
Tabela 2– Peso corporal, peso testicular e das porções do epidídimo relativo a 100g de peso corporal para os animais do grupo controle (n=10), grupo tratado 1 (n=8) e grupo tratado 2 (n=7). X ± EPM, ANOVA/HSD Tukey.....	32
Tabela 3 – Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides dos grupos controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). M (II); Kruskall-Wallis.....	34
Tabela 4 – Avaliação da integridade da membrana plasmática espermática para os grupos controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). M (II); Kruskall-Wallis.....	34
Tabela 5 – Avaliação da integridade de acrossoma dos espermatozoides dos grupos controle (n=10), tratado 1(n=8) e tratado 2 (n=7). M (II); Kruskall-Wallis.....	35
Tabela 6- Produção espermática diária por testículo (10^6 /testículo) e por grama de testículo (10^6 /g de testículo), reserva espermática nas porções do epidídimo (espermatozoide $\times 10^6$) e tempo de trânsito espermático (dias) em ratos wistar do grupo controle (n=10) e dos grupo tratado 1(n=8) e 2 (n=7), submetidos a intoxicação pré-adulta pelo Bisfenol A. X ± EPM; ANOVA/HSD Tukey.....	38
Tabela 7 – Tempo de permanência (segundos) dos grupos estudados controle (n=10), tratado 1 (n=8), tratado 2 (n=7) na área do macho e na área da fêmea e escore de preferência sexual; X ± EPM; ANOVA/HSD Tukey.....	39
Tabela 8 – Avaliação do comportamento sexual dos animais do grupo controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). X ± EPM; ANOVA/HSD Tukey.....	40
Tabela 9 – Dosagens hormonais no soro dos animais dos grupos estudados: controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7); X ± EPM; ANOVA/HSD Tukey....	43

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	METODOLOGIA	19
3.1	Delineamento experimental	19
3.2	Peso.....	21
3.2.1	Pesagem dos Animais.....	21
3.2.2	Peso dos Órgãos.....	21
3.3	Patologias.....	21
3.4	Avaliação funcional dos espermatozoides	21
3.4.1	Avaliação da atividade mitocondrial.....	22
3.4.2	Determinação de integridade da membrana plasmática.....	22
3.4.3	Determinação de integridade de acrossoma	23
3.4.4	Detecção da fragmentação do núcleo do espermatozoide	23
3.6	Contagem de espermatozoides, produção de espermatozoides diária e tempo de trânsito espermático	24
3.7	Avaliação da orientação sexual	25
3.8	Análise do comportamento sexual.....	27
3.9	Dosagens hormonais	28
3.10	Análise Estatística.....	29
4	RESULTADOS.....	30

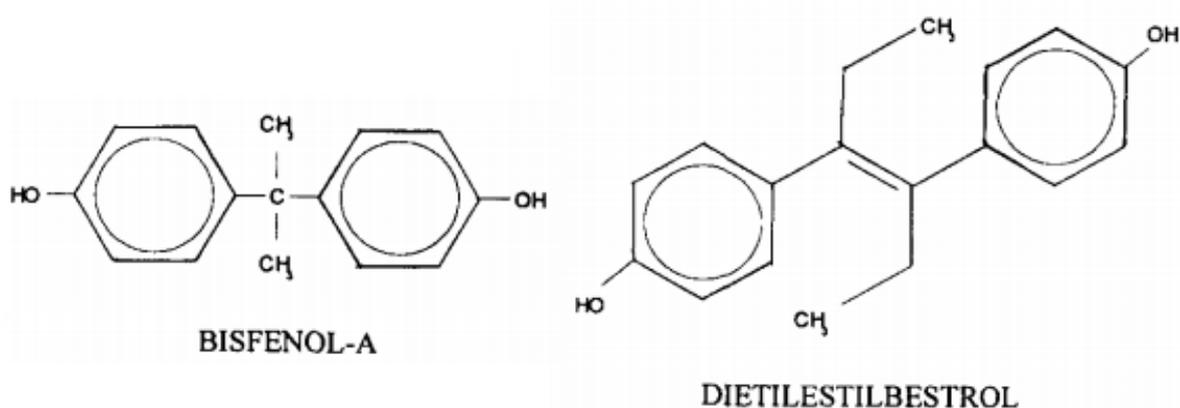
4.1	Pesos.....	30
4.2	Concentração e patologias	33
4.3	Avaliação funcional dos espermatozoides	33
4.3.1	Avaliação da atividade mitocondrial.....	33
4.3.2	Avaliação da integridade de membrana plasmática.....	34
4.3.3	Avaliação da integridade acrossomal	35
4.3.4	Avaliação da integridade do DNA	36
4.5	Produção espermiática, reserva espermiática e trânsito espermiático.....	38
4.6	Orientação sexual	39
4.7	Comportamento sexual.....	40
4.8	Dosagens hormonais	40
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	55
8	ANEXOS.....	75

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O bisfenol A (BPA), um monômero do plástico policarbonato de nome químico 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, é um composto preparado pela combinação de dois equivalentes fenóis e um equivalente acetona. Foi primeiramente sintetizado por A.P. Dianin em 1891 e investigado como possível estrogênico sintético na década de 1930. Hoje, por causa da sua estabilidade superior, flexibilidade e resistência é amplamente utilizado na indústria para fabricação de plásticos policarbonatos (60% do uso total), resinas epóxi (30%) e outros materiais; produzindo garrafas plásticas, CD's, painéis de carro, óculos, eletroeletrônicos, revestimentos internos de latas de alimentos, resinas dentárias e na produção de embalagens em geral. Estima-se que em 2006 tenham sido produzidas mais de 3,8 milhões de toneladas de BPA (BROTTONS et al. 1995; DODDS; LAWSON, 1936; PLASTICS EUROPE, 2013; RICHTER et al., 2007).

Esse composto tem muita similaridade estrutural com o agente estrogênico dietilestilbestrol (Figura 1), um fármaco administrado a mulheres grávidas no período de 1948 a 1971 e que causou efeitos reprodutivos marcantes na prole feminina exposta, e que também é muito associado ao desenvolvimento de câncer de colo uterino (COLBORN; CLEMENT, 1992; HERBST, 1987; MITTENDORF, 1995).

Figura 1 – Estrutura química do Bisfenol A e do Dietilestilbestrol.



Fonte: Goloubkova; Spritzer, 2000.

Vários são os efeitos já evidenciados como causados pelo BPA. Dentre eles a toxicidade testicular, alterações reprodutivas em modelos animais (CABATON et al., 2011; MORRISSEY; GEORGE; PRICE, 1987; NAGAO, et al., 1999; TACHIBANA et al., 2007; TAKAHASHI; OISHI, 2001; TOHEI et al., 2001; VOM SAAL et al., 1998) e relatos da exposição humana ao químico com variados efeitos (BRAUN et al., 2009; CHOU et al., 2011; HE; PAULE; FERGUSON, 2012; INOUE et al., 2000; LI et al., 2010). A polimerização incompleta dos produtos a base de BPA durante a fabricação, e a despolimerização induzida por alteração de temperatura causam a liberação do composto e de seus derivados para o meio, podendo ser detectados em alimentos enlatados, líquidos engarrafados, no ar que respiramos e como contaminante de rios (BROTONS et al., 1995; COOPER; KENDIG; BELCHER, 2011; LE et al., 2008; PELTONEN; PUKKILA, 1988; WANG et al., 2012).

O campo da desregulação endócrina, e particularmente as pesquisas com BPA, sofreram muita influência popular ao longo dos anos, principalmente pela questão social da presença desse agente no cotidiano. Em 2006, uma reunião organizada pelo *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS, Instituto Nacional de Ciências de Saúde Ambiental) convidou 45 pesquisadores da área para discutir o assunto. Fruto desse encontro foi o *Chapel Hill Consensus Statement*, assinado por 38 autores que afirmaram, dentre outras, que a exposição humana a esse agente está dentro da faixa deduzida como biologicamente ativa, e que a ampla gama de efeitos adversos já constatados em animais de laboratório é uma grande preocupação no que diz respeito a efeitos semelhantes em seres humanos, afirmando ainda que os efeitos são irreversíveis e podem aparecer em momentos onde não mais se detecta o agente (VOM SAAL et al., 2007).

Existe uma crescente preocupação sobre contaminantes ambientais alterando o sistema reprodutivo masculino, com importante papel na diminuição da qualidade e quantidade de sêmen humano, e com implicações sobre o sucesso reprodutivo das espécies (COLBORN; VOM SAAL; SOTO, 1993). Para predizer a qualidade e fertilidade de uma amostra de sêmen são realizados testes laboratoriais microscópicos, onde são avaliados parâmetros seminais como motilidade, vitalidade, morfologia, concentração e contaminantes; e macroscópicos, como avaliação do volume, coloração e aspecto, porém, nenhum destes testes individualmente é capaz

de prever esse potencial com segurança, e ainda em conjunto podem não explicar alguns casos de infertilidade (MOCÉ; GRAHAM, 2008; WHO, 1999).

Nos últimos anos observou-se um grande avanço no conhecimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos que culminam na produção de espermatozoides funcionalmente competentes, dessa forma, foi possível o desenvolvimento de novas ferramentas de avaliação que contribuem para analisar as características biológicas que uma célula tão especializada pode expressar. Os testes utilizados para prever o potencial de funcionalidade espermática se baseiam nas etapas que o espermatozoide passa até a fecundação, que envolvem eventos como reconhecimento espermático, passagem pelo oviduto, penetração mucocervical, hiperativação, ligação com a zona pelúcida e fusão com ovócito, e para isso, se faz importante a estrutura e funcionalidade intactas (AITKEN, 2006; BENCHAIIB et al., 2003; HERRICK, 2003). Espermatozoides adquirem a habilidade de fertilizar óvulos no início do trânsito espermático, mas apenas ao final da passagem pelo epidídimo é que eles conseguem ser viáveis para fusão e produzir zigoto (ROBAIRE; HINT; ORGEBIN-CRIST, 2006).

A fertilidade masculina depende da produção diária de milhões de espermatozoides, mas sabe-se hoje que contaminantes ambientais afetam o sistema reprodutivo por vários mecanismos e vias, e de um ponto de vista toxicológico, afetam também a espermatogênese, que é um processo contínuo de divisão celular, diferenciação e maturação, levando a uma baixa qualidade do sêmen, a alterações morfológicas nos espermatozoides e baixa concentração, podendo culminar em infertilidade ou fertilidade diminuída. Um estudo realizado em três cidades americanas diferentes comparou as concentrações espermáticas de amostras de homens e encontrou valores com 80% de diferença entre duas delas, sugerindo que há um fator ambiental interferindo nos parâmetros de fertilidade (BONDE, 2010; FISCH et al., 1996; O'DONNELL, 2006; WONG; CHEGN, 2011).

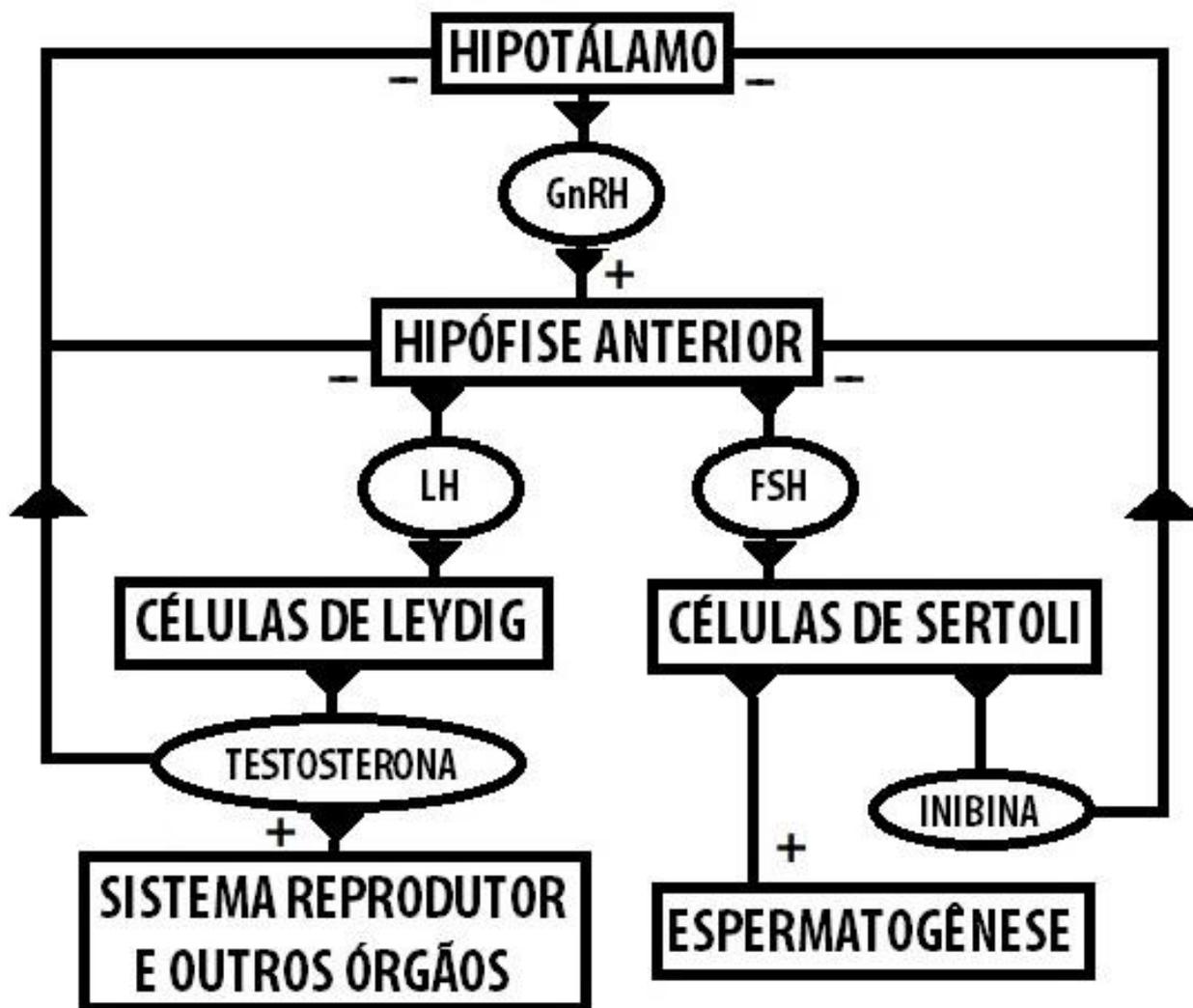
O espermatozoide é uma célula alongada, formada por três regiões e com uma função única, liberar o material genético para o oócito feminino e produzir o zigoto. Na cabeça do espermatozoide está contido o DNA e o acrossoma; logo após encontramos a peça intermediária, contendo as mitocôndrias, relacionadas com a

produção de energia e motilidade espermática; e por fim, a cauda, também responsável pelo movimento espermático (EDDY; O'BRIEN, 1994; GARNER; HAFEZ, 2004; GRAHAM, 2001).

A membrana plasmática determina a composição do citoplasma celular, ela é organizada em uma bicamada lipídica associada a proteínas e circunda todas as células, sejam procariontes ou eucariontes, tendo papel fundamental nos fenômenos celulares. A membrana espermática segue esse modelo clássico de membrana plasmática (COOPER, 1996; WATSON, 1995). Nos espermatozoides a membrana modifica-se ao longo da espermatogênese, trânsito e armazenamento no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino, capacitação e na penetração no oócito, se adaptando a cada ambiente e situação (LENZI et al., 1996). Para tanto, a estrutura necessita estar íntegra física e funcionalmente, garantindo à célula viabilidade e capacidade fertilizante. Da mesma forma, as mitocôndrias precisam estar funcionantes para suprir a demanda de ATP para os batimentos flagelares, hiperativação e penetração, e é indispensável também a manutenção das enzimas acrossomais para que ocorra a fertilização (CHEMES; RAWE, 2003; KUMI-DIAKA, 1993; O'CONNEL; McCLURE; LEWIS, 2002).

A função do sistema reprodutor masculino é regulada por hormônios da alça endócrina conhecida como eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Figura 2). O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que estimula a hipófise a liberar os hormônios LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante). O LH estimula a secreção de testosterona pelas células de leydig, ela é responsável por estimular a virilização do sistema urogenital masculino na vida fetal e dar suporte para a espermatogênese e fertilidade na vida adulta. Células de leydig expressam receptores de estrógenos, e são alvos de compostos estrogênicos. O FSH estimula a espermatogênese, agindo nas células de sertoli, nos testículos. A concentração de testosterona plasmática controla a secreção de LH e FSH por um mecanismo de feedback negativo, assim como controla a secreção de GnRH pelo hipotálamo. A inibina, secretada pelas células de sertoli, também regula a secreção de FSH e GnRH (AKINGBEMI et al., 2004; CARVALHO, et al. 2002; O'DONNELL, et al. 2006).

Figura 2 – Esquema do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.



A enzima aromatase catalisa a conversão da testosterona em estradiol, e no homem é mais expressada no trato reprodutivo do que em outros tecidos. Nos roedores, ela é principalmente encontrada em células germinativas maduras e nos espermatozoides (AKINGBEMI et al., 2004). Os testículos são uma importante fonte de estrogênio, sintetizados pelo complexo enzimático aromatase a partir da testosterona, e a expressão da enzima testicular varia com a idade em muitas espécies de mamíferos (STOCCO; McPHAUL, 2006).

O ato do acasalamento requer participação ativa de dois indivíduos, e a comunicação química entre eles envolve tanto produção como recepção de sinais (VANDENBERGH, 2006). O macho inicia a aproximação pela face da fêmea, e após, verifica a região anogenital, expondo-se aos quimiossensores exalados por ela. Os ratos, de ambos os sexos, emitem também sons vocálicos ultrassônicos como comunicação (HULL; WOOD; McKENNA, 2006).

O efeito da testosterona no comportamento reprodutivo é mediado por receptores androgênicos localizados em alta concentração no hipotálamo (HARDING; McGINNIS, 2003). Ela media efeitos motivacionais do comportamento sexual, como ereção peniana e libido, efeitos andrógeno-dependentes (BHASIN; BENSON, 2006). Ratos são capazes de distinguir entre odores provindos de outros machos e de fêmeas, e demonstrar preferência por fêmeas receptivas para acasalamento (VANDENBERGH, 2006).

Tomando como base estudos que mostram a toxicidade e o potencial de desregulação endócrina do BPA, e aspectos sociais, como a constante exposição ao agente no cotidiano da população. E ainda, levando em conta aspectos econômicos como os gastos com saúde, em tratamentos relacionados à fertilidade, humana e animal, e aspectos ambientais, no que se refere à presença de resíduos do agente em elementos da cadeia alimentar e seu conseqüente acúmulo, realizou-se esse trabalho de avaliação do comportamento animal, funcionalidade espermática e perfil hormonal para elucidar as alterações causadas pelo BPA. Com ele, espera-se contribuir cientificamente quanto aos efeitos tóxicos desse composto.

2 OBJETIVOS

Dada a hipótese central de ação desreguladora do sistema endócrino pelo agente BPA, tem-se os seguintes objetivos no presente trabalho:

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a possível ação desreguladora da endocrinologia reprodutiva em ratos wistar, causada pelo agente químico BPA, pela avaliação funcional espermática, avaliação comportamental e perfil hormonal desses animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os possíveis danos espermáticos quanto a:

- a) Morfologia;
- b) Atividade mitocondrial na peça intermediária;
- c) Integridade de membrana plasmática;
- d) Integridade de acrossoma;
- e) Fragmentação do material genético;
- f) Produção espermática;
- g) Trânsito espermático;

Avaliar o comportamento reprodutivo e orientação sexual dos animais expostos a diferentes doses orais de BPA;

Investigar possíveis alterações nos níveis séricos de LH, FSH, testosterona e estradiol.

3 METODOLOGIA

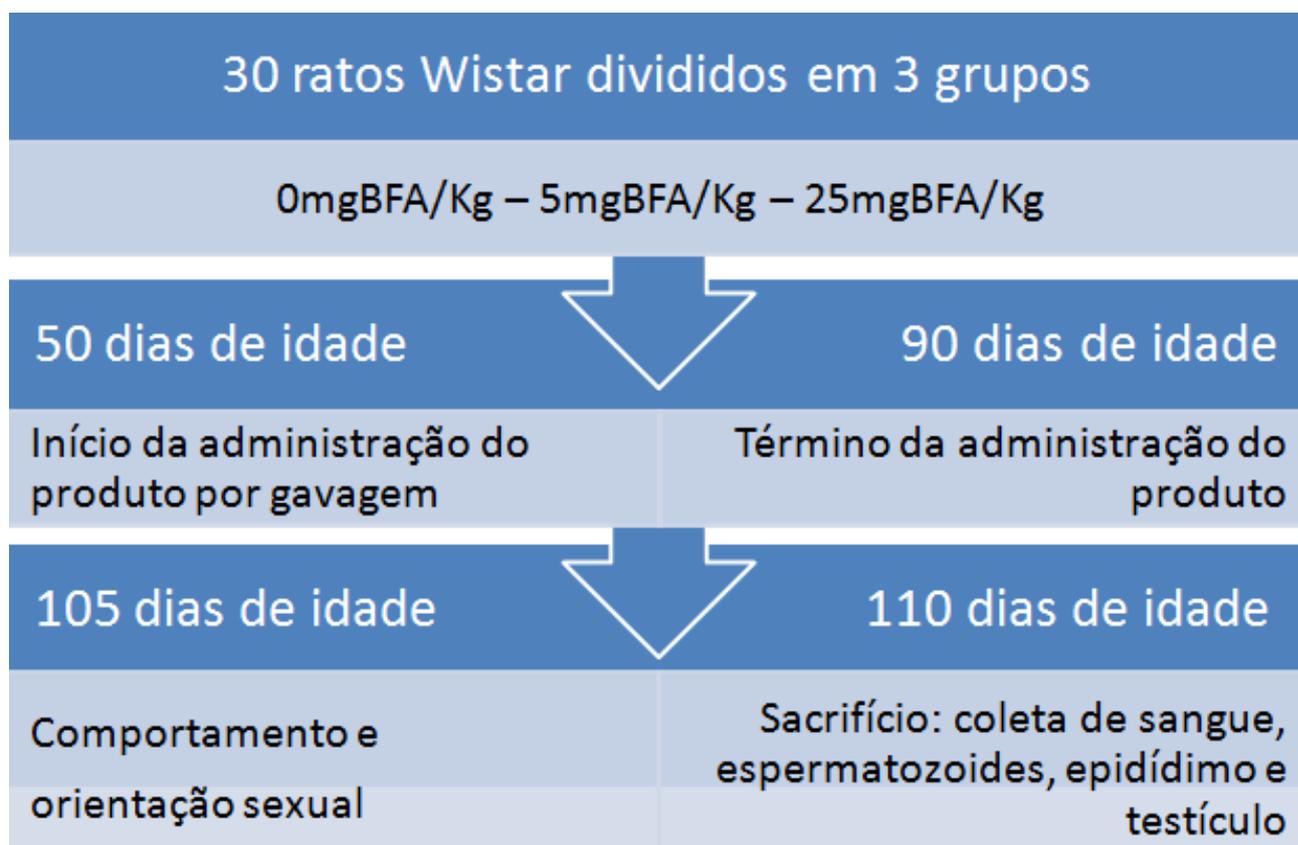
O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICENTRO, sob o parecer nº 017/2012.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados trinta ratos wistar (*Rattus norvegicus*) em idade pré-adulta, divididos em três grupos de dez. Os animais foram obtidos com 42 dias do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da UNICENTRO por oito dias como período de adaptação. A acomodação se deu em fotoperíodo de igual duração de dia e noite, com temperatura controlada e livre acesso à água e ração, conforme guia de cuidados e utilização de animais de laboratório (NAS, 2011).

Aos 50 dias de idade iniciou-se a administração do produto, que estendeu-se até os 90 dias. Quando os animais completaram 105 dias de vida procedeu-se com a realização dos testes de orientação e comportamento sexual, e ao completarem 110 dias eles foram anestesiados com 0,02mL/100gPV de Cloridrato de Xilazina e 0,04mL/100gPV de Cloridrato de Quetamina, o sangue foi coletado por punção cardíaca, entre 7h30 e 8h30 da manhã, e em seguida os animais foram eutanasiados por decapitação. Após, foram coletados os espermatozoides da cauda do epidídimo esquerdo, e removidos os epidídimo e testículo direito dos animais. A exposição ao agente se deu por ingestão forçada, gavagem, diariamente e sempre pela manhã. Os grupos foram submetidos a tratamento com 0mg/kg/dia (grupo controle), 5mg/kg/dia (grupo tratado 1) e 25mg/kg/dia (grupo tratado 2) de BPA (Sigma-Aldrich Co., St Louis, USA - ref. 239658, lot. MKAA2480V, CAS 80-05-7 - veículo: óleo de milho) (Figura 3). Para evitar contaminação, a sonda metálica utilizada na gavagem foi imersa em álcool 70% para antissepsia, e depois em água para limpeza, logo após a realização de cada gavagem.

Figura 3 – Desenho Experimental.



A dose oral de BPA referenciada por vários órgãos reguladores como NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*, dose onde não se observou nenhum efeito adverso) para reprodução e desenvolvimento é de 50mg/kg de peso corporal por dia. Entretanto, por haver uma grande discussão sobre a exposição humana e o efeito decorrente dessa, estabeleceu-se um *cut-off* para baixos níveis de dosagens, que é de 1mg/Kg de peso corporal por dia (WHO, 2010), utilizou-se doses intermediárias para observar o efeito causado quanto à parâmetros relevantes na reprodução.

3.2 PESO

3.2.1 Pesagem dos Animais

Os animais foram pesados diariamente para determinar a dose de produto a ser administrada e para acompanhamento do seu crescimento.

3.2.2 Peso dos Órgãos

Ao final do experimento, após eutanásia dos animais, retirou-se o testículo e epidídimo direito. O testículo foi pesado íntegro, e o epidídimo dividido em: cabeça, corpo e cauda.

3.3 PATOLOGIAS

As amostras de espermatozoides coletadas foram diluídas em formol salino (34,72 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18,68 mM KH_2PO_4 , 92,4 mM NaCl, 12,5 % (v/v) formaldeído), na proporção de 1:10, e observados em câmara úmida, em microscópio óptico, sob 400 vezes de aumento para avaliar a morfologia segundo características patológicas possivelmente apresentadas pelos espermatozoides conforme metodologia citada por Silva, Dode e Unanian (1993).

3.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS ESPERMATOZOIDES

Após coleta observou-se a funcionalidade dos espermatozoides dos animais quanto à atividade mitocondrial, integridade de membrana citoplasmática, integridade acrossomal e fragmentação do DNA. Para tanto, os espermatozoides foram obtidos a partir da cauda epididimal, por coleta com micropipeta e diluídos na proporção de 1:10, para a determinação de atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática e integridade acrossomal, e 1:20, para determinação da

fragmentação de DNA, em solução conservante tris, composta de 3,187g de hidroximetil-amino metano, 1,781g de ácido cítrico, 1,316g de frutose, 5mL de glicerol em água Milli-Q autoclavada q.s.p. 100mL.

3.4.1 Avaliação da atividade mitocondrial

Para esta avaliação utilizou-se a técnica descrita por Hrudka, em 1987, e consiste na avaliação indireta da atividade da enzima Citocromo C, analisada sobre a oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

Em eppendorfs protegidos da luz, aliquotou-se 300µL de DAB (1mg/mL – CAS 91-95-2) e 10µL da amostra diluída. Após homogeneização foi incubado em banho-maria a 37°C por uma hora, no escuro. Passado o tempo, depositou-se 10µL da mistura sobre a lâmina pré-aquecida, para realização do esfregaço. Após secagem fixou-se em formol 10% durante 10 minutos. A leitura foi realizada em microscópio de contraste de fase, em aumento de 400 vezes, contando 200 células por lâmina e classificando-as conforme abaixo:

- Classe I: 100% corado;
- Classe II: mais de 50% corado;
- Classe III: menos de 50% corado;
- Classe IV: 0% corado.

Entende-se por região corada regiões marrons na peça intermediária do espermatozoide, regiões essas com atividade mitocondrial.

O corante foi preparado com a adição de 0,1g de DAB em 10mL de água milli-Q, e 5-7 gotas de HCl para ajudar na solubilização. Dilui-se essa solução em 1:10 em PBS e obtém-se a solução corante de uso, que é mantida estocada a -80°C.

3.4.2 Determinação de integridade da membrana plasmática

A integridade de membrana plasmática foi avaliada pela coloração simples Eosina/Nigrosina, descrita por Barth e Oko (1989). O princípio da técnica se baseia na impermeabilidade da membrana ao corante quando essa está íntegra. O corante

foi preparado adicionando-se 0,1g de Eosina Y (CAS 15086-94-9), 1g de Nigrosina (CAS 8005-03-6) a 10mL de água milli-Q, homogeneizando-se sob aquecimento brando, e estocando-se ao abrigo da luz.

A amostra foi misturada ao corante na proporção de 1:1, foram realizados esfregaços em lâmina de vidro, fixados, e lidos em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes. Foram analisados 200 espermatozoides por lâmina, e classificados em íntegro e não-íntegro. Observou-se a cabeça do espermatozoide rosado quando houve penetração de corante.

3.4.3 Determinação de integridade de acrossoma

A membrana acrossomal foi analisada pela coloração simples de Pope (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), onde incubou-se a mistura de 1:1 de corante e espermatozoide, por 60 segundos, e foram feitos esfregaços em lâminas para contagem. Foram observados 200 espermatozoides por lâmina, em microscópio óptico comum, em objetiva de imersão, e caracterizados em íntegros e não íntegros, conforme sua aparência. A não integridade da membrana acrossomal foi identificada pela porção anterior da cabeça do espermatozoide levemente mais clara que a porção posterior.

O corante de Pope é uma solução sensível a luz e composto de 8mL de álcool etílico, 200mg de corante *rose bengal* (CAS 83269-9), 200mg de corante *fast green* (CAS 2353-45-9) em 12 mL de solução tampão (0,067g de ácido cítrico e 0,468g de fosfato dibásico em 20mL de água milli-Q).

3.4.4 Detecção da fragmentação do núcleo do espermatozoide

O ensaio foi realizado por um protocolo adaptado de Vendramini, Robaire, Miraglia (2012). Com a amostra de espermatozoides descongelada, pipetou-se 20µL da solução de espermatozoides em 200µL de agarose LMP, homogeneizou-se e fez-se uma estria na lâmina que já continha uma camada de agarose NMP.

Imediatamente colocou-se lamínula e deixou esfriar e descansar na geladeira por dez minutos. Escorregando-as para o lado, as lamínulas foram retiradas, e procedeu-se com a aplicação do tampão de lise de trabalho gelado nas lâminas, deixando agir por uma hora na geladeira e no escuro. Após, as lâminas foram lavadas com água destilada gelada por cinco minutos e cobertas com solução de proteinase K recém preparada. As lâminas cobertas com a solução foram deixadas por três horas na estufa a 37°C. Procedeu-se com lavagem com água gelada e as lâminas foram deixadas na geladeira e no escuro por quinze minutos para solidificar o gel. Após, as lâminas foram mergulhadas em solução alcalina recém preparada e levadas a geladeira por 45 minutos. Essa solução foi dispensada e as lâminas foram lavadas com TBE por duas vezes, por cinco minutos cada. Essas lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese e procedeu-se a corrida em 25V, 45V e 149V por 20min com TBE gelado. Após, as lâminas foram lavadas com álcool 70% por dez minutos e armazenadas para secagem, no escuro. A coloração se deu com brometo de etídio (CAS 1239-45-8) diluído em TBE (2:1500) por quinze minutos, e passado o tempo, duas lavagens de quinze minutos com TBE. Foram observadas 200 células por animal, em duplicatas de lâminas, e os espermatozoides foram classificados em classe I (sem dano) a IV (dano total), conforme o grau de fragmentação. Observam-se os fragmentos de DNA arrastados progressivamente em forma de uma cauda de cometa quando houver dano.

3.5 CONTAGEM DE ESPERMATOZOIDES, PRODUÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DIÁRIA E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO

A concentração de espermatozoides na amostra coletada foi determinada pela contagem de uma alíquota diluída em 1:10 em diluidor tris, em Câmara de Neubauer, em microscópio óptico e em aumento de 400 vezes.

Realizou-se também a contagem em Câmara de Neubauer de espermatozoides nos segmentos cabeça+corpo, cauda do epidídimo e testículo, obtendo-se a reserva espermática de cada segmento. Para isso os órgãos foram

seccionados e submetidos à sonicação em 5mL de solução 0,9% de NaCl e 0,5% de Triton-X, por 30s em potência de 60W.

Dividindo-se a concentração de espermatozoides testiculares pelo fator 6,1 pode-se obter a produção testicular diária de espermatozoides, e após a divisão do resultado pelo peso testicular, obtém-se a produção espermática diária por grama de testículo. Após, obteve-se os valores em dias para o tempo de trânsito espermático nos segmentos epididimais, pela simples divisão da reserva espermática pela produção espermática diária (MOURA et al., 2006; ROBB; AMMAN; KILLIAN, 1978).

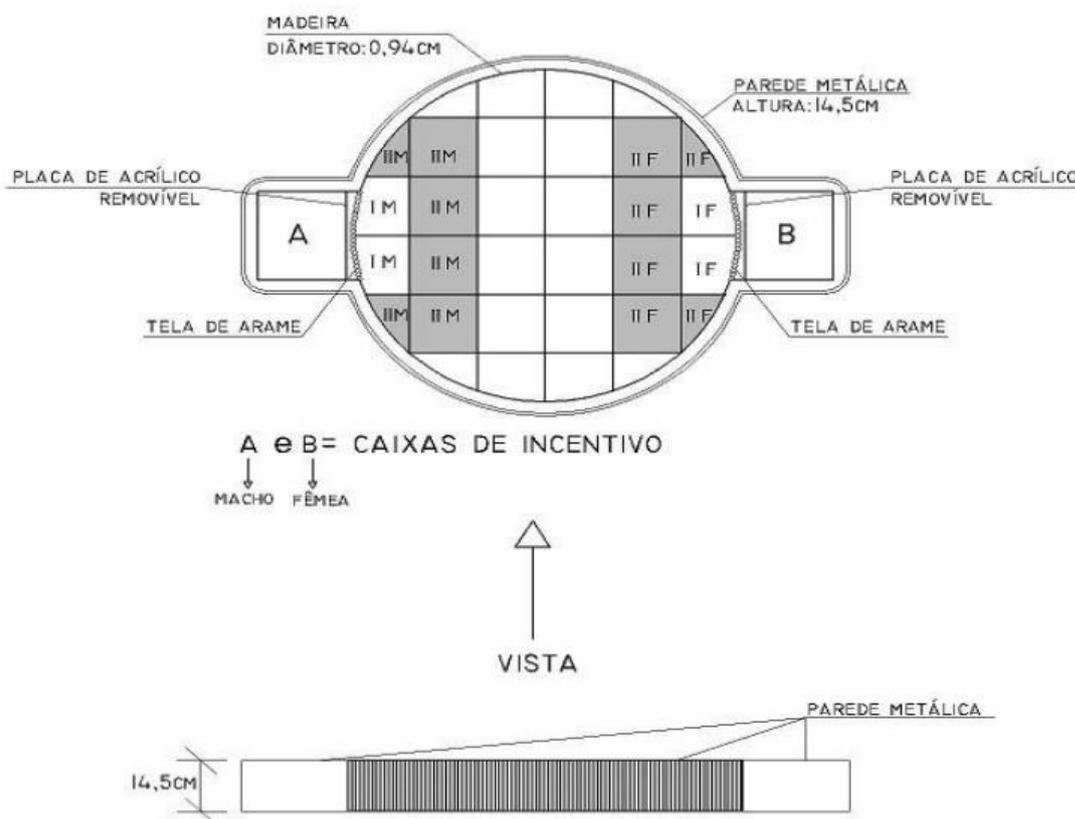
3.6 AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO SEXUAL

Os testes foram conduzidos aos 105 dias de vida do animal, no mesmo ambiente em que foram mantidos desde os 42 dias de idade. A observação da orientação sexual foi realizada em um aparato inicialmente proposto por Hetta e Meyerson (1978), e que posteriormente foi modificado por Dahlgren, Matucszczyk e Hard (1991). O aparato é constituído de um círculo de madeira com diâmetro de 94cm, rodeado por uma parede metálica de 14,5cm de altura. Acoplado às extremidades opostas da arena existem dois compartimentos, as chamadas caixas de incentivo, medindo 25x25x14,5cm (Figura 4). Nestas caixas foram alojados um macho e uma fêmea, um de cada lado, animais esses que ficaram isolados da arena por uma tela de arame e fechados por uma placa de acrílico. O chão da arena foi dividido em 32 partes aproximadamente iguais: as duas partes próximas tanto da caixa de incentivo do macho quanto da fêmea foram denominadas de área I do macho ou da fêmea; as 6 partes subsequentes foram pintadas e denominadas de área II; e finalmente as 16 partes localizadas na região central da arena foram denominadas de área indiferente.

Os testes foram realizados na fase escura do ciclo claro/escuro, uma vez que ratos wistar são mais ativos à noite. A iluminação da sala foi realizada com a utilização de lâmpada infravermelha e a observação foi feita por quatro observadores, posicionados cada qual próximo as caixas incentivo, sendo que cada

um pode medir o tempo de permanência em uma área. Foi utilizada uma fêmea especialmente preparada, previamente ovariectomizada e tratada três semanas após a castração com 50µg/kg de 17-β-estradiol e 2mg/kg de progesterona, 54 e 6 horas antes do início dos testes, objetivando a indução do cio. Foram colocados nas respectivas caixas incentivo um rato macho isca e a rata fêmea ovariectomizada com cio induzido, a seguir foi colocado na arena o rato a ser avaliado, dando-se de início um período de habituação de 5 minutos. Após, o rato foi posicionado no centro da arena (área indiferente) e o incentivo considerado foi o odor que os animais iscas exalaram. Iniciou-se a observação da motivação sexual do rato, que se deu por 20

Figura 4 – Desenho esquemático da arena utilizada na avaliação da orientação sexual.



Fonte: Santos, 2011.

minutos. Durante este período foi cronometrado o tempo de permanência do rato na área I do macho, na área II do macho, na área I da fêmea e na área II da fêmea; o tempo que o animal permaneceu na área indiferente não foi considerado.

O escore de preferência sexual foi calculado subtraindo-se o tempo total que o animal ficou na zona do macho do tempo total que ele permaneceu na área da fêmea. Assim, a pontuação positiva significa preferência do animal testado pelo sexo feminino e negativo para os animais com preferência pelo sexo masculino. Decorrido o tempo de observação, o rato teste foi retirado da arena que recebeu higienização com uma solução de álcool a 70% e então procedeu-se o teste com outro rato. A observação dos animais tratados e controles foi feita intercaladamente para que o horário do ciclo tivesse menos interferência nos resultados.

3.7 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO SEXUAL

Aos 105 dias de idade, os animais dos grupos controle e tratado foram submetidos a análise do comportamento sexual conforme descrito por Felicio, Palermo-Neto, Nasello (1989) e Chiavegatto, Bernardi, Souza-spinosa (1989) . Todos os testes foram iniciados após quatro a oito horas de ciclo escuro. Para o teste, fêmeas foram ovariectomizadas e ativadas três semanas após a castração com 50µg/kg de 17-β-estradiol e 2mg/kg de progesterona, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do início dos testes. Cada rato a ser estudado quanto a orientação foi colocado individualmente na caixa de observação cinco minutos antes da rata preparada para o pareamento, para adaptar-se a esta nova situação. O comportamento sexual foi analisado por meio de dois componentes: libido (latência para monta, intromissões e ejaculações) e potência (medida pela taxa copulatória, ou seja, a proporção de montas com inserção peniana e também pelo número de ejaculações num determinado período).

Foram observados latências para primeira monta, intromissão e ejaculação, número de montas incompletas, de intromissões até a primeira ejaculação e de ejaculações em um período de 30 minutos por rato. Também foi observada a latência para monta após a primeira ejaculação.

3.8 DOSAGENS HORMONAIIS

Depois de anestesiados o sangue dos animais foi obtido por punção cardíaca e coletados em tubos plásticos. Os tubos foram centrifugados a 5000rpm por 10min e o soro foi armazenado em criotubos a -80°C. Análises posteriores foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo.

Nas dosagens de LH e FSH foi utilizado um imunoenensaio da ©EMD Millipore Corporation, USA, o MILLIPLEX® Map para hormônios hipofisários de ratos, que pode dosar ate sete hormônios originários da hipófise, utilizando a tecnologia xMap® da ©Luminex. Esta técnica colore internamente microesferas com dois corantes fluorescentes diferentes, dependendo da concentração desses corantes até 100 analitos diferentes podem ser dosados ao mesmo tempo, sendo cada esfera colorida relacionada a um anticorpo específico. Após um analito da amostra ser capturado pela esfera correspondente, o anticorpo biotinilado de detecção é adicionado e incubado com estreptavidina ficoeritrina, que completa a reação. O conjunto então é excitado por um laser e quantificado baseado na emissão fluorescente.

Testosterona e Estradiol foram dosados por kits da ©Roche Diagnostics, Testosterona II e Estradiol II, cujo princípio da técnica é um imunoenensaio onde o analito é primeiramente complexado com um anticorpo biotinilado e, em seguida, são adicionadas microesferas de estreptavidina e um derivado do hormônio marcado com rutênio, ocupando os lugares vazios dos anticorpos biotinilados. Esse complexo liga-se a fase sólida pela interação da estreptavidina com a biotina e a aplicação de corrente elétrica induz quimioluminescência que é medida por um fotomultiplicador.

Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro dos hormônios LH, FSH e estradiol, e em nanogramas por mililitro para a testosterona. O limite de detecção dos testes é 7,62pg/mL para FHS, 3,28pg/mL para o LH, 0,025ng/mL para a Testosterona e 5pg/mL para o Estradiol.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados observados no estudo foram avaliados e julgados segundo métodos estatísticos apropriados. Para isso, todas as variáveis foram primeiramente analisadas quanto a sua distribuição pelos testes de Kolmogorov-Smirnov, para verificação de normalidade e o teste de Bartlett para verificação de homocedasticidade de variâncias. Na dependência das análises anteriormente descritas, utilizou-se de métodos paramétricos ou não paramétricos. Nos dados que apontaram para uma metodologia paramétrica, a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey foram preferencialmente empregados. Caso contrário, deu-se preferência a análise de variância não paramétrica, como o teste de Kruskal-Wallis e as comparações pelos testes de Freedman e Mann-Whitney.

Os valores paramétricos foram expressos em média (X) e erro-padrão da média (E.P.M.), como $X \pm E.P.M$ (IC), e para dados não paramétricos, em mediana (M) e intervalos interquartílicos (II). Considerou-se diferença estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05. Todas as análises foram efetuadas com a utilização do software Statistica 8.0, StatSoft Inc e GraphPad Prism Inc.

4 RESULTADOS

As possíveis alterações causadas pela administração de BPA aos ratos wistar foram determinadas pela avaliação da evolução do peso corporal, peso do testículo e epidídimo, dividido nas porções cabeça, corpo e cauda; pela concentração média de espermatozoides na amostra coletada; análise de patologias espermáticas; análise funcional, avaliada pela atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, e pela avaliação do dano ao material genético do espermatozoide; avaliação da produção espermática, reservas espermáticas e tempo de trânsito espermático; avaliação do comportamento sexual e orientação sexual; e, pelo perfil hormonal avaliado em LH, FSH, testosterona e estradiol.

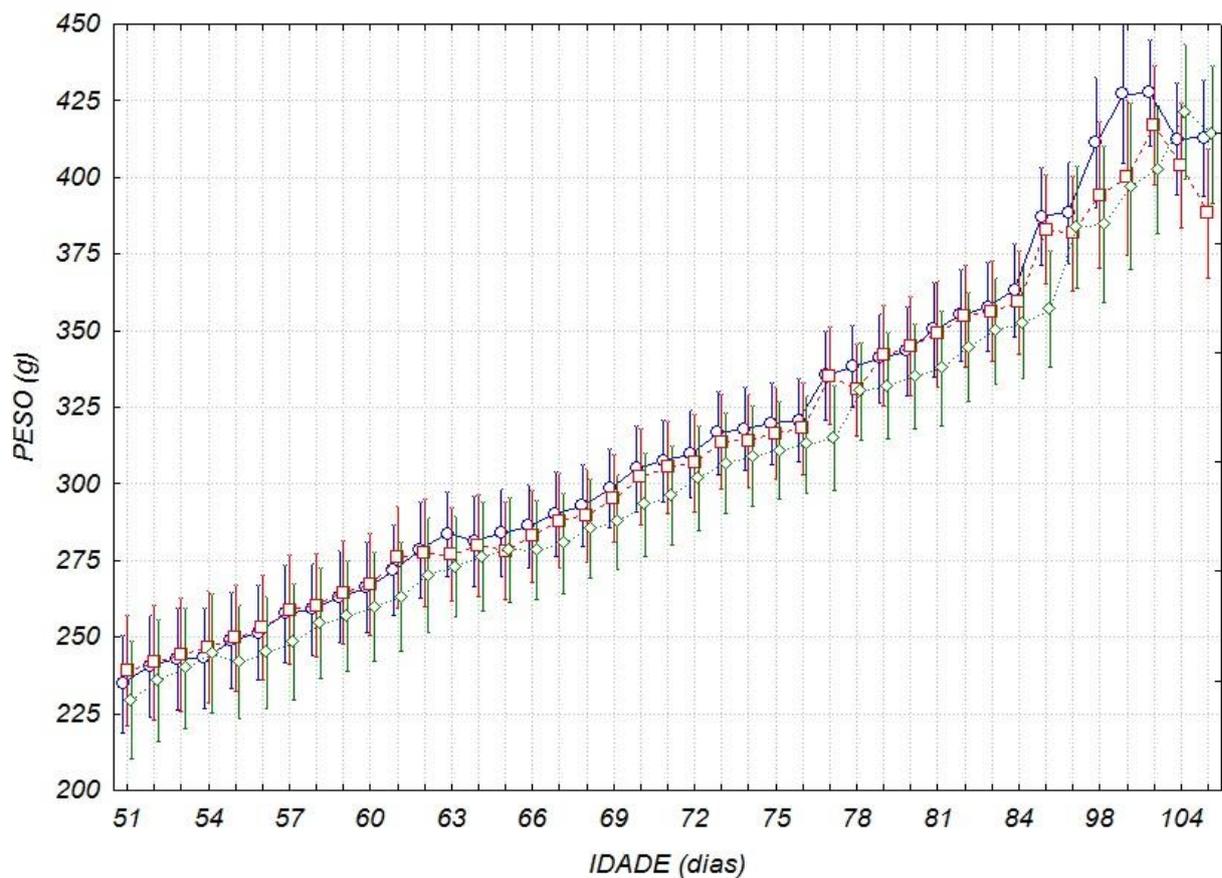
No decorrer do experimento dois animais do grupo tratado 1 e três animais do grupo tratado 2 tiveram que ser sacrificados, totalizando ao fim, 25 animais experimentais, dez no grupo controle, oito no grupo tratado 1 e sete no grupo tratado 2.

4.1 PESOS

Os animais foram pesados diariamente e a evolução do peso médio por grupo está demonstrado no gráfico abaixo (gráfico 1), onde se tem valores estatisticamente diferentes entre o grupo tratado 2 e o grupo controle a partir dos 75 dias de idade ($p < 0,00000$).

Ao término do experimento, aos 110 dias de vida, os animais foram sacrificados e o peso corporal, peso testicular e o peso das porções do epidídimo foram avaliados no total (Tabela 1) e relativando-os ao peso do animal (Tabela 2). Apenas o peso do testículo e do corpo do epidídimo relativo a 100g de peso corporal não apresentaram diferença estatística, nos permitindo inferir que o produto BPA causou alterações nas porções cabeça e cauda do epidídimo dos órgãos andrógenos analisados, com diminuição de tamanho nos animais tratados.

Gráfico 1 – Evolução do peso corporal nos animais experimentais, grupo controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). Análise multivariada de variâncias (MANOVA) pelo procedimento de modelo linear generalizado (GLM) e pós teste de Tukey.



-  **Grupo Controle (BPA 0mg/kg)**
-  **Grupo Tratado 1 (BPA 5mg/kg)**
-  **Grupo Tratado 2 (BPA 25mg/kg)**

Tabela 1– Peso corporal, peso testicular, e das porções do epidídimo para os animais do grupo controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). $\bar{X} \pm$ EPM, ANOVA/HSD Tukey.

Parâmetro	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Peso Corporal	430,59±12,161 ^a	368,14±7,232 ^b	375,79±8,666 ^b
Peso Testículo	1,63±0,063 ^a	1,34±0,032 ^b	1,35±0,030 ^b
Peso Cabeça do Epidídimo	0,34±0,011 ^a	0,18±0,009 ^b	0,20±0,011 ^b
Peso Corpo do Epidídimo	0,07±0,007 ^a	0,04±0,003 ^c	0,05±0,005 ^c
Peso Cauda do Epidídimo	0,31±0,019 ^a	0,13±0,006 ^b	0,15±0,020 ^b

a e b diferem entre si nas linhas com $p < 0,01$;

a e c diferem entre si nas linhas com $p < 0,05$.

Tabela 2– Peso corporal, peso testicular e das porções do epidídimo relativo a 100g de peso corporal para os animais do grupo controle (n=10), grupo tratado 1 (n=8) e grupo tratado 2 (n=7). $\bar{X} \pm$ EPM, ANOVA/HSD Tukey.

Parâmetro (Relativo a 100g de Peso Corporal)	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Peso Testículo	0,3827±0,018	0,3659±0,013	0,3617±0,008
Peso Cabeça do Epidídimo	0,0796±0,003 ^a	0,0491±0,003 ^b	0,0545±0,003 ^b
Peso Corpo do Epidídimo	0,0182±0,002	0,0131±0,001	0,0141±0,001
Peso Cauda do Epidídimo	0,0730±0,005 ^a	0,0371±0,002 ^b	0,0421±0,005 ^b

a e b diferem entre si nas linhas com $p < 0,01$.

4.2 CONCENTRAÇÃO E PATOLOGIAS

Após a coleta dos espermatozoides da cauda do epidídimo, foi possível a realização da contagem dessa amostra e a observação quanto a presença de características patológicas.

Obteve-se que a concentração de espermatozoides (10^4) na amostra coletada foi de $35,00 \pm 31,56$ para o grupo controle, $19,87 \pm 12,48$ para o grupo tratado 1, e, $15,87 \pm 11,61$ para o grupo tratado 2, com significância estatística de $p < 0,01$ quando os grupos tratados foram comparados com o grupo controle ($X \pm EPM$, ANOVA/HSD Tukey).

Observou-se os espermatozoides quanto a presença ou não de patologia, de forma isolada e no total por grupo, e não se obteve diferença estatística significativa. A mediana encontrada para o grupo controle foi de 5,50 com intervalo interquartil de 3,00-5,00; para o grupo tratado 1 valores de 8,00 (4,00-11,00); e para o grupo tratado 2 de 11,00 (9,00-13,00), Kruskal-Wallis.

4.3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS ESPERMATOZOIDEOS

Parte da amostra de espermatozoides coletada foi armazenada em tris e posteriormente foram confeccionadas lâminas e coradas. As contagens das lâminas nos permitiram obter dados referentes à funcionalidade espermática.

4.3.1 Avaliação da atividade mitocondrial

Obteve-se diferença estatística para todas as classificações da coloração (Figura 5), com um aumento de espermatozoides funcionalmente danificados nos animais submetidos a intoxicação com a maior dose de BPA, $p < 0,01$ (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides dos grupos controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). M (II); Kruskal-Wallis.

Parâmetro	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Classe I	191,50 ^a (175,00-200,00)	190,00 ^b (182,00-198,00)	155,00 ^b (127,00-171,00)
Classe II	8,00 ^a (2,00-22,00)	9,00 ^b (2,00-16,00)	39,00 ^{b,c} (18,00-65,00)
Classe III	2,50 ^a (1,00-4,00)	2,00 ^d (1,00-4,00)	7,00 ^b (3,00-12,00)
Classe IV	1,00 ^a (0,00-1,00)	0,00 (0,00-0,00)	1,00 ^b (0,00-8,00)

a e b; b e c diferem entre si nas linhas com $p < 0,01$;

a e d diferem entre si nas linhas com $p < 0,05$.

4.3.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática

Evidenciou-se diferença estatística significativa, $p < 0,01$, nos dados quanto a integridade ou não de membrana plasmática (Figura 6), com um aumento de espermatozoides com membranas não íntegras nos grupos tratados com BPA (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da integridade da membrana plasmática espermática para os grupos controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). M (II); Kruskal-Wallis.

Parâmetro	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Membrana Íntegra	197,50 (99,00-199,00)	193,50 (192,00-198,00)	194,00 (190,00-196,00)
Membrana Não Íntegra	2,00 ^a (1,00-8,00)	6,50 ^b (2,00-8,00)	6,00 ^b (4,00-10,00)

a e b diferem entre si na linha com $p < 0,01$.

4.3.3 Avaliação da integridade acrossomal

Dados relativos a contagem das lâminas coradas para avaliação da integridade acrossomal demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,01$) na integridade e não integridade de acrossoma (Figura 7) nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, com diminuição progressiva de integridade nos animais submetidos a intoxicação com BPA (Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação da integridade de acrossoma dos espermatozoides dos grupos controle (n=10), tratado 1(n=8) e tratado 2 (n=7). M (II); Kruskal-Wallis.

Parâmetro	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Acrossoma Íntegro	197,50 ^a (187,00-200,00)	182,00 ^b (162,00-197,00)	170,00 ^b (138,00-180,00)
Acrossoma Não Íntegro	5,50 ^a (2,00-13,00)	18,00 (3,00-38,00)	30,00 ^b (20,00-62,00)

a e b diferem entre si nas linhas com $p < 0,01$.

4.3.4 Ensaio de avaliação da integridade do DNA

Não foi evidenciada diferença estatística significativa de dano ao material genético dos espermatozoides nos animais estudados (Figura 8).

Figura 5 – Lâminas de coloração DAB. Em A, espermatozoide classificado como classe I; em B, classe II; em C, classe III; e em D, classe IV, indicados pelas setas.

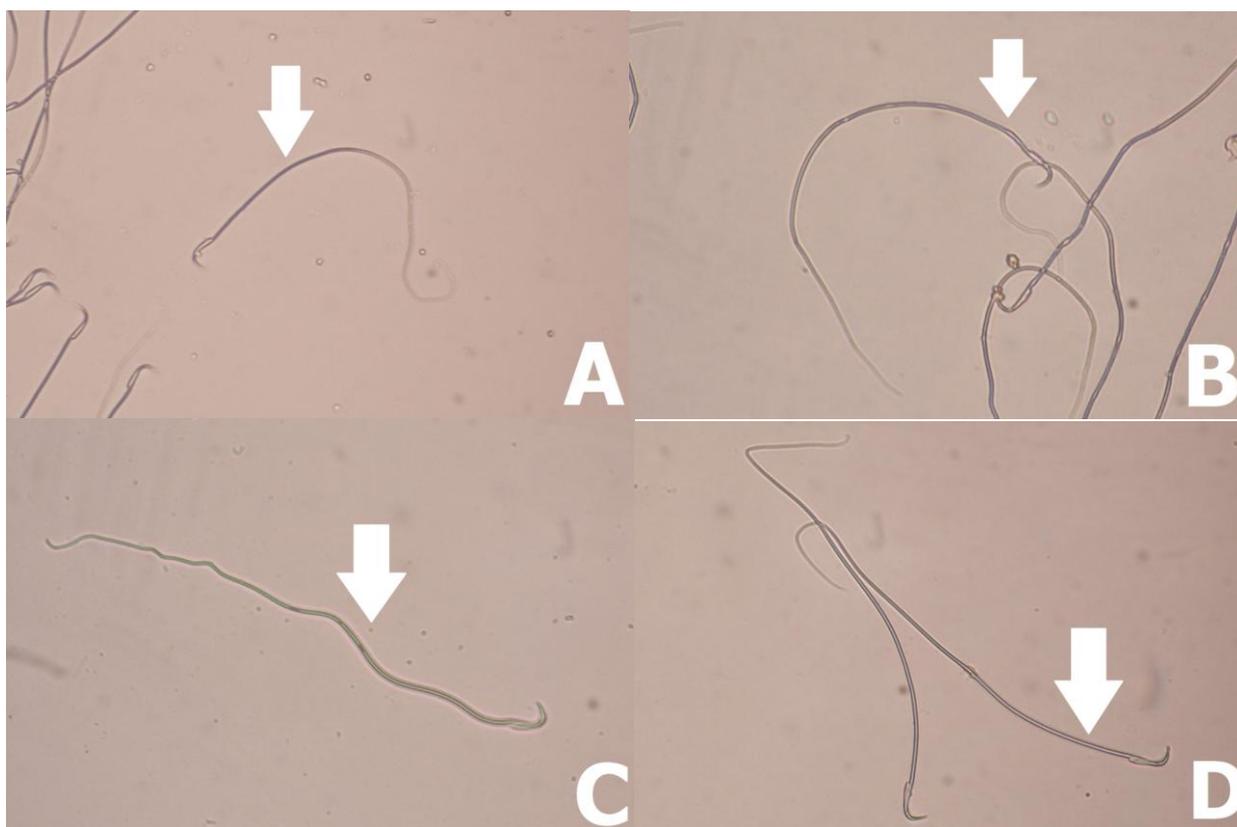


Figura 6 - Lâminas de coloração Eosina/Nigrosina. Em A: espermatozoides com membrana íntegra; em B, espermatozoide com membrana não íntegra.

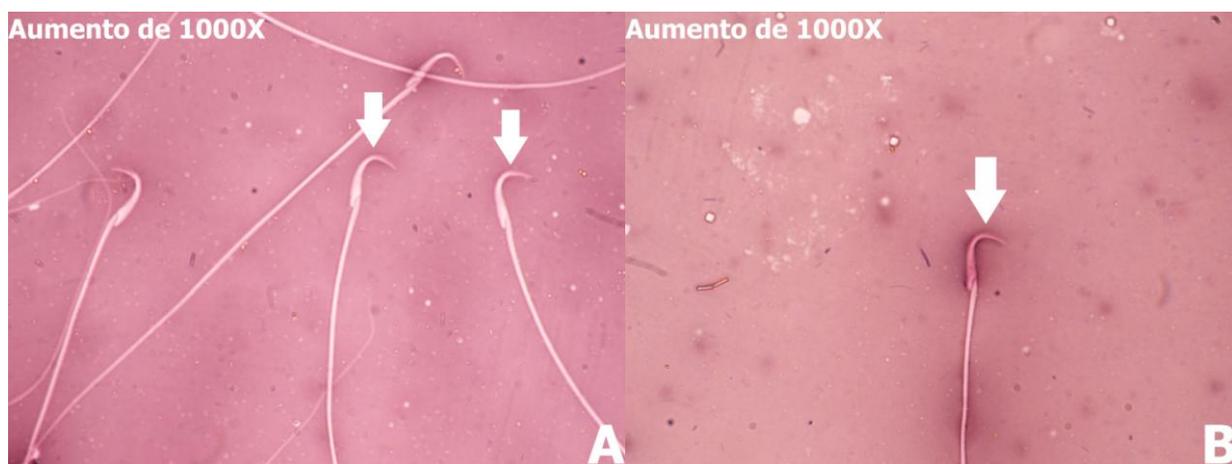


Figura 7 – Lâminas de coloração de Pope. Em A, espermatozoide com acrossoma íntegro; em B, espermatozoide com acrossoma não íntegro.

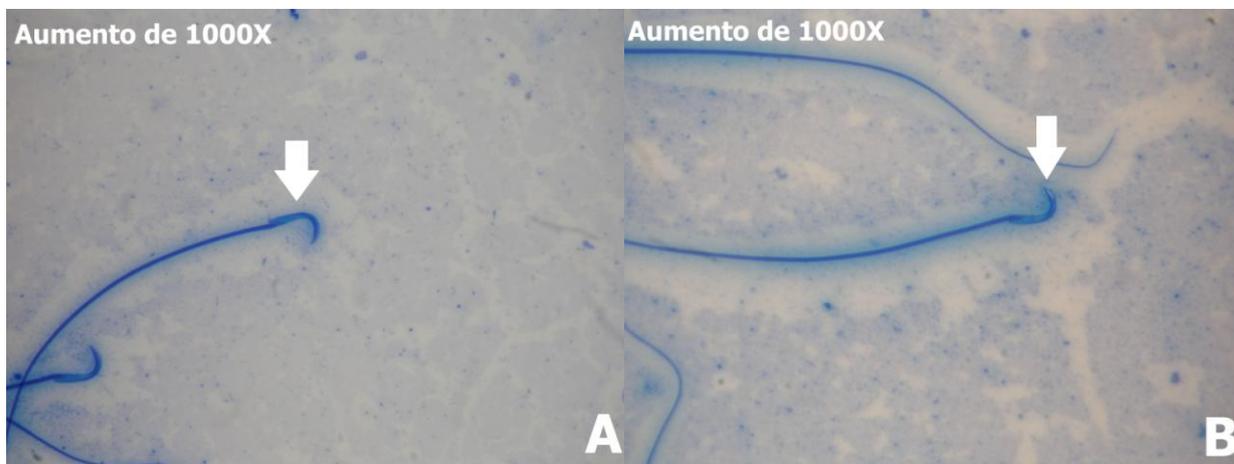


Figura 8 – Fotomicrografia de espermatozoides classe I corados com Brometo de Etídio pela técnica de avaliação da integridade de DNA do núcleo do espermatozoide.



4.4 PRODUÇÃO ESPERMÁTICA, RESERVA ESPERMÁTICA E TRÂNSITO ESPERMÁTICO.

Os dados nos mostram que houve uma diminuição da produção espermática nos grupos tratados, assim como uma diminuição da reserva espermática e um adiantamento significativo no tempo de trânsito dos espermatozoides ao longo do epidídimo (Tabela 6).

Tabela 6- Produção espermática diária por testículo (10^6 /testículo) e por grama de testículo (10^6 /g de testículo), reserva espermática nas porções do epidídimo (espermatozoides $\times 10^6$) e tempo de trânsito espermático (dias) em ratos wistar do grupo controle (n=10) e dos grupo tratado 1(n=8) e 2 (n=7), submetidos a intoxicação pré-adulta pelo bisfenol A. $X \pm EPM$; ANOVA/HSD Tukey.

Parâmetros	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Produção espermática diária por testículo (10^6 /testículo)	$8,93 \pm 1,04^a$	$4,59 \pm 0,58^b$	$5,75 \pm 1,45$
Produção espermática diária por grama de testículo (10^6 /g testículo)	$5,48 \pm 0,63^a$	$3,45 \pm 0,44^b$	$4,16 \pm 0,94^b$
Reserva Espermática, Cabeça + corpo do epidídimo (10^6)	$15,30 \pm 1,08^a$	$2,31 \pm 0,76^c$	$5,07 \pm 1,32^c$
Reserva Espermática, Cauda do epidídimo (10^6)	$31,90 \pm 5,95^a$	$14,81 \pm 5,53$	$8,93 \pm 1,43^b$
Tempo de Trânsito, Cabeça+Corpo do epidídimo (dias)	$1,99 \pm 0,30^a$	$0,61 \pm 0,25^c$	$0,93 \pm 0,23^b$
Tempo de Trânsito, Cauda do epidídimo (dias)	$4,26 \pm 0,69^a$	$2,35 \pm 0,62^c$	$2,05 \pm 0,57^c$

a e b diferem nas linhas com $p < 0,05$;

a e c diferem nas linhas com $p < 0,01$.

4.5 ORIENTAÇÃO SEXUAL

Em geral os animais do grupo tratado permaneceram menos tempo na área I, mais próxima, da fêmea que os animais controles, e o grupo tratado 2 teve um escore de preferência sexual estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$ - Tabela 7).

Tabela 7 – Tempo de permanência (segundos) dos grupos estudados controle (n=10), tratado 1 (n=8), tratado 2 (n=7) na área do macho e na área da fêmea e escore de preferência sexual; $X \pm$ EPM; ANOVA/HSD Tukey.

Parâmetros	Tempo (segundos)		
	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Permanência na área I do Macho	59,00±16,06 ^a	48,67±20,34 ^b	181,33±77,24 ^c
Permanência na área II do Macho	219,60±64,25	215,33±78,19	310,33±70,43
Total na Área do Macho	278,60±79,82 ^a	264,00±93,95 ^d	491,67±130,52 ^f
Permanência na área I da Fêmea	322,80±61,50	237,67±106,76	288,67±40,83
Permanência na área II da Fêmea	429,40±55,19 ^a	524,33±87,32 ^b	289,33±72,47 ^c
Total na Área da Fêmea	752,20±115,77	762,00±130,79	578,00±111,58
Escore de Preferência Sexual	473,60±194,16 ^a	498,00±223,94	86,33±241,59 ^f

a e b; b e c diferem entre si com $p < 0,01$;
a e d; a e f diferem entre si com $p < 0,05$.

4.6 COMPORTAMENTO SEXUAL

Os animais tratados com a maior dose de BPA apresentaram valores de latências para monta e intromissão maiores e estatisticamente diferentes do grupo controle, e menores números de ejaculações durante a realização do teste (Tabela 8).

Tabela 8 – Avaliação do comportamento sexual dos animais do grupo controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7). $\bar{X} \pm \text{EPM}$; ANOVA/HSD Tukey.

Parâmetros	Controle	Tratado 1	Tratado 2
Latência para Primeira Monta (s)	330 \pm 10 ^a	60 \pm 3,3 ^b	540 \pm 6,7 ^{b,c}
Latência para Primeira Intromissão (s)	420 \pm 21 ^a	60 \pm 21 ^b	543 \pm 3 ^{b,c}
Latência para Primeira Ejaculação (s)	510 \pm 126	486 \pm 90	510 \pm 1,2
Número de montas incompletas	4,5 \pm 0,6	0,0	3,5 \pm 0,03
Intromissões até 1 ^a ejaculação	1,5 \pm 0,7	0,0	0,0
Latência para 1 ^a monta após ejaculação (s)	30 \pm 7,8 ^a	105 \pm 6,6 ^b	30 \pm 1,2 ^b
Ejaculações em 30 minutos, após 1 ^a intromissão	26,5 \pm 6,8 ^a	11 \pm 1 ^b	13 \pm 3,2 ^b

Letras a e b; b e c nas linhas diferem estatisticamente $p < 0,01$.

4.7 DOSAGENS HORMONAIAS

A concentração sérica dos hormônios hipofisários encontraram-se ambas diminuídas progressivamente nos animais tratados com 5 e 25mgBPA/Kg (gráfico 2 e 3), a testosterona mostra-se também alterada (gráfico 4), com diminuição significativa nos animais submetidos a intoxicação com BPA, nos quais a concentração foi tão baixa que não foi possível detectar o hormônio na amostra. Ao

contrário, a concentração sérica de estradiol mostrou-se gradualmente aumentada nos animais dos grupos tratados (gráfico 5). Esses dados estão agrupados na tabela 9.

Gráfico 2 – Dosagem hormonal de LH no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.

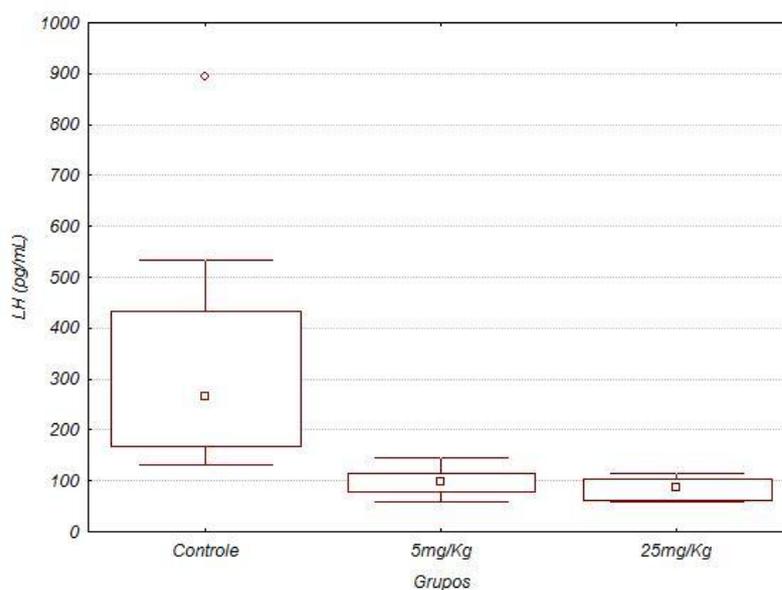


Gráfico 3 – Dosagem hormonal de FSH no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.

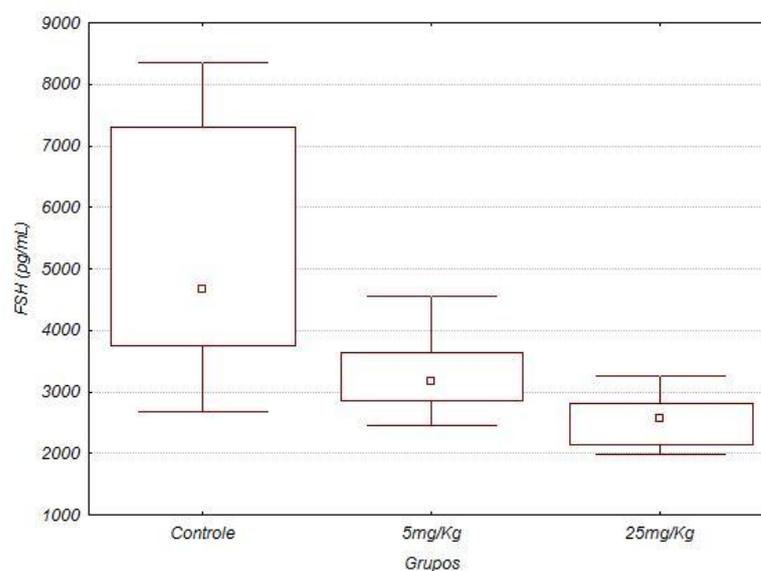


Gráfico 4 – Dosagem hormonal de Testosterona no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.

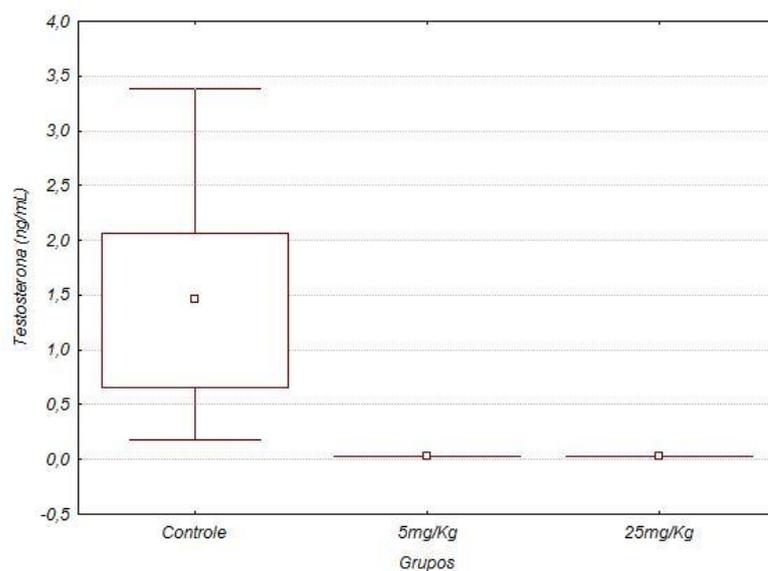


Gráfico 5 – Dosagem hormonal de Estradiol no soro dos animais controle e tratados com BPA. Médias \pm EPM; Médias \pm Desvio Padrão.

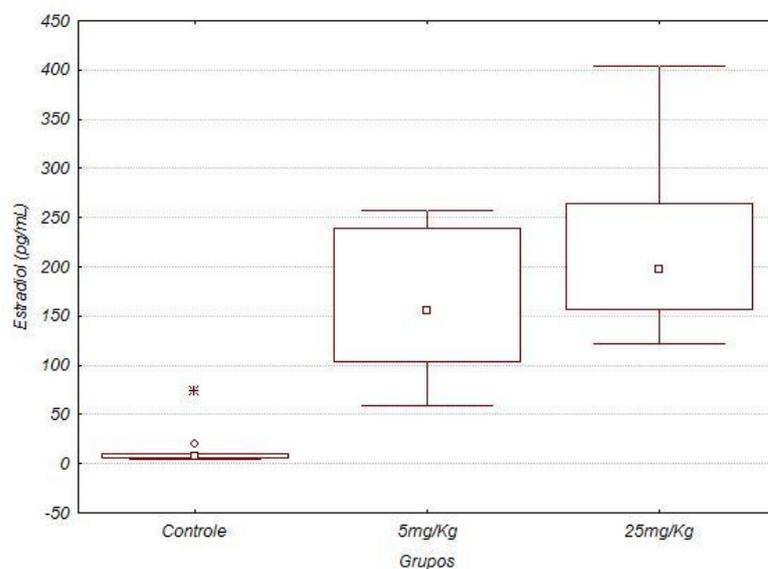


Tabela 9 – Dosagens hormonais no soro dos animais dos grupos estudados: controle (n=10), tratado 1 (n=8) e tratado 2 (n=7); $\bar{X} \pm \text{EPM}$; ANOVA/HSD Tukey.

Hormônio	Controle	Tratado 1	Tratado 2
LH (pg/mL)	334,00 ± 39,29 ^a	97,82 ± 9,78 ^b	85,59 ± 9,46 ^b
FSH (pg/mL)	5222,50 ± 613,85 ^a	3290,50 ± 237,60 ^b	2557,16 ± 198,22 ^c
Testosterona (ng/mL)	1,49 ± 0,32 ^a	<0,025 ^c	<0,025 ^c
Estradiol (pg/mL)	14,77 ± 6,64 ^a	164,16 ± 27,35 ^c	223,72 ± 40,80 ^c

a e b diferem nas linhas com $p < 0,05$;

a e c diferem entre si nas linhas com $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Avaliou-se o efeito do BPA nos animais na fase pré-adulta da vida, com início da administração aos 50 dias e término aos 90. Em geral os resultados encontrados evidenciam desregulação da fisiologia reprodutiva animal.

Pouco tempo antes do fim da administração do agente os animais tratados começaram a apresentar diminuição no peso, com diferença estatística significativa aos 75 dias de idade. Dados bibliográficos de Nishino et al. (2006) indicam que em doses acima de 200mg/kg/dia de BPA o peso corporal total dos animais sofre diminuição quando comparado ao grupo controle, porém demonstrou-se que em doses mesmo menores, de até 25mg/kg/dia, o produto testado provoca interferência no crescimento animal. Essa alteração pode ser devido a alguma interferência neuronal causada pelo BPA, pois o hipotálamo é responsável por regular o peso corporal, criando a sensação de sede e controlando a excreção da urina. Os núcleos hipotalâmicos secretam hormônios de liberação e inibitórios para hipófise anterior, sendo a ligação do sistema nervoso ao sistema endócrino, e ao sistema reprodutivo de uma maneira geral. Estudos revelam que dano ao hipotálamo leva o animal a perder o desejo pela comida, e perder impulsos motivacionais, causando passividade extrema (GUYTON; HALL, 2002); que BPA causa alteração na neurogênese do hipocampo, alteração essa que pode ser evidenciada na prole (JANG et al., 2012; KIM et al., 2011); e que causa apoptose de células neuronais na região do hipocampo (LEE et al., 2008).

Outra hipótese é devido ao veículo utilizado na administração do produto, oleoso, ter suprido a deficiência de crescimento dos animais tratados, pois logo que cessada essa reposição a diferença nos pesos se evidenciou.

Os pesos dos órgãos diferiram estatisticamente entre os grupos tratados e o controle, porém, quando relativados ao peso corporal, observou-se que os testículos e a porção corpo do epidídimo não apresentaram diferença estatística. A diferença antes vista foi devido à diferença de peso entre os grupos de animais, e que apenas a alteração em duas porções, cabeça e cauda do epidídimo, de fato se deram pela administração do agente BPA. O BPA causa total degeneração do epitélio

epididimário em doses de microgramas por quilograma (CHITRA; LATCHOUMYCANDANE; MATHUR, 2002), o que pode explicar a redução de peso das porções, outra hipótese é a redução do peso do epidídimo se dar pela baixa concentração de espermatozoides (BELLENTANI et al., 2011), que demonstrou-se serem diferentes entre os grupos. Ainda assim não se esclarece a porção corpo não estar também diminuída.

O epidídimo apresenta-se com células completamente diferenciadas aos 49 dias após o nascimento, e nosso tratamento com BPA iniciou-se ao término dessa fase. Desta forma, pode-se sugerir que o agente não causa alteração nesse órgão apenas por interferir no desenvolvimento dos ductos de Wolffian, sua origem embrionária, como sugere Vom Saal (1998).

Foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas concentrações espermáticas entre os grupos tratados comparados ao grupo controle. Observou-se uma diminuição na concentração espermática pela ação do BPA nos animais, embora sem diferenças dos níveis de patologias espermáticas para todos os grupos. Chemes e Rawe (2003) afirmaram que existem limites de anormalidades, imotilidade e de espermatozoides mortos em um ejaculado de indivíduos férteis, e essa porcentagem é diferenciada em casos de infertilidade masculina.

Meeker et al. (2010), em um estudo realizado com 190 homens de uma clínica de infertilidade demonstraram forte relação entre a concentração urinária de BPA e alteração nos parâmetros de qualidade seminais, com diminuição de 27% na concentração espermática, 6% na motilidade, 16% na morfologia, e ainda, aumento de 10% no dano ao DNA. Nossos resultados mostram uma redução de aproximadamente 5% na morfologia, 50% na concentração, 2% na motilidade e sem evidência de alteração no DNA. Li et al. (2009) afirmam que 61,1% da população mundial masculina possuem ao menos um dos parâmetros seminíferos (volume de sêmen, concentração de espermatozoides e motilidade) abaixo dos valores normais determinados pela Organização Mundial de Saúde.

Um estudo revela que a exposição ao etanol altera a integridade do DNA espermático e o remodelamento da cromatina, podendo induzir apoptose das células pelo possível mecanismo de estresse oxidativo (RAHIMIPOUR et al., 2013) e que a

exposição de animais de 10 a 12 semanas a organofosforados durante fases de diferenciação espermática alteram a condensação da cromatina causando dano ao DNA e possível infertilidade (PIÑA-GUZMÁN; SOLÍS-HEREDIA; QUINTANILLA-VEJG, 2005), inferindo assim que compostos que promovem estresse oxidativo em diferentes linhagens celulares causam dano ao DNA, mas, mesmo tendo a relação do BPA com aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição de defesas antioxidantes, animais expostos durante a gestação e lactação ao agente BPA não apresentam alteração na metilação do DNA quando comparados aos animais controle (ANDERSON et al., 2012; CHITRA; RAO; MATHUR; 2003; HUC et al., 2012), corroborando com nossos resultados de não evidência de dano ao material genético do espermatozoide.

O BPA administrado aos animais causou diminuição da atividade mitocondrial, evidenciada pela diminuição de espermatozoides de classe I e aumento de classe IV. Espermatozoides classificados como classe I e II são espermatozoides competentes, enquanto as classificações III e IV podem ser considerados espermatozoides deficientes (GRAHAM, 2001; THIELE et al., 1995).

O BPA em doses próximas a micromolares causa desregulação da homeostase das mitocôndrias, levando a um estresse oxidativo (HUC et al., 2012) e em doses na escala de microgramas por quilograma causa a diminuição de defesas antioxidantes como as enzimas superóxido dismutase e glutathiona peroxidase (CHITRA; RAO; MATHUR, 2003). O estresse oxidativo se manifesta quando a concentração de ROS superam as defesas antioxidantes da célula (TALEVI et al., 2013). Sabe-se que a funcionalidade mitocondrial é considerada uma marca de qualidade espermática (EICHENLAUB-RITTER, et al., 2011) e que a geração excessiva de ROS no sêmen está associada a reduzido potencial de fertilização e alteração do metabolismo, morfologia e motilidade do espermatozoide (SHIVA, et al., 2011). Essa informação confirma os resultados que se obteve, onde o BPA promoveu destruição da membrana plasmática, com diminuição da integridade da membrana identificada pela coloração Eosina/Nigrosina, e pela diminuição significativa da integridade da região acrossomal dos espermatozoides nos animais intoxicados com BPA durante o período pré-adulto.

A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida (onde o acrossoma é de evidente função), e fusão com o pró-núcleo possam ocorrer (ARRUDA et al., 2011). A primeira interação entre os gametas feminino e masculino se dá no contato do espermatozoide com a zona pelúcida (BURKIN; MILLER, 2000), e a habilidade do espermatozoide passar pela capacitação e reação acrossomal é considerado o evento mais importante para alcançar sucesso na fertilização (BRUCKER; LIPFORD, 1995). Saacke et al. (1998) concluíram que espermatozoides morfologicamente anormais possuem diminuída capacidade de se ligar a zona pelúcida, e sugere-se que proteínas estruturais específicas estão envolvidas em manter o acrossoma intacto (YANAGIMACHI, 1994). Dessa forma infere-se que a exposição ao BPA pode ter alterado essa conformação.

Mohamed et al. (2011) afirmam que o estrogênio tem papel na modulação da produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), composto que tem papel importante na fisiologia espermática. Muitos compostos aumentam a concentração de AMPC, e essa contínua estimulação aparentemente está relacionada à perda acrossomal (ADEOYA-OSIGUWA et al., 2003). Encontrou-se concentração alterada dos hormônios esteroides nos animais tratados, inferindo que pode haver uma interferência nesse mecanismo, resultando na diminuição da integridade dos acrossomas desses animais. Nas análises de funcionalidade considera-se que nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar um maior poder fecundativo, e, para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais (ARRUDA et al., 2011).

Observou-se diminuição na produção e reserva de espermatozoides, com uma passagem mais rápida pelo epidídimo nos animais tratados, indicando que o BPA além de poder provocar uma queda na eficiência da espermatogênese, devido ao menor tempo de maturação dos espermatozoides, ainda os diminui em quantidade. O transporte dos espermatozoides pelo epidídimo é mediado pela contração de músculos lisos que contornam o ducto, e agentes que interferem no

mecanismo de contração podem alterar o transporte (BELLENTANI et al., 2011). Autores afirmam que a baixa concentração de testosterona acelera o transporte de espermatozoides e é essencial para a função dos músculos lisos dos ductos deferentes e epididimários (SUJARIT; PHOLPRAMOOL, 1985), o que pode explicar a baixa concentração e rápido trânsito. Vom Saal, em 1998, demonstrou que o agente BPA administrado a fêmeas grávidas provoca diminuição de 20% da produção espermática na prole, com queda no peso testicular e na concentração sérica de testosterona, demonstrando que o produto causa alterações em várias fases da vida do indivíduo.

A fase final da maturação espermática ocorre durante a passagem pela cabeça e corpo do epidídimo, e a região da cauda tem um importante papel na concentração, proteção e armazenamento de espermatozoides maduros (ROBAIRE; HINT; ORGEBIN-CRIST, 2006; VOM SAAL, 1998). Evidenciou-se epidídimos com epitélio alterado na região da cabeça então pode-se esperar que os espermatozoides formados tenham alguma deficiência de maturação, e, a alteração de peso na região cauda pode estar ligada a baixa concentração dos gametas demonstrada no estudo em questão.

A produção diária e a maturação dos espermatozoides podem ser criticamente dependentes do número de células de sertoli presentes no testículo, e requer um ambiente luminal específico que é mantido pela testosterona. Estas células não se dividem no rato adulto, sendo uma população fixa (COOPER, 1998; ORGEBIN-CRIST, 1996; ORTH, 1982). Se evidenciou-se que a concentração de testosterona está diminuída nos animais tratados, pode-se ligar esse achado a baixa eficiência da espermatogênese.

As células de sertoli estão intimamente ligadas a espermatogênese, e animais expostos ao composto cromo apresentaram atrofia testicular, com alargamento do espaço intracelular e desaparecimento de células de sertoli, com indução da oxidação lipídica e redução da motilidade espermática por afetar a cadeia de fosforilação, essencial para o movimento espermático (JOHNSON; ZANE; PETTY, 1984; MAROUANI et al., 2012; ORTH; GUNSALVS; LAMPERTI, 1988). A diminuição da contagem de espermatozoides pode então ser resultado de uma baixa na

produção de espermatozoides pelos testículos, demonstrada pela diferença na produção diária entre os grupos de animais (GOYAL et al., 2001).

Uma interação entre feromônios e hormônios é necessária para o acasalamento em espécies mamíferas, esses dois estímulos essenciais são transmitidos por mecanismo paralelos, porém separados, no sistema límbico (WOOD, 1997). Os dados de orientação sexual dos animais em estudo evidenciaram uma diminuição da permanência na área próxima a fêmea no grupo tratado com a maior dose de BPA, e levando em conta que Jasarevic et al. (2011) demonstraram que fêmeas na escolha de um companheiro para acasalar tinham preferência por machos que não tinham sofrido exposição ao agente BPA, prevê-se um insucesso reprodutivo.

O número de intromissões seguidos de ejaculações é considerado importante na fertilidade, já que um maior número de ejaculações eleva o número de espermatozoides no canal vaginal, aumentando as chances de fertilização (HULL; WOOD; McKENNA, 2006). Os animais em contato com a maior dose de BPA apresentaram maior tempo de latência para monta e intromissão, e menor número de ejaculações. Schultz et al. (2004) afirmaram que deficiência de testosterona durante a puberdade diminui o número de montas, intromissões e ejaculações, pois a testosterona é essencial para aumentar o desejo sexual de machos maduros e para preparar o macho para responder à uma fêmea receptiva. Li et al. (2010) mostraram que há correlação entre um aumento da concentração urinária de BPA e diminuição do desejo sexual e maior dificuldade de ter ereção. E, corroborando com esses resultados tem-se que a dosagem de testosterona sérica nos animais dos grupos tratados está muito abaixo do grupo controle, sugerindo que o produto diminui a espermatogênese e induz a uma baixa produção espermática por alterar a disponibilidade de testosterona.

Ratos expostos perinatalmente ao inseticida fenvalerato apresentaram uma redução significativa no número de ejaculações em um período de 40 minutos, e um aumento significativo no número total de montas até a ejaculação, com redução da testosterona sérica. Esse tipo de composto desloca ligantes que normalmente interagem com neurotransmissores, como ácido gama-aminobutírico (GABA),

resultando em interferência na transmissão do impulso (MONIZ et al., 1999). Sabendo-se que o comportamento sexual masculino sofre muita influência do neurotransmissor GABA (PAREDES; AGMO, 1992) pode-se questionar se esse é o mecanismo pelo qual o BPA causa diminuição do número de montas e de intromissões, assim como diminuição significativa do número de ejaculações em 30 minutos. Um estudo divulgado em 2011 (BRAUN et al., 2011) demonstrou que a concentração urinária de BPA está relacionada com aumento de ansiedade, depressão e hiperatividade em meninos e meninas abaixo de três anos, e que o BPA está positivamente associado a alteração das reações emocionais e por um comportamento agressivo em meninos, esses dados confirmam a alteração a nível neural que o agente BPA causa nos organismos expostos.

Valores significativamente elevados de estrogênio foram encontrados nos animais tratados, e valores diminuídos dos hormônios LH, FSH e testosterona. O dano causado pelo BPA no eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular não está determinado, a baixa de LH, FSH e testosterona pode ser devido a uma baixa na síntese e secreção, e baixa produção pelas células de Leydig, reduzindo a esteroidogênese (AKINGBEMI et al., 2004). A desregulação endócrina pode ser devido à antagonização ou mimetização dos efeitos dos hormônios naturais; ou por interferência na síntese ou em receptores (BAKER, 2001), mas ainda assim não se encontra explicação para os altos valores de estrogênio, provavelmente provindos da testosterona, pela conversão pela enzima aromatase. Murphy et al. (2006) sugerem que um aumento na expressão da aromatase resulta num aumento da concentração de estradiol com uma baixa concentração na testosterona causando desmasculinização de machos.

Apesar dos hormônios estrogênicos serem considerados principalmente femininos, evidências indicam um importante papel desses regulando funções reprodutivas masculinas. O papel dos estrogênios nos testículos não é completamente entendido, mas sabe-se que ratos deficientes de aromatase se tornam estéreis em um período de um ano, assim como ratos deficientes de receptores de estrógenos (COUSE; KORACH, 1999; LUCONI et al., 2001; ROBERTSON et al., 1999; SMITH et al., 1994; STOCCO; McPHAUL, 2006); e que o excesso de estrogênios pode levar a inibição do mecanismo de feedback sobre o

eixo hipotálamo-hipofise-gonadas (HEJMEJ et al., 2005). Os andrógenos testiculares são necessários para que os órgãos sexuais desenvolvam suas atividades fisiológicas, de promoção da fertilidade e garantia de reprodução (CARVALHO et al., 2002). Nas células, os receptores de andrógenos estão presentes no citosol, e após se ligarem ao hormônio translocam-se para o núcleo e estimulam a transcrição de genes, modulando a resposta do animal aos estímulos ambientais (KELLER; ERSHLER; CHANG, 1996).

A ação dos hormônios sexuais sobre o SNC provoca mudanças definitivas na vida do animal, como é o caso das áreas sexualmente dimórficas, áreas diferentes entre machos e fêmeas em vários aspectos, como forma e arranjo celular das estruturas encefálicas. Tais mudanças podem ocorrer durante um período crítico chamado organizacional, ou sobre animais púberes e adultos (DAMIANI et al., 2005; KELLY, 1991). Essas áreas sexualmente dimórficas são um ponto sensível da exposição ao BPA e estão localizadas principalmente na área pré-óptica do hipotálamo (PERERA et al., 2012). Damiani et al. (2005) demonstraram que lesões de qualquer natureza na área pré-óptica reduz a frequência de cópulas. E sabe-se que exposição ao BPA perinatalmente leva a alterações organizacionais nas vias neuroendócrinas dos núcleos sexualmente dimórficos (HE; PAULE; FERGUSON, 2012). Autores afirmam que a testosterona regula o número de células da área pré-óptica do hipotálamo expressando aromatase no núcleo e que a conversão de testosterona em estradiol pela aromatase neural aparenta ser pré-requisito para uma variedade de efeitos, que inclui ativar o comportamento sexual masculino de ratos adultos (BALTHAZART; FOIDART; HENDRICK, 1990).

Piffer, Garcia e Pereira (2009) demonstraram que machos submetidos a intoxicação perinatal a betametasona e avaliados pelo método da arena, com 90 dias de idade, apresentaram menor tempo total de permanência na zona da fêmea e menor escore de preferência por fêmeas, com diminuída concentração de testosterona e atraso para a primeira ejaculação e menor número total de ejaculações quando comparados a animais controle, sugerindo que houve alteração no eixo de diferenciação dimórfica.

Hormônios esteroides são produzidos principalmente a partir das células de leydig, mas também a partir de uma variedade de tecidos, como o cérebro, e esses hormônios agem por múltiplos mecanismos, controlando processos fisiológicos e comportamentais, incluindo a reprodução (SOMA et al., 2008). Um composto com atividades estrogênicas, a genisteína, demonstra inibir a secreção de testosterona por bloquear os receptores de LH e diminuir a ação das proteínas StAR (HANCOCK et al., 2009). Alteração da expressão da proteína reguladora da esteroidogênese aguda (StAR) por mono-2(etilexil)-ftalato e lindano reduz a esteroidogênese por limitar a transferência do colesterol para o interior da mitocôndria, impedindo que a enzima citocromo P450 clive esse colesterol e dê início à síntese dos hormônios esteróides (SARADHA; VAITHINATHAN; MATHUR, 2008; SVECHNIKOV; SVECHNIKOVA; SÖDER, 2008). Tratamento com triclosan altera a esteroidogênese por diminuir a concentração de AMPc, resultando em menor expressão da proteína StAR (KUMARA; BALOMAJUMDERB; ROYA, 2008). Químicos exógenos podem agir como pseudosubstratos na cadeia de esteroidogênese e gerar ROS, inativando enzimas (QUINN; PAYNE, 1985), mecanismo que pode estar envolvido na toxicidade evidenciada do BPA.

Oshima et al. (2012) demonstraram que embriões de codornas japônicas (*Coturnix japônica*) expostas in ovo ao BPA sofreram feminilização das gônadas, de uma maneira dose independente, alteração essa identificada pela proporção de tecido ovariano. Essa alteração pode ser devida à desregulação induzida pelo produto nos receptores alfa de estrogênios nas gônadas (MATTSSON; BRUNSTRO, 2010), pois já foi demonstrado que o BPA interage nos mecanismos de sinalização estrogênicos por interagir com os receptores de estrógenos (NACIFF, 2002; WETHERILL, 2007), e que o produto interage de forma diferente com os receptores alfa e beta de estrógenos (SAKIMURA et al., 2002). Os resultados obtidos para o BPA podem então ser devido ao desequilíbrio entre testosterona e estradiol.

Nossos resultados deixam evidente uma deficiência na espermatogênese, esteroidogênese, e alteração no comportamento, com suposta desmasculinização.

6 CONCLUSÃO

A Toxicologia endócrina, uma área voltada para o estudo dos xenobióticos, tem atualmente dedicado muita atenção aos efeitos quanto a exposição a desreguladores endócrinos. Esse termo foi instituído e aceito pela comunidade científica em 1991, e definido, em 1995, como agentes externos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo, alterando a homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamento humano (COLBORN; CLEMENT, 1992; KAVLOCK et al., 1996).

Desde então, centenas de químicos poluidores do meio ambiente vem sendo reportados como potenciais alteradores endócrinos, incluindo compostos sintéticos e naturais (KORTENKAMP, 2007; HARRIES et al., 1997), como bifenilas policloradas (LONGNECKER; ROGAN; LUCIER, 1997), pesticidas (MCKINLAY et al., 2008) e químicos industriais como o ubíquo BPA (VANDENBERG et al., 2007). Apesar da dose utilizada nesse trabalho ser acima das doses de exposição humana salienta-se que o BPA está presente em muitos materiais de contato do ser humano, e que durante a vida ocorre a exposição a vários agentes desreguladores endócrinos que vem sendo constantemente acumulados no ambiente.

Com base nos resultados obtidos por esse estudo, nas limitações e condições descritas, conclui-se que o bisfenol A administrado a animais experimentais, por 40 dias, no período pré-adulto causa:

- a) Dificuldade para a evolução do peso corporal;
- b) Alteração no peso relativo de cabeça e cauda de epidídimo;
- c) Diminuição da concentração de espermatozoides;
- d) Diminuição da atividade mitocondrial na peça intermediária do espermatozoide;
- e) Diminuição da integridade de membrana plasmática do espermatozoide e integridade de acrossoma;

- f) Alteração da orientação sexual, por diminuir a preferência por cobaias fêmeas receptivas;
- g) Alteração do comportamento sexual, diminuindo a latência para primeira monta e intromissão, e o número de ejaculações em um período determinado;
- h) Diminuição da produção diária de espermatozoides e baixa na eficiência da espermatogênese;
- i) Diminuição da reserva espermática;
- j) Retardo no trânsito epididimário dos espermatozoides;
- k) Diminuição dos hormônios LH, FSH e testosterona no soro;
- l) Aumento do hormônio estradiol no soro;

A infertilidade masculina é uma síndrome multifatorial que abrange uma grande variedade de desordens, as quais podem ser congênitas ou adquiridas (CARVALHO et al., 2002), durante as últimas décadas a taxa de infertilidade vem aumentando e aproximadamente 10-15% dos casais nos países desenvolvidos são considerados como inférteis (FRITZ, SPEROFF, 2011). Tratando-se das preocupações sobre a ligação entre a exposição a químicos presentes no ambiente e o possível efeito na fertilidade, maiores investigações se fazem necessárias para determinar a real significância e mecanismos para esclarecer a ação desses compostos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOYA-OSIGUWA, S. A.; et al.. 17β -Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. **Human Reproduction**, v.18, p.100-107, 2003.

AKINGBEMI, B. T.; et al.. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat leydig cells. **Endocrinology**, v.145, n.2, p.592-603, 2004.

ANDERSON, O. S; et al.. Epigenetic Responses Following Maternal Dietary Exposure to Physiologically Relevant Levels of Bisphenol A. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.53, n.5, p.334-342, 2012.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **Internacional Journal of Andrology**, v.29, n.1, p.69-75, 2006.

ARRUDA, R. P. et al.. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

BAKER, V. A. Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in vitro**, v.15, p.413-419, 2001.

BALTHAZART, J.; FOIDART, A.; HENDRICK, J. C. The induction by testosterone of aromatase activity in the preoptic area and activation of copulatory behavior, **Physiology and Behavior**, v.47, p.83-94, 1990.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Preparation of semen for morphological examination. In: BARTH, A. D. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, 1989. p.9-12.

BELLENTANI, F. F; et al.. Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. **Journal of Andrology**, v.32, n.6, 2011.

BENCHAIB, M.; et al.. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v.18, n.5, p.1023-1028, 2003.

BHASIN, S.; BENSON, G. S. Male sexual function In: NEILL, J. D. et al.. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Australia: Elsevier, 2006. p.1173-1194.

BONDE, J. P. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. **Asian Journal of Andrology**, v.12, p.152-156, 2010.

BRAUN, J. M.; et al.. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. **Environmental Health Perspectives**, v.117, n.12, p.1945-1952, 2009.

BRAUN, J. M.; et al.. Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. **Pediatrics**, v.128, n.5, 2011.

BROTONS, J.A.; et al.. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. **Environmental Health Perspectives**, v.103, p.608-612, 1995.

BRUCKER, C.; LIPFORD, G.B.. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. **Human Reproduction Update**, v.1, p.51–62, 1995.

BURKIN, H. R.; MILLER, D. J. Zona Pellucida Protein Binding Ability Sperm during Epididymal Maturation and the Acrosome Reaction of Porcine. **Developmental Biology**, v.222, p.99-109, 2000.

CABATON, N. J.; et al.. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. **Environmental Health Perspective**, v.119, n.4, p.547-552, 2011.

CARVALHO, O. F.; et al.. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.1, 2002.

CHEMES, H. E.; RAWE, V. Y. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. **Human Reproduction Update**, v.9, n.5, p.405-428, 2003.

CHITRA, K. C.; LATCHOUMYCANDANE, C.; MATHUR, P. P. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. **Toxicology**, v.185, p. 119-127, 2002.

CHITRA, K. C.; RAO, K. R.; MATHUR, P. P. Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: A histological and biochemical study. **Asian Journal of Andrology**, v. 5, p. 203-208, 2003.

CHIAVEGATTO, S.; BERNARDI, M. M.; SOUZA-SPINOSA, H.: Effects of prenatal diphenhydramine administration on sexual behavior of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.22, p.729–732, 1989.

CHOU, W. C.; et al.. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. **Environmental Health**, v.94, 2011.

COLBORN, T., CLEMENT, C. (Eds.). **Chemical Induced Alterations in Sexual and Functional Development: the Wildlife/Human Connection - Wingspread consensus statement**. Princeton Scientific Publishing: Princeton, 1992. p.1–8.

COLBORN, T.; VOM SAAL, A. M.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and human. **Environmental Health Perspective**, v.101, p.378-84, 1993.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1996. 673p.

COOPER, T. C. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.53, p.119-136, 1998.

COOPER, J. E.; KENDIG, E. L.; BELCHER, S. M. Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. **Chemosphere**, v.85, p.943-947, 2011.

COUSE, J. F.; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocrine Reviews**, v.20, p.358–417, 1999.

DAHLGREN, I. L.; MATUCSZCZYK, J. V.; HARD, E. Sexual orientation in male pregnant rats prenatally exposed to ethanol. **Neurotoxicology and Teratology**, v.13, p.267-269, 1991.

DAMIANI, D; et al.. Sexo Cerebral: Um Caminho Que Começa a Ser Percorrido. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v.49, n.1, p.37-45, 2005.

DIANIN, A. P. Condensation of ketones with phenols. **Zhurnal Russkago Fiziko-Khimicheskago Obschestva** (*Journal of Russian Physical-Chemistry Society*) (in Russian), v.23, p.492, 1891.

DODDS, E.C.; LAWSON, W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. **Nature**, v.137, p.996, 1936.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p.29-77.

EICHENLAUB-RITTER, U.; et al.. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. **Mitochondrion**, v.11, p.783–796, 2011.

FELICIO, L. F.; PALERMO-NETO, J.; NASELLO, A. G.: Perinatal bromopride treatment: Effects on sexual behavior of male and female rats. **Behavioral and Neural Biology**, v.52, p.145–151, 1989.

FISCH, H.; et al.. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. **Fertility and Sterility**, v.65, n.5, p.1009-1014,, 1996.

FRITZ, M. A.; SPEROFF, L. **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. 8ed. Philadelphia: Lippincott Wilkins and Williams, 2011.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e plasma seminal. In:HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Manole, 2004, p. 97-110.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M.. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, São Paulo, v.44, n.4, 2000. il.

GOYAL, H. O. ; et al.. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. **Biology of Reproduction**, v.64, p.927–934, 2001.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado De Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HANCOCK, K. D. ; et al.. Genistein decreases androgen biosynthesis in rat leydig cells by interference with luteinizing hormone-dependent signaling. **Toxicology Letters**, v.184, p.169-175, 2009.

HARDING, S. M.; MCGINNIS, M. Y. Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. **Hormones and Behavior**, v.43, p.327-335, 2003.

HARRIES, J. E.; et al.. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, p.534-542, 1997.

HE, Z.; PAULE, M. G.; FERGUSON, S. A. Low oral doses of bisphenol A increase volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male, but not female, rats at postnatal day 21. **Neurotoxicology and Teratology**, v.34, n.3, p.331-337, 2012.

HEJMEJ, A.; et al.. Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.534-547, 2005.

HERBST, A. L. The effects in the human of diethylstilbestrol (DES) use during pregnancy. **Princess Takamatsu Symposium**, v.18, p.67-75, 1987.

HERRICK, J. R.; SWANSON, W. F. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, n.7, p.1503-1513, 2003.

HETTA, J.; MEYERSON, B.J. Sexual motivation in the male rat. A methodological study of sex-specific orientation and the effects of gonadal hormones. **Acta Physiologica Scandinavica**, Supplementum, v.453, p.1-68, 1978.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **Internacional Journal of Andrology**, v.10, n.6, p.809-828, 1987.

HUC, L.; et al.. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. **Toxicology in vitro**, v.26, n.5, p.709-717, 2012.

HULL, E. M.; WOOD, R. I.; McKENNA, K. E. Neurobiology of Male Sexual Behavior. In: NEILL, J. D. et al.. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Elsevier, 2006, p.1729-1824.

INOUE, K.; et al.. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. **Journal of Chromatography-B: Biomedical Sciences and Applications**, v.749, n.1, p.17-23, 2000.

JANG, Y. J.; et al.. High dose bisphenol A impairs hippocampal neurogenesis in female mice across generations. **Toxicology**, v.296, p.73-82, 2012.

JASAREVIC, E.; et al.. Disruption of adult expression of sexually selected traits by developmental exposure to bisphenol A. **PNAS**, Jun, 2011.

JOHNSON, L.; ZANE, R.S.; PETTY, C.S. Quantification of the human sertoli cell population. Its distribution, relation to germ cell numbers and age related decline. **Biology of Reproduction**, v.31, p.785-795, 1984.

KAVLOCK, R. J.; et al.. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, v.104, p.715-740, 1996.

KELLER, E.T.; ERSHLER, W.B.; CHANG, C.. The androgen receptor: a mediator of diverse responses. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.59–71, 1996.

KELLY, D. Sexual differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural sciences**. New York: Elsevier, 1991. p.959-973.

KIM, M. E.; et al.. Exposure to bisphenol A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.3383-3389, 2011.

KORTENKAMP, A. Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v.11, n.5, 2007.

KUMARA, V.; BALOMAJUMDERB, C.; ROYA, P. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. **Toxicology**, v.250, p.124-131, 2008.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.

LE, H. H.; et al.. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. **Toxicology Letters**, v.176, n.2, p.149-56, 2008.

LEE, S.; et al.. Signaling pathways of bisphenol A – induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor- κ B. **Journal of Neuroscience Research**, v.86, p.2932–2942, 2008.

LENZI, A.; et al.. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-256, 1996.

LI, D.; et al.. Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. **Journal of Andrology**, v.31, n.5, p.500-506, 2010.

LI, Y.; et al.. Semen quality of 1346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China. **Human Reproduction**, v.24, n.2, p.459-469, 2009.

LONGNECKER M. P.; ROGAN W. J.; LUCIER G. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyl-trichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. **Annual Review of Public Health**, v.18, p.211-244, 1997.

LUCONI, M.; et al.. Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.178, p.38-45, 2001.

MAROUANI, N.; et al.. Effects of hexavalent chromium on reproductive functions of male adult rats. **Reproductive Biology**, v.12, n.2, p.119-133, 2012.

MATTSSON, A.; BRUNSTRO, M. B. Effects on differentiation of reproductive organs and sexual behaviour in Japanese quail by excessive embryonic ER α activation. **Reproduction Fertility and Development**, v.22, p.416–425, 2010.

MCKINLAY R.; et al.. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. **Environment International**, v.34, n.2, p.168-183, 2008.

MEEKER, J. D.; et al.. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. **Reproductive Toxicology**, v.30, n.4, p.532-539, 2010.

MITTENDORF, R. Teratogen update: carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. **Teratology**, v.51, n.6, p.435-445, 1995.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v.105, n.1-2, p.104-118, 2008.

MOHAMED, E. A.; et al.. Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm. **Theriogenology**, v. 75, p1161–1169, 2011.

MONIZ, A. C.; et al.. Perinatal Fenvalerate Exposure: Behavioral and Endocrinology Changes in Male Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.21, n.5, p.611–618, 1999.

MORRISSEY, R.E.; GEORGE, J.D.; PRICE, C.J. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.8, n.4, p.571-582, 1987.

MOTULSKY, H. J. Prism 5 Statistics, 2007, **GraphPad Software**. Inc., San Diego CA, www.graphpad.com.

MOURA, C.S.; et al.. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.799-808, 2006.

MURPHY, M. B. ; et al.. Plasma steroid hormone concentrations, aromatase activities and GSI in ranid frogs collected from agricultural and non-agricultural sites in Michigan (USA). **Aquatic Toxicology**, v.77, p.153-166, 2006.

NACIFF, J. M. ; et al.. Gene expression profile induced by 17 α -ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. **Toxicology Science**, v.68, n.1, p.184–199, 2002.

NAGAO, T.; et al.. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. **Reproductive Toxicology**, v.13, n.4, p.303-11, 1999.

NAS – National Academy Science. **Guide for care and use of laboratory animals**. 8 ed. Washington: National Academy Press, 2011. 220p.

NISHINO, T.; et al.. The xenoestrogen bisphenol A in the Hershberger assay: androgen receptor regulation and morphometrical reactions indicate no major effects. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.98, p.155–163, 2006.

O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v.17, p.704-709, 2002.

O'DONNELL, L.; et al.. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Australia: Elsevier, 2006.

ORGBIN-CRIST, M. C. Androgens and epididymal function. In: BHASIN, D.; et al. (eds.), **Pharmacology, Biology, and Clinical Application of Androgens**. New York: Wiley-Liss, 1996. p.27–38.

ORTH, J. M. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The anatomical record**, v.203, p.485-492, 1982.

ORTH, J.M.; GUNSALVS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from sertoli cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on number of sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v.122, p.787-794, 1988.

OSHIMA, A.; et al.. In ovo exposure to nonylphenol and bisphenol a resulted in dose-independent feminization of male gonads in japanese quail (*Coturnix japonica*) embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.31, n.5, p.1091–1097, 2012.

PAREDES, R. G.; AGMO, A. GABA and behavior: The role of receptor subtypes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.16, p.145–170, 1992.

PELTONEN, K.; PUKKILA, J. Determination of bisphenol A in air by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v.439, n.2, p.375-80, 1988.

PERERA, F.; et al.. Prenatal Bisphenol A exposure and child behavior in an Inner-City Cohort. **Environmental Health Perspective**, v.120, p.1190–1194, 2012.

PIFFER, R. C.; GARCIA, P. C.; PEREIRA, O. C. M. Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. **Physiology and Behavior**, v.98, p.163-167, 2009.

PIÑA-GUZMÁN, B; SOLÍS-HEREDIA, M.J.; QUINTANILLA-VEJA, B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.202, p.189– 198, 2005.

PLASTICS EUROPE. **The Plastics Portal**. Disponível em: <<http://www.plasticseurope.org/>>, acesso em 10 de Junho de 2013.

POPE, E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.22, n.1, p.87-95, 1991.

QUINN, P.G.; PAYNE, A.H. Steroid product induced, oxygenmediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in Leydig cell cultures. **Journal of Biology and Chemistry**, v.260, p.2092–2099, 1985.

RAHIMIPOUR, M; et al. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 2013.

RICHTER, C. A.; et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p.199–224, 2007.

ROBAIRE, B; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. The Epididymis. In: NEILL, J. D. et al.. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Australia: Elsevier, 2006, p. 1071-1148.

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, n.1, p.103-107, 1978.

ROBERTSON, K. M.; et al.. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. **Proceeding of The National Academy of Science**, v.96, p.7986–7991, 1999.

SAACKE, R. G; et al.. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single- ovulating cattle? **Theriogenology**, v.50, p.117-128, 1998.

SAKIMURA, M.; et al.. Effect of estradiol and nonylphenol on mRNA expression of estrogen receptors α and β , and cytochrome P450 aromatase in the gonad of chicken embryos. **Journal of Poultry Science**, v.39, p.302–309, 2002.

SANTOS, L. D. **Efeito da exposição perinatal ao herbicida glifosato-roundup na diferenciação sexual e endocrinologia reprodutiva**. Guarapuava, 2011. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2011 il.

SARADHA, B.; VAITHINATHAN, S.; MATHUR, P. P. Single exposure to low dose of lindane causes transient decrease in testicular steroidogenesis in adult male Wistar rats. **Toxicology**, v.244, p.190-197, 2008.

SCHULTZ, K. M.; et al... Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. **Hormones and Behavior**, v.45, p.242–249, 2004.

SHIVA, M.; et al.. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. **Clinical Biochemistry**, v.44, p.319-324, 2011.

SILVA, A.E.D.F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. **Capacidade reprodutiva de touros de corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam**. Campo Grande: Embrapa/CNPGC, 1993. 128p.

SMITH, E. P.; et al.. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. **New England Journal of Medicine**, v.331, p.1056–1061, 1994.

SOMA, K. K.; et al.. Novel mechanisms for neuroendocrine regulation of aggression, **Frontiers of Neuroendocrinology**, v.29, p.476-489, 2008.

STATSOFT, Inc. (2007). **Statistica** (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com

STOCCO, D. M.; McPHAUL, M. J. Physiology of Testicular Steroidogenesis. In: NEILL, J. D. et al. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Australia: Elsevier, 2006, p. 977-1016.

SUJARIT, S; PHOLPRAMOOOL, C. Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.74, p.497-502, 1985.

SVECHNIKOV, C.; SVECHNIKOVA, I.; SÖDER, O. Inhibitory effects of monoethylhexylphthalate on steroidogenesis in immature and adult rat leydig cells in vitro. **Reproductive Toxicology**, v.25, p.485-490, 2008.

TACHIBANA, T.; et al.. Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.3, p.509-14, 2007.

TAKAHASHI, O.; OISHI, S. Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats. **Archives of Toxicology**, v.75, p.42-51, 2001.

TALEVI, R.; et al.. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, n.81, 2013.

THIELE, J.J.; et al.. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v.10, p.110-115, 1995.

TOHEI, A; et al.. Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.3, p.216-221, 2001.

VANDENBERG, J. G. Pheromones and Mammalian Reproduction. In: NEILL, J. D. et al.. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Australia: Elsevier, 2006, p. 2041-2058.

VANDENBERG, L. N.; et al.. Human exposure to bisphenol A (BPA), **Reproductive Toxicology**, v.24, n.2, p.139-177, 2007.

VENDRAMINI, V.; ROBAIRE, B.; MIRAGLIA, S. M. Amifostine–doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. **Reproductive Biology**, p. 1-10, 2012.

VOM SAAL, F. S.; et al.. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. **Toxicology and Industry Health**, v.14, n.1-2, p.239-260, 1998.

VOM SAAL, F. S.; et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. **Reproductive Toxicology**, v.24, n.2, p.131-138, 2007.

WANG, G.; et al.. Endocrine disrupting chemicals in New Orleans surface waters and Mississippi Sound sediments. **Environmental Monitoring**, v.14, n.5, p.1353-1364, 2012.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.871-91, 1995.

WETHERILL, Y. B.; et al.. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. **Reproductive Toxicology**, v.24, n.2, p.178–198, 2007.

WHO. **WHO - laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4^a Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 136p.

WHO. **Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A**. Joint FAO/WHO expert meeting to review toxicological and health aspects of bisphenol A: final report, including report of stakeholder meeting on bisphenol A. Ottawa, Canada, Nov. 2010.

WONG, E. W..P.; CHEGN, C. Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, n.5, 2011.

WOOD, R. I. Thinking about Networks in the Control of Male Hamster Sexual Behavior. **Hormones and Behavior**, v.32, p.40-45, 1997.

YANIGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: NEILL, J. D. et al.. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p.189-317.

8 ANEXOS

Anexo A – Carta de aceite do Comitê de Ética.



Universidade Estadual do Centro-Oeste

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

COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 057/2012 - CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 07 de agosto de 2012

Senhor Pesquisador

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: **“Avaliação espermática em ratos Wistar expostos ao agente Bisfenol A no período pré-púbere”**, parecer 017/2012 foi analisado e considerado APROVADO, pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária no dia 03 de agosto de 2012.

2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao 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 ao CEUA assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa.

– Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao 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 do CEUA.

Pesquisador: Marco Aurélio Romano

Atenciosamente

Prof. Rosilene Rebeca
Presidente do CEUA/UNICENTRO
 Port. 1.983/2011 - GR/UNICENTRO

AO SENHOR: Marco Aurélio Romano
 DEFARM: Departamento de Farmácia
 UNICENTRO

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

Campus Santa Cruz: Rua Pres. Zacarias 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85 015-430 – GUARAPUAVA – PR
 Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85 040-080 – GUARAPUAVA – PR
 Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84 500-000 – IRATI – PR

Anexo B - Diluição do BPA

O produto Bisfenol-A foi preparado da seguinte maneira.

- Dose de 25mg/Kg:

10 g de BPA em 500mL de óleo de milho.

- Dose de 5mg/kg:

2g de BPA em 500mL de óleo de milho.

Anexo C – Soluções para ensaio de avaliação da integridade do DNA.

- TBE 10X: pH 8,00

-108g de Tris base;

-55g de Ácido bórico;

-7,44g de EDTA;

-q.s.p 1L de Água Destilada.

- Agarose Low Melting Point (LMP) a 0,5%
- Agarose Normal Melting Point (NMP) a 1%
- Tampão de lise Estoque: pH 10,00

-146,1 g de NaCl;

-37,22 g de EDTA;

-1,211g de Tris;

-q.s.p 1L de Água Destilada.

NaOH para ajudar a dissolver, pingar gotas e depois ajustar pH.

- Solução de lise de trabalho: pH 10,00

-5mL de DMSO;

-0,3g de DTT;

-500µL de Triton-X;

-q.s.p 50mL de Água Destilada.

- Solução Alcalina: pH 12,1

-625µL de EDTA 200mM (pH10,00);

-125,375mL de H₂O.

Adicionar um pouco de NaOH para ajudar na diluição do EDTA.

- Proteinase K

Acrescentar 0,1mg/mL na solução de lise estoque.