



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA MITHIE OGO

**DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIO DE
RATOS EXPOSTOS AO BISFENOL A DURANTE O
PERÍODO PERIPUBERAL**

Londrina
2015

FERNANDA MITHIE OGO

**DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIO DE
RATOS EXPOSTOS AO BISFENOL A DURANTE O
PERÍODO PERIPUBERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa Dra Glaura Scantamburlo
Alves Fernandes

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O35d Ogo, Fernanda Mithie.

Desenvolvimento testicular e epididimário de ratos expostos ao bisfenol A durante o período peripuberal / Fernanda Mithie Ogo. – Londrina, 2015.
112 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Estrógenos – Teses. 2. Testículos – Teses. 3. Epidídimo – Teses. 4. Aparelho genital masculino – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Fernandes, Glaura Scantamburlo Alves. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

FERNANDA MITHIE OGO

**DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIO DE RATOS
EXPOSTOS AO BISFENOL A DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa Dra Glaura Scantamburlo
Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Flavia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de março de 2015.

DEDICO,

Aos meus pais, Nelson e Márcia, que apesar da imensa distância física, sempe estiveram presentes, apoiando-me e solidificando-me durante esta jornada...

Meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força dada para chegar até o presente momento.

Ao meu namorado André pelo amor, parcerias, colaboração no experimento e principalmente pela paciência que teve em momentos difíceis.

A minha irmã e amiga Marcela, ao meu cunhado Alexandre e a minha tia Ilma pelo apoio, conselhos, e por compartilharem comigo momentos de tristezas e também de alegrias. Aos meus sobrinhos Gabriel e Beatriz que mesmo não entendendo muita coisa me proporcionam muitas alegrias. E também a minha sogra Regina pelo apoio, e por me ajudar em muitos momentos em que precisei.

Aos meus avós Emiko, Takashi, Áurea e Antônio, que mesmo timidamente sempre estiveram presentes ajudando e torcendo para a concretização de mais uma etapa.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Glauro Scantamburlo Alves Fernandes por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientada, pelos ensinamentos científicos, apoio, confiança, e por mostrar a importância de se abrir os horizontes no estudo, aqui ficam meus eternos agradecimentos.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina por me proporcionarem o espaço, a experiência e as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Agradeço também às parcerias com o Prof.Dr. Wellerson Rodrigo Scarano - UNESP, Prof. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci- USP, Prof. Dra. Flávia Alessandra Guarnier – UEL, que muito colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro na forma de bolsa.

As minhas amigas Paola Cavalin, Soraia El Kadri, Fernanda Fugiwara, pela maravilhosa amizade, momentos de alegria e apoio eterno. As minhas amigas(os) do laboratório de Toxicologia e distúrbios metabólicos da reprodução Glaucia, Aline, Henrique e Géssica pela amizade e paciência que tiveram para me ensinar tudo que sei no laboratório, e também pelas excelentes conversas que nos distraíram em momentos difíceis. E a todas as outras pessoas que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja pela amizade ou pelos conhecimentos proporcionados.

“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

Clarice Lispector

OGO, Fernanda Mithie. **Desenvolvimento testicular e epididimário de ratos expostos ao bisfenol A durante o período peripuberal**. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O Bisfenol A (BPA) é um estrógeno não esteroidal sintético muito utilizado em indústrias para produção de produtos plásticos, podendo ser liberado por descargas residuais dessas indústrias e desta forma contaminando o ambiente. A exposição ao BPA pode causar alterações no sistema endócrino humano e animal em diferentes fases da vida. A peripuberdade é uma fase onde ocorrem importantes modificações entre elas a maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular e o término do desenvolvimento de órgãos reprodutores como os testículos e epidídimos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do bisfenol A sobre o desenvolvimento do testículo e epidídimo durante o período peripuberal. Para isso ratos machos com 36 DPN foram pesados e distribuídos em três grupos experimentais: dois grupos foram tratados com BPA (20µg/Kg ou 200 µg/Kg) diluído em óleo de milho e DMSO 1%, e o terceiro grupo, o controle, recebeu apenas os veículos. Todos os animais foram tratados durante 30 dias consecutivos via gavage. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. No 31º dia experimental os ratos (67DPN) foram anestesiados com associação de xilazina e quetamina, pesados e anestesiados e mortos por punção cardíaca. O sangue coletado foi utilizado para determinação dos níveis hormonais plasmáticos de testosterona e LH. Os testículos foram retirados, pesados e utilizados para contagem espermática, determinação de biomarcadores de estresse oxidativo, parâmetros histopatológicos e morfométricos, bem como imunohistoquímica para ki-67. Espermatozoides do ducto deferente foram utilizados para avaliação da morfologia espermática. Os epidídimos foram retirados, pesados, subdivididos em suas porções cabeça-corpo e cauda e utilizados para avaliação do perfil inflamatório (atividade de mieloperoxidase - MPO e de N-acetilglicosamidase – NAG), quantificação do ânion superóxido e níveis de malondialdeído (MDA), contagem espermática, parâmetros histopatológicos e estereológicos, e imunohistoquímica para IL-6. Nos testículos a contagem espermática, estresse oxidativo e parâmetros hormonais não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Em relação à histopatologia testicular os grupos tratados com BPA aumentaram significativamente o número de túbulos seminíferos anormais. A análise da morfologia espermática revelou um aumento estatisticamente significativo no número de espermatozoides anormais em relação ao grupo controle, incluindo alterações como cabeça sem curvatura característica e cauda isolada, além disso mostrou um aumento na altura do epitélio seminífero e maior marcação imunohistoquímica para ki-67 quando expostos à maior dose de BPA. Em relação ao epidídimo, a exposição ao BPA não alterou a contagem espermática e trânsito espermático, níveis de ânion superóxido e MDA em ambas as porções avaliadas. Porém, BPA provocou alterações na estereologia, com um aumento no epitélio e no lúmen na região da cabeça e uma diminuição no lúmen na cauda e infiltrado inflamatório na dose de 200 µg/Kg de BPA. Além disso, a atividade de MPO, nas regiões cabeça-corpo e cauda dos epidídimos revelou aumento significativo com a dose de 200 µg/Kg, enquanto o NAG não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que o BPA, em ambas as doses, afeta o desenvolvimento testicular e epididimário de ratos peripuberais..

Palavras-chave: Bisphenol A. Testículo. Epidídimo. Peripuberdade. Rato macho.

OGO, Fernanda Mithie. **Epididymal and testicular development in rats exposed to bisphenol A during the period peribuberal**. 2015. p. 111. Master's thesis (Master in Experimental Pathology) – Universidade Estadual Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a synthetic nonsteroidal estrogen widely used in industries for the production of plastic products, can be released by waste discharges of these industries and thus contaminating the environment. Exposure to BPA can cause changes in the human endocrine system and animals at different stages of life. The peripuberdade is a stage where there are major changes including the maturation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis and the end of the development of reproductive organs such as the testis and epididymis. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of bisphenol A on the development of testis and epididymis during peripuberal period. For this PND 36 male rats were weighed and divided into three groups: two groups treated with BPA (20µg/kg or 200µg/kg) diluted in corn oil and 1% DMSO, and the third group, control, received only the vehicle. All animals were treated during 30 consecutive days via oral gavage. Feed and water were provided ad libitum. After 31 day experimental rats (67DPN) were anesthetized with ketamine and xylazine association, weighed and anesthetized and killed by cardiac puncture. The collected blood was used for determination of plasma hormone levels of testosterone and LH. The testes were removed, weighed and used for sperm count, determination of biomarkers of oxidative stress, histopathological and morphometric parameters and immunohistochemistry for Ki-67. Vas deferens sperm were used for evaluation of sperm morphology. The epididymis were removed, weighed, divided into portions thereof caput-corporis and cauda and used to assess the inflammatory status (myeloperoxidase activity - MPO and N-acetylglucosaminidase - NAG), quantification of superoxide anion and levels of malondialdehyde (MDA), sperm count, histological and stereological parameters, and immunohistochemistry for IL-6. Testicular sperm count, oxidative stress and hormonal parameters showed no statistical differences between the experimental groups. In relation to histopathology testicular BPA treated groups significantly increased the number of abnormal seminiferous tubules. The analysis of sperm morphology showed a statistically significant increase in the number of abnormal sperm in the control group, including changes as head without bending characteristic and isolated tail also showed an increase in height of the seminiferous epithelium and stronger staining for Ki-67 when exposed to higher dose of BPA. In relation to the epididymis, BPA exposure did not alter the sperm count and sperm transit, anion superoxide and MDA levels in both evaluated portions. However, BPA caused changes in stereology, with an increase in the epithelium and in the lumen in the caput/corporis a decrease in lumen tail and inflammatory infiltrate in the dose of 200µg/kg of BPA. Additionally, the MPO activity in the regions caput/corporis and cauda of epididymis revealed a significant increase with a dose of 200µg/kg, while the NAG was no significant difference between experimental groups. According to the obtained results it is concluded that BPA, at both doses, affects the epididymal and testicular development in mice peripubertal.

Keywords: Bisphenol A. Testis. Epididymis. Peripuberdade. Male rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Sistema reprodutor masculino: testículo, epidídimo e ducto deferente02
- Figura 2** – Estruturação do testículo e espermatogênese03

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	Proteína de ligação aos andrógenos
AR	Receptor de andrógeno
BPA	Bisfenol A
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ER α	Receptor de estrógeno α
ER β	Receptor de estrógeno β
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
LH	Hormônio Luteinizante
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetyl-b-D-glicosaminidase
Th	Células T helper
USEPA	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Sistema Genital Masculino.....	01
1.2	Desenvolvimento pós natal do sistema genital masculino	06
1.3	Contaminação ambiental.....	08
1.4	Desreguladores Endócrinos	09
1.5	Bisfenol A	10
1.6	Bisfenol A e sistema genital masculino	13
1.7	Estresse oxidativo e BPA.....	16
1.8	Inflamação e sistema genital masculino.....	18
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	22
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
5	ARTIGO 1 – Low doses of bisphenol can impair postnatal testicular development directly, without affecting hormonal levels or oxidative stress.....	38
6	ARTIGO 2 – Bisphenol A exposure altered postnatal developmental of the epididymis in peripubertal rats in association with inflammation.....	78
7	CONCLUSÃO final	112

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Genital Masculino

O sistema reprodutor masculino de mamíferos é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias como próstata e vesícula seminal, e órgão copulador. Estes órgãos são andrógeno-dependentes, ou seja, dependem da ação dos hormônios testosterona e diidrotestosterona (DHT) tanto para seu desenvolvimento como para manutenção de sua morfologia e função na vida adulta. A literatura mostra que nos epidídimos, próstata, vesícula seminal e muitos outros tecidos que respondem aos andrógenos como, a pele, a testosterona é convertida em DHT pela enzima 5 α -redutase (ROBAIRE; HERNDERSON, 2006). Segundo Blanchard e Robaire (1997) a DHT tem maior afinidade com receptores de andrógenos que a testosterona. Os testículos situados fora da cavidade abdominal, na bolsa escrotal, onde são mantidos a uma temperatura entre 35°C e 36°C, ou seja, a 1°C a 2°C abaixo da temperatura corpórea. Isso ocorre pela disposição em contra corrente das artérias e das veias testiculares, facilitando a troca de calor, propiciando a manutenção da função testicular como espermatogênese e esteroidogênese (COSTANZO, 2005).

No adulto, as gônadas masculinas estão envolvidas por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea (RODRIGUES; FAVARETTO, 1999). A túnica albugínea é espessa na região anterior do órgão, formando o mediastino do qual partem densos septos fibrosos em sentido radial dividindo o parênquima testicular em lóbulos piramidais e lóbulos dos testículos que são ocupados pelos túbulos seminíferos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Figura 1).

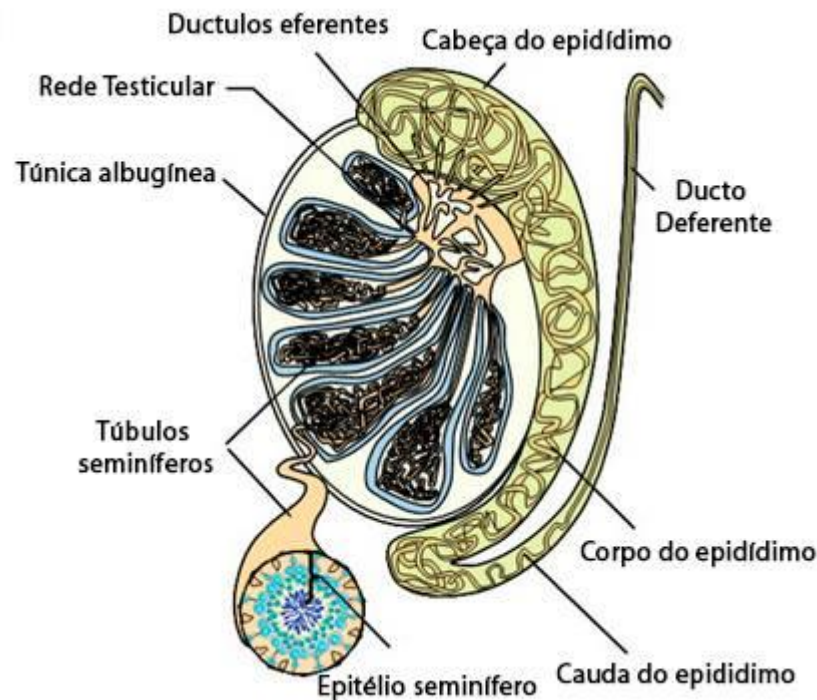


Figura1. Testículo, epidídimo e ducto deferente (LAGARRIGUE et al., 2011, adaptado pelo autor).

Os testículos são constituídos por tecido intersticial e túbulos seminíferos que possuem suas principais funções: espermatogênese e esteroidogênese, respectivamente (RODRIGUES; FAVARETTO, 1999). As células de Leydig são responsáveis pela produção de cerca de 95% da testosterona do organismo, além de serem fonte para uma variedade de outros esteroides (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; RUSSEL *et al.*, 1990). O restante da testosterona é formada pela redução do grupamento C-17-ceto da androstenediona, produzida pela zona reticular da glândula adrenal (GUYTON, 2002). A testosterona tem efeitos parácrinos nos testículos, reforçando a ação espermatogênica do FSH (Hormônio folículo estimulante) (COSTANZO, 2005).

Os túbulos seminíferos apresentam um epitélio germinativo formado por células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) apoiado no tecido peritubular de revestimento (CLERMONT, 1972). As células de Sertoli presentes no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos interagem morfológica e quimicamente com as células germinativas em todas as fases do desenvolvimento. Desempenhando várias funções importantes: sustentação para células germinativas, secreção (inibina, activina e a proteína de ligação aos andrógenos - ABP), fagocitose de restos celulares e do excesso de citoplasma das espermátides durante a espermiogênese, nutrição das células germinativas, barreiras imunológicas, secreção de solução aquosa rica em proteínas, íons e

fatores de crescimento que atuam de forma parácrina nas células germinativas (SKINNER, 2005b), e a compartimentação dos túbulos seminíferos através da barreira hematotesticular (junções oclusivas) que cria um microambiente específico para o desenvolvimento das células germinativas protegendo os tipos celulares em estágios mais avançados de diferenciação (COSTANZO, 2005).

As células espermatogênicas sofrem o processo constante de proliferação, composto por células em várias fases de um complexo processo de diferenciação, a espermatogênese (ROSS *et al.*, 1993). Em humanos a espermatogênese em média tem duração de 70 dias, passando por 6 estágios em cada ciclo. Por outro lado no rato o processo de transformação gradual de células germinativas em espermatozoides tem uma duração de 52-53 dias, porém possui 14 estágios em cada ciclo (CLERMONT, 1972) sendo dividida em três fases: a fase proliferativa, a fase meiótica e a espermiogênese (Figura 2) (CLERMONT, 1972; RUSSEL *et al.*, 1990).

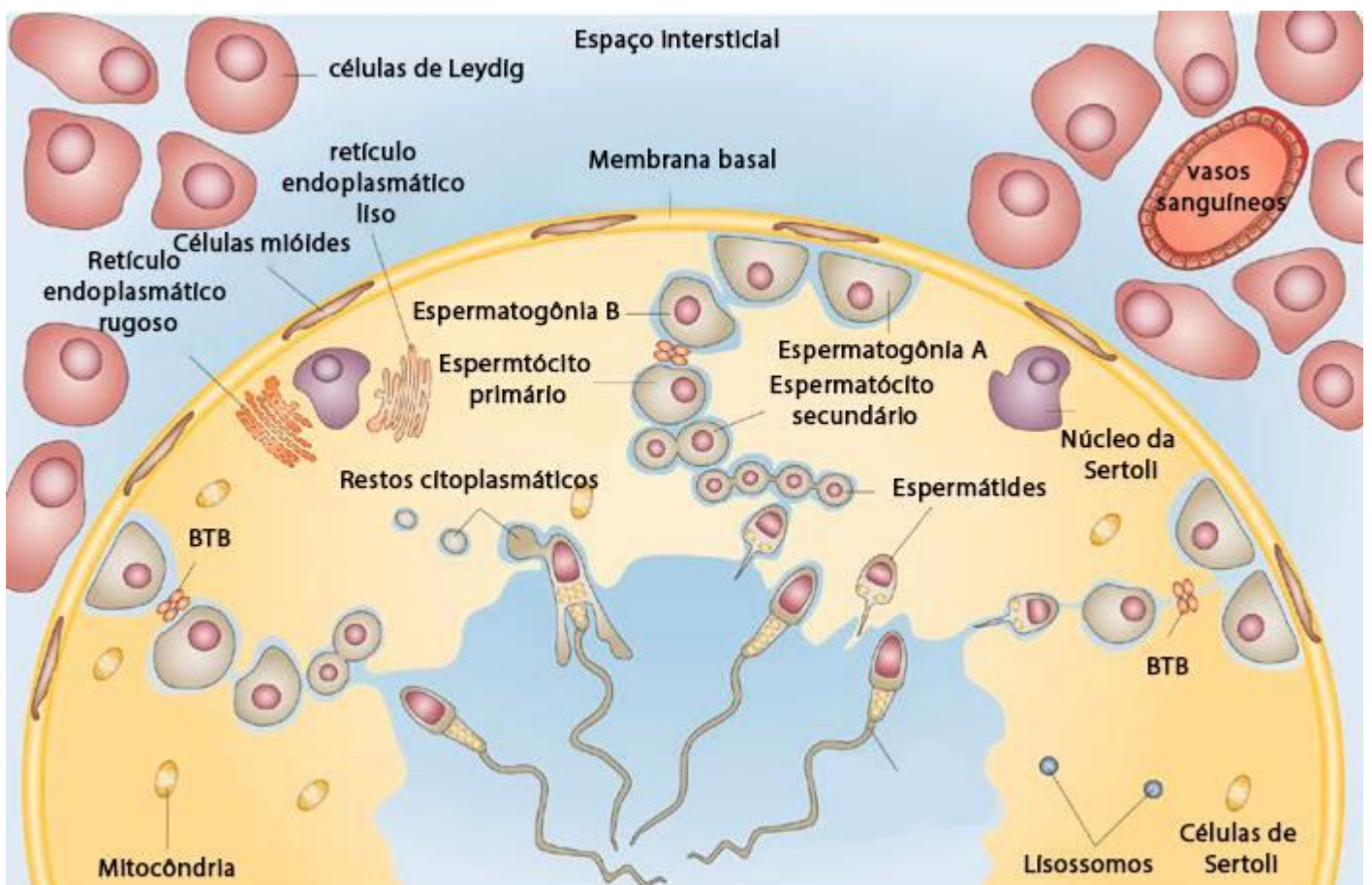


Figura 2. Estruturação do testículo e espermatogênese. O epitélio seminífero é composto por células de Sertoli e células germinativas em desenvolvimento em seus diferentes estágios. Células de leydig e vasos sanguíneos são localizados no interstício. A espermatogênese é a divisão celular e transformação que produz células germinativas haploides a partir de células diploides. Continuamente a produção de espermatozoides é dependente de vários fatores intrínsecos (células de Sertoli e células germinativas) e fatores extrínsecos (hormônios). As

células de Sertoli se aderem à membrana basal, onde as espermatogônias também estão aderentes. Espermatogônias do tipo A sofrem a divisão e se desenvolvem em espermatogônias tipo B, que entram prófase meiótica e se diferenciam em espermatócitos primários que sofrem a meiose I para separar os pares de cromossomos homólogos e formar os espermatócitos secundários haplóides. A meiose II produz quatro espermátides que migram em direção à luz, onde os espermatozóides são totalmente formados e finalmente lançados. Abreviatura: BTB, a barreira hemato-testicular (RATO et al., 2012, adaptado pelo autor)

No rato, na fase mitótica da espermatogênese, as células-tronco espermatogoniais (espermatogônias do tipo A isolada – As) sofrem proliferação para aumentar a população de espermatozóides, dando origem a diferentes classes de espermatogônias [tipo A proliferativa (A pareada – A_{pr} e A alinhada – A_{al}), tipo A diferenciada (A₁, A₂, A₃, A₄), tipo intermediário e tipo B]. As espermatogônias diferenciadas formam os espermatócitos primários (RUSSEL *et al.*, 1990).

O processo de espermatogênese é regulado por hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular. Hormônios liberados pela adenohipófise, o FSH e o LH (Hormônio luteinizante), têm a sua produção induzida através da liberação de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina) pelo hipotálamo. O FSH age sobre as células de Leydig estimulando a formação de receptores de LH, além disso estimula a espermatogênese atuando sobre as espermatogônias produzindo uma onda ao longo do túbulo seminífero de estágios sucessivos da espermatogênese. O LH induz a produção de testosterona pelas células de Leydig. Este importante hormônio juntamente com o FSH induz a produção de proteínas específicas das células de Sertoli, que regulam a diferenciação de espermatócitos e espermátides. Sendo assim, qualquer fator que atue sobre esse eixo podem refletir em alterações no sistema reprodutor masculino, podendo ainda levar a infertilidade do indivíduo (SOKOL, 1997).

Hormônios esteróides exercem papéis essenciais em muitos processos biológicos, incluindo a capacidade reprodutiva. O estradiol e a testosterona regulam o crescimento, além de participar na manutenção e funções dos tecidos reprodutores. A biossíntese dos andrógenos testiculares é mediada pelas enzimas esteroidogênicas do citocromo P450 que incluem CYP11A1 mitocondrial, CYP19A1, CYP17A1 mitocondrial e enzimas oxiredutoras incluindo 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase e 17 β -hidroxi esteroide desidrogenase (HSD3B e HSD17B respectivamente); estas estão localizadas nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático liso nas células de Leydig (PAYNE; HALES, 2004). (SONDERFAN, 1989; OTTO; BHATTACHARYYA; JEFCOATE, 1992; RYAN *et al.*, 1993; JIANG *et al.*, 1998).

O epidídimo é composto por um ducto único e enovelado, o ducto epididimário, que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (COSENTINO; COKETT, 1986). Sua morfologia consiste em cabeça no qual possui uma região inicial, o segmento inicial, o corpo e a cauda (CONSENTINO; COKETT, 1986). Cada porção do epidídimo são designadas de acordo com a altura do epitélio e a distribuição e quantidade dos tipos celulares (REID; CLEAND, 1957). O epitélio é do tipo pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios é composto por seis tipos celulares: basais, principais, estreitas, halo, claras e apicais (HERMO; ROBAIRE, 2002). Além disso, há uma camada de músculo liso que envolve esse epitélio epididimário, apresentando-se mais fina na região da cabeça e do corpo, e mais espessa na cauda. Essas fibras recebem inervação de fibras adrenérgicas do sistema nervoso simpático e sofrem contração (SETCHELL, 2002), que é importante para definir o trânsito espermático e a expulsão dos espermatozoides da região da cauda para o ducto deferente. Além de participar do trânsito espermático o epidídimo também faz a proteção, a maturação e a estocagem dos gametas (HERMO; ROBAIRE, 2002).

Os espermatozoides provenientes dos testículos possuem morfologia especializada, porém ainda não possuem a atividade móvel e não são capazes de fecundar o ovócito II (HERMO; ROBAIRE, 2002). Essas características são adquiridas somente nas diferentes regiões do ducto epididimário durante a maturação, na qual ocorre intensa remodelação na membrana dos espermatozoides, onde as proteínas de origem testicular são removidas ou modificadas quanto à localização e expressão, e proteínas epididimárias são secretadas e absorvidas pela membrana espermática ou podem apenas interagir com o gameta, dando-lhe a capacidade funcional (KLINEFELTER et al., 1997; BARRIOS; FERNANDÉZ-JUAN; MURINO-BLANC., 2005). Todas as atividades do epidídimo são dependentes da ação de andrógenos (EZER; ROBAIRE, 2002). Porém este também pode sofrer ação de interferentes endócrinos que mimetizam o estrógeno, com a ação da resposta biológica normal semelhante à ação natural do estrógeno, uma vez que no desenvolvimento pós-natal dos epidídimos, os receptores de estrógeno ER α e ER β exercem um importante papel (ZAYA et al., 2012).

O ducto deferente apresenta um lúmen estreito e uma espessa camada de músculo liso que sofre fortes contrações peristálticas, participando assim da expulsão do sêmen durante a ejaculação. Desta forma está relacionado com o transporte e término do processo de maturação dos espermatozoides (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Este ducto liga o epidídimo à uretra prostática. A região que antecede a próstata, se dilata formando uma

região chamada de ampola. Assim, o ducto que penetra na próstata é chamado de ducto ejaculatório (HASCHEK; ROUSSEAUX, 1998).

1.2 Desenvolvimento pós natal do sistema genital masculino

O desenvolvimento normal do sistema reprodutor masculino pode ser dividido em cinco fases: pré-natal, neonatal, infantil, puberdade e adulto (SHARPE, 2010). Todas as fases são reguladas por mecanismos relacionados com estados hormonais e genéticos do organismo (DAMGAARD *et al.*, 2002).

A reprodução masculina envolve processos complexos e delicados, que são dependentes do desenvolvimento normal durante o período fetal, durante o crescimento e na puberdade. Interferência na função de hormônios sexuais durante estas fases podem ter repercussões ao longo da vida adulta (JENSEN *et al.*, 2000). Biologicamente, a puberdade é definida como o tempo em que a primeira espermatogênese completa todo o ciclo, e a entrada dos espermatozoides no epidídimo, que ocorre em torno de 50 dias pós-natal em ratos Wistars (KLINEFELTER *et al.*, 1997).

Embora alguns autores relatam que a fase peripuberal pode ser considerada um período “calmamente ativo” do testículo, até a puberdade ativa, isto não é completamente verdade, pois nesta fase ocorre importantes eventos tais como, uma leve redução na proliferação e desenvolvimento das células germinativas, e um aumento nos níveis de testosterona e proliferação de células de Sertoli (SHARPE, 2010).

A exposição a um ou mais desreguladores endócrinos para o sistema reprodutor masculino pode se dar em diferentes fases do desenvolvimento humano ou animal. Pode ocorrer tanto na fase pré-natal como pós-natal, incluindo a vida adulta. Na fase pós-natal, a puberdade representa um evento dinâmico e complexo do desenvolvimento sexual, que envolve mudanças físicas, comportamentais e hormonais, através das quais a maturação sexual ocorre e a capacidade reprodutiva é obtida (GOLUB *et al.*, 2008). Estas mudanças são estabelecidas devido à ocorrência de uma série de eventos que resulta na maturação do eixo hipotalâmico hipofisário-gonadal e conseqüentemente ao início do ciclo reprodutivo da espécie (OJEDA; URBANSKI, 1994). Durante a puberdade ocorrem mudanças no perfil hormonal, especificamente na síntese e secreção de esteroides em resposta ao aumento da pulsatilidade do GnRH e ao aumento da síntese e secreção de LH e FSH (OJEDA; URBANSKI, 1994).

Ainda não são totalmente compreendidos os mecanismos que regem o início da puberdade no rato macho, porém já existem relações entre os elementos do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que iniciam a sua interação nas primeiras semanas de vida pós-natal (ROBB *et al.*, 1978). O desenvolvimento pós-natal tem sido classificado em quatro fases: neonatal (dia pós-natal – DPN 1 – 7), Infantil (DPN 8-21), juvenil (DPN 22-35), peripuberal (DPN 36 – 55 ou 65) e adulto, onde atinge sua maturidade sexual (OJEDA *et al.*, 1980). As primeiras espermátides maduras são encontradas aos 40 dias pós-natal no testículo, enquanto nos epidídimos os espermatozoides são observados apenas aos 50 dias. Com base nestes relatos, o rato macho pode atingir a puberdade por volta de 50 dias de idade (ROBB *et al.*, 1978). O peso testicular tem um rápido crescimento durante o período peripuberal pelo aumento nos números de receptores FSH nas células de Sertoli, sendo estes aumentos nos 10-20 DPN até 35-60 DPN (MAEDA; OHKURA; TSUKAMURA, 2000).

A diferenciação das funções de regiões específicas do epidídimo são feitas durante o período de desenvolvimento pós-natal do órgão, desde o dia pós natal (DPN) 15 ao 44 sob influência de andrógenos. Os compartimentos epididimários fornecem um ambiente único para o processo sequencial de maturação espermática (TURNER *et al.*, 2003). Durante o desenvolvimento pós-natal esses segmentos são estabelecidos, incluindo um período de não diferenciação, uma fase de diferenciação e um período de expansão (SUN; FLICKINGER, 1979). Sendo a fase de diferenciação considerada um importante período, pois nela o epidídimo sofre importantes modificações em sua morfologia, função e expressão das proteínas, resultando na segmentação do ducto epididimário (RODRIGUEZ; KIRBY; HINTON, 2002). É neste período que os andrógenos endógenos exercem seus efeitos através da ligação ao receptor de andrógenos (AR), e esta ligação ativa o fator de transcrição resultando no controle da transcrição do gene andrógeno-responsivo em células alvo (PATRAO; SILVA; AVELLAR, 2009). A produção de espermatozoides por grama de testículo aumenta até 75 DPN, e as reservas de espermatozoides na cauda do epidídimo ocorre em torno de 100 DPN (KLINEFELTER *et al.*, 1997).

Dados na literatura mostram que a deficiência de andrógenos provoca a redução do número de AR e da atividade da 5 α -redutase, induzindo uma onda de morte celular por apoptose no epidídimo (ROBAIRE *et al.*, 1977). Ratos machos quando submetidos a um antiandrogênico no período peripuberal, mostraram uma diminuição da qualidade espermática e do potencial de fertilidade, sugerindo uma deficiência persistente na função epididimária e competência reprodutiva na idade adulta (PEROBELI *et al.*, 2011).

Durante a peripuberdade a espermatogênese e a esteroidogênese ainda não estão totalmente estabelecidas. Desta forma, alguns autores mostram que a peripuberdade/puberdade pode ser uma fase crítica do desenvolvimento reprodutivo e conseqüentemente mais suscetível a ação de agentes tóxicos (JOHNSON *et al.*, 1997; ROGAN; RAGAN, 2007; FREDERIKSEN, *et al.*, 2012; MANTOVANI; FUCIC, 2013).

1.3 Contaminação ambiental

Durante décadas o ar, o solo e as águas recebem toneladas de perigosos resíduos industriais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos halogenados e metais pesados. Nas últimas décadas, alguns compostos sintéticos vêm sendo utilizados em larga escala para aplicações industriais, comerciais e domésticas, sendo uma parte destes compostos liberados em meio aquático (SCHIAVINI *et al.*, 2011).

A rápida urbanização e a expansão das grandes cidades vêm auxiliando na deteriorização das condições de água doce. O fluxo dos rios é considerado um recurso renovável que fornece benefícios para os seres humanos, o que inclui água potável, processos industriais, irrigação, navegação, recreação, e energia elétrica (JACKSON *et al.*, 2001). Esta condição reduz a qualidade de água e a biodiversidade aquática (BURGMER *et al.*, 2007).

Muitas destas substâncias acumulam-se no solo e no sedimento de rios, e são facilmente transportadas a longas distâncias pela atmosfera (MEYER *et al.*, 1999). Segundo Cajaraville *et al.* (2000) os níveis de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vêm crescendo de forma alarmante como resultado da atividade urbana do ser humano, contribuindo cada vez mais para a redução da qualidade ambiental e comprometendo a saúde dos seres vivos habitantes deste ecossistema. Neste contexto, têm sido demonstrado que várias substâncias químicas presentes na poluição ambiental podem causar danos à saúde de homens e animais e podem também interferir na síntese, secreção, metabolismo ou ações hormonais, sendo por isso conhecido como desreguladores endócrinos (PAUGARTTEN, 2003).

Essa substância têm o potencial para promover alterações no sistema endócrino humano (WAISSMANN, 2002) e desta forma podem desregular a reprodução e desenvolvimento dos animais resultando no desenvolvimento sexual anormal e redução de fertilidade masculina (FERREIRA, 2008). Dentre essas substâncias, o Bisfenol A (BPA) é utilizado na produção de plásticos e contamina o ambiente como resultado do processo de lixiviação dos produtos manufaturados. Está presente no ar, água, solo e sedimento

(BESERRA *et al.*, 2012). Este composto apresenta uma solubilidade em água moderadamente elevada e o valor do seu coeficiente de partição octanol-água permite assumir que esta substância está preponderadamente absorvida na matéria orgânica. Desta forma, seu transporte no ambiente aquático constitui a maior rota de distribuição para os outros compartimentos ambientais uma vez que a principal fonte de BPA no meio aquático provém de descargas de efluentes das fabricas (LEE *et al.*, 2013a). Contudo, o BPA pode vir a ser degradado biologicamente com velocidades bastante diferenciadas, quando presentes no solo o tempo de meia-vida varia entre 1 a 180 dias, sendo que em meio aquático seu tempo de meia-vida varia entre 2,5 a 4 dias. (BIRKETT, LESTER, 2003).

Em julho de 2012 a FDA (*Food and Drug Administration*), alterou os regulamentos para não prever a utilização de resinas de policarbonato à base de BPA em mamadeiras e copinhos, e em 2013 alterou os regulamentos para prevenir a utilização de resinas epóxi à base de BPA como revestimentos em embalagens de fórmula infantil. Em 2008, no Brasil, a Agência Nacional de vigilância sanitária (ANVISA), pela Resolução RDC nº17 determina o valor de limite de migração máximo de BPA permitido em embalagens e bebidas de 0,6mg/kg e em janeiro de 2012 foi proibida a importação e fabricação de mamadeiras que contenham o BPA por meio da resolução RDC n. 41/2011, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários deste produto. Contudo, esta proibição não é mundial e muitos países ainda utilizam o BPA em larga escala.

1.4 Desreguladores Endócrinos

A definição para o termo desreguladores endócrinos ainda não é consensual. Desregulador endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, reserva, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do organismo responsáveis pela regulação da homeostase e dos processos de desenvolvimento (KAVOLOCK *et al.*, 1996), ou seja, tem a capacidade de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de homens e animais, podendo ser de origem antrópica ou natural (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Outros autores consideram os desreguladores endócrinos como substâncias que interagem com sítios de receptores de hormônios, porém outros autores considerem como qualquer substância que cause um desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino. Atuando ou não no sítio receptor (BILA; DEZOTTI, 2007).

Considerando a diversidade de hábitos e culturas ao redor do mundo, tem sido observado um aumento na infertilidade masculina constituindo um fenômeno mundial (PASQUALOTTO *et al.*, 2003). Desta forma autores reportam que a maioria dos efeitos exercidos na função reprodutiva ocorre após a perturbação de processos mediados por andrógenos ou estrógenos. Alguns estudos mostram que nas últimas décadas o aumento da exposição à estas substâncias, tem sido proposta como o mecanismo para redução da função reprodutiva masculina e contagens de espermatozoides em humanos (ANDERSSON *et al.*, 2008, SAFE, 2012).

As alterações causadas por desreguladores endócrinos podem ser temporárias ou permanentes, e podem causar anomalias reprodutivas como: disfunção gonadal morfológica e funcional (WAISSMANN, 2002), redução na concentração e qualidade dos espermatozoides (PFLIEGER-BRUSS *et al.*, 2004) e alta incidência de criptorquidia e hipospadia (MELNICK, 1999).

A exposição a esses desreguladores endócrinos podem modificar o metabolismo hormonal, alterando a síntese ou a desagregação da testosterona, FSH, LH ou outros hormônios (SAIYED *et al.*, 2003).

1.5 Bisfenol A

Em 1930, os cientistas descobriram o Bisfenol A (BPA, 4,4'-di-hidroxi-2,2-difenilpropano) como um estrogênio artificial, e foi utilizado para estimular o crescimento rápido de gados e aves, com a finalidade de gerar um maior lucro na agroindústria. O BPA também foi utilizado como uma reposição de estrogênio para mulheres, antes de ser substituídos por dietilestilbestrol (DES) (BEN-JONATHAN; STEINMETZ, 1998). Os mesmos autores mostraram *in vivo* que BPA e DES são semelhantes na sua estrutura, ações e metabolismo e também que o BPA aumenta a liberação de prolactina e o crescimento mamário (BEN-JONATHAN; STEINMETZ, 1998).

O monômero de plástico e plastificante bisfenol A é um dos componentes mais importantes em muitos processos industriais, sendo uma das principais substâncias químicas produzidos no mundo (BURRIDGE, 2003). Para muitos autores, o bisfenol A é uma das mais potentes substâncias perturbadoras endócrinas (MAFFINI *et al.*, 2006).

BPA é usado para produção de resinas de policarbonato de plástico e epóxi, surgindo assim um composto transparente, leve, forte e, ao mesmo tempo duradouro, o que deu maior resistência evitando-se rachaduras. O policarbonato é utilizado na produção de uma

grande variedade de produtos comuns, incluindo brinquedos, embalagens de alimentos e bebidas reutilizáveis como mamadeiras e recipientes de bebidas, também em lentes de óculos, produtos odontológicos, equipamentos elétricos e eletrônicos, mídia digital (CDs e DVDs) e equipamentos de segurança para esportes. A resina epóxi é obtida comercialmente a partir da reação do BPA: 2,2'bis (4-hidroxifenil) propano com (1-cloro-2,3-epoxi-propano) na presença de hidróxido de sódio obtendo éter diglicídico conhecido como BADGE (ERICKSON, 2008), tendo outras aplicações que incluem laminados elétricos para placas de circuito impresso, tintas e adesivos. Estes também são utilizados como revestimento de proteção em latas de metal para manter a qualidade dos alimentos enlatados e bebidas (BISPHENOL – A, 2014), e é liberado no ambiente pela descarga de águas residuais pelas fabricas que o utilizam (GAROMA; MATSUMOTO, 2009) contaminando assim, águas e solos. No entanto, os dados sobre a segurança do BPA permanecem controversos.

A exposição humana é considerada generalizada, pois estudos de biomonitoramento detectaram bisfenol A em mais de 90% das amostras testadas, incluindo produtos alimentares, embalagens e bebidas (VANDERBERG *et al.*, 2010). Para ser ingerido e absorvido pelo corpo humano, o monômero ou dímero de BPA, deve estar diluído em alimentos, bebidas por meio de aquecimento de latas ou recipientes. Vários estudos mostram que o BPA pode migrar a partir de policarbonatos, durante a difusão e hidrólise desses polímeros, que ocorre devido à situações como calor ou condições ácidas ou básicas que irão conduzir a sua liberação (BURRIDGE, 2003; MERCEA, 2009). Nam *et al.* (2010) mostraram que o BPA é liberado de mamadeiras expostas à altas temperaturas, e o uso prolongado da mesma reforça a hidrólise de polímero causando uma intensa migração do BPA para água. Isso desencadeia uma migração inicial de 0.03 e 0.13g/dm³ à 40 e 95°C, respectivamente, sendo que após seis meses de uso das garrafas a concentração de BPA aumentou para 0.18g/dm³ e 18,47dm³ à 40 e 95°C, respectivamente. Além disso, foi detectado 4-23µg de BPA em alimentos enlatados, 7-58µg/g em bebidas e 90-913µg/saliva uma hora após a aplicação do selante dentário (BROTONS *et al.*, 1996). Em humanos, estima-se que a ingestão diária de BPA seja de 2,5 - 4 ug / pessoa por dia (LAKIND; NAIMAN, 2008).

Outros autores examinaram a lixiviação de policarbonato em mamadeiras fabricadas em diversos países, utilizando HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) e GC – MS (Cromatografia gasosa com detecção de massas) após a escovação, lavagem ou fervura do material. Sun *et al.* (2000) constataram que havia a lixiviação do BPA em garrafas de policarbonato da primeira utilização, o que não foi detectado em garrafas de vidro. Porém durante o uso posterior as concentrações de BPA estavam abaixo do limite de determinação.

Brede *et al.* (2003) relataram que a cada ciclo em uma lava-louças, em água fervente e escovação, elevou para concentrações significativas de BPA na água. Desta forma o BPA aparece no ambiente como resultado do processo de lixiviação dos produtos manufaturados podendo estar presente nos vários compartimentos como, ar, água, solo e sedimento sendo o transporte por meio aquático considerando a principal rota de distribuição.

Os conhecimentos atuais sugerem que a via oral é considerada a mais importante via entrada do bisfenol A (GEENS *et al.*, 2012). Porém outros autores sugerem rotas alternativas como a inalação ou absorção transdérmica como fontes de exposição (STAHLHUT *et al.*, 2009). Destes a poeira é considerada uma fonte de BPA para via de inalação, no entanto, considera-se que a exposição de BPA por inalação com a poeira é consideravelmente menor do que a relacionada com os alimentos consumo (GEENS *et al.*, 2009).

O BPA pode ser medido no soro humano, urina, fluido amniótico, fluido folicular, tecido placentário, e no sangue do cordão umbilical. Estima-se que os recém-nascidos devido ao seu menor peso corporal, são expostos aos mais altos níveis de BPA (24µg/kg de peso corporal/dia) (WONG *et al.*, 2005) uma vez que do nascimento até os 3 meses de idade, os bebês consomem apenas alimentos líquidos, inclusive o leite materno que pode estar contaminado. Além disso, Ikezuke *et al.* (2002) encontraram BPA em gestantes sendo detectado no soro materno (0,3-18,9 ng/mL), líquido amniótico (8,3-8,7 ng/mL) e em tecido placentário (1,0-104,9 ng/mL), e também soro fetal(0,9-9,2ng/mL).

Analisando o sangue humano e outros fluidos, Wetherill *et al.* (2007) mostram que em alguns casos, os níveis de BPA total (livre e conjugado), mostraram-se em concentrações elevadas o suficiente para estimular os pontos de parada em células de cultura *in vitro*. Takeuchi e Tsusumi (2002) determinaram os níveis de BPA em soro de homens e mulheres adultas mostrando uma concentração média de $1,49 \pm 0,11$ e $0,64 \pm 0,10$ ng/mL, respectivamente.

Miao *et al.* (2011), analisaram o peso ao nascimento de crianças em relação à exposição dos pais ao BPA, utilizando a mesma população utilizada no estudo realizado por Li *et al.* (2011). Observou-se que os filhos de mães expostas ao BPA apresentavam menor peso ao nascimento em relação a filhos de mães não expostas. Havia um linear significativo entre a maior exposição ao BPA e menor peso das crianças ao nascimento.

Wolff *et al.* (2007) em um estudo transversal, analisaram um subconjunto de 90 meninas (6-8 anos de idade) matriculadas no Estudo da Puberdade. O BPA foi detectado

em 67% das meninas, sendo que as meninas com índice de massa corpórea superior ou igual a 85% obtiveram baixas quantidade de BPA urinário.

Estudo recente realizado por Harley *et al.* (2013), mostrou que a exposição pré e pós-natal ao BPA tem uma associação com índice de massa corporal. A exposição pré-natal ao BPA em meninas (avaliação do BPA na urina materna durante a gestação), foi associado com a diminuição do índice de massa corporal e gordura corporal aos 9 anos de idade. No entanto, a urina medida de meninos de 9 anos de idade foi associada com o aumento do índice de massa corpórea, circunferência da cintura, massa gorda e obesidade. Os autores ressaltam que é possível essa associação do índice de massa corpórea e da exposição ao BPA pré e pós-natal em ambos os sexos (feminino e masculino), e que pode mudar na pós-adolescência e deve ser tomado como a idade das crianças.

Além de crianças, outros estudos relataram que BPA está associado com o aumento do índice de massa corpórea em indivíduos com 40 anos de idade ou mais velhos (KIM, PARK, 2013). Galloway *et al.* (2010) encontraram altas concentrações de BPA em indivíduos com peso elevado.

Essas associações entre o índice de massa corpórea/obesidade e o BPA são difíceis de interpretar. É possível que o aumento do BPA nestes indivíduos seja devido ao aumento do peso corporal e não ao contrário. Um estudo *in vitro* utilizando tecido adiposo, mostrou que não houve associação entre o índice de massa corpórea e a concentração de BPA no tecido adiposo. Indicando que o aumento do BPA urinário ou no soro não é devido ao aumento do BPA nos tecidos adiposos. Também é possível que os indivíduos com maior índice de massa corporal, irão ingerir mais alimentos, consequentemente ingerindo maiores concentrações de BPA presente nestas embalagens (FERNANDEZ *et al.*, 2007).

1.6 Bisfenol A e sistema genital masculino

Estudos mostram que contaminantes ambientais podem ser prejudiciais à reprodução humana (MANTOVANI, 2006), inclusive o BPA (WETHERILL *et al.*, 2007). Estudo *in vitro* mostrou uma variedade de vias moleculares por meio das quais o BPA pode desencadear uma resposta celular. Por ser considerado um estrógeno não esteroide, ele interfere com a ligação de 17beta-estradiol ao seu receptor nos tecidos-alvo. Desta forma o BPA pode atuar mimetizando, amplificando ou mesmo inibindo a atividade de estrógenos ou interferindo na ação do receptor nuclear de estrógeno (WETHERILL *et al.*, 2007).

Calafat *et al.*, (2005) encontraram BPA em 95% das 371 amostras de urinas de adultos americanos. Li *et al.* (2010) analisaram a função sexual masculina auto-relatada em homens que trabalhavam em uma empresa de BPA e resina epóxi na China, e estes foram comparados com homens não expostos. A exposição ao BPA foi determinada por meio de registros históricos da fábrica, realização da amostragem do ar local e realizando o monitoramento do ar ambiental. Os participantes foram examinados, mas não eram avisados em relação ao BPA. Os trabalhadores expostos relataram uma diminuição na atividade sexual, ou seja, na função erétil, função orgástica, desejo sexual e satisfação geral com a vida sexual em comparação com o grupo controle. A diminuição da função sexual foi relacionada com a exposição ao BPA de modo dose dependente. Desta população, em um subconjunto foi testada a concentração do BPA na urina. Foi observada uma maior quantidade de BPA, que mais tarde foi associado com menor atividade sexual nestes trabalhadores. Lembrando que o grupo controle era exposto ao BPA do ambiente, mas não ocupacional.

Li *et al* (2011) analisaram a qualidade dos espermatozoides e urinas fornecidas pelos trabalhadores mencionado anteriormente. A concentração de BPA na urina dos trabalhadores foi de 38,7g/L o que é 70 vezes menor que a ingestão diária tolerável de acordo com USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) que determina nível máximo de 2678,5g/L BPA na urina de pessoas expostas a 0,05mg/Kg/dia), e do grupo controle foi de 1,4g/L, ou seja, 2000 vezes menor que a ingestão diária aceita. Foi observado que as concentrações de BPA encontrada nos trabalhadores estariam correlacionadas com baixa qualidade dos espermatozoides (concentração, contagem, vitalidade e motilidade dos espermatozoides). Estes resultados sugerem que o BPA mesmo em concentrações menores que o permitido, pode ser prejudicial.

O BPA pode causar alterações no sistema endócrino devido a sua atividade estrogênica (desregulador endócrino xenoestrogênico), uma vez que exerce os seus efeitos através da sua ligação aos receptores nucleares esteróidais: receptor de estrógeno ER α e ER β , com uma afinidade cerca de 10 vezes maior para ER β . Nas células de Leydig, BPA interfere com a expressão da enzima esteroideogênica 17 α -monooxygenase (VANDENBERG *et al.*,2010). Foi relatado, em ratos Fischer 344, que o BPA estimula a secreção de prolactina (PRL) (STEINMETZ *et al.*, 1997), diminui as concentrações de testosterona plasmáticas em ratos púberes (TAKAO *et al.*, 1999), inibe a liberação gonadotrofina coriônica humana (hCG) e auxilia no desenvolvimento de tumores de células de Leydig pré-estimuladas (NIKULA *et al.*, 1999). Desta forma, a exposição a substâncias estrogênicas poderia explicar o aumento da frequência de casos de infertilidade e as desordens associadas ao sistema reprodutor

masculino, em humanos (TOHEI *et al.*, 2001). Porém estudo mostra que o BPA pode apresentar atividade anti-androgênica (FROMME *et al.*, 2002).

Estudo realizado por Chitra *et al.* (2002) relata que a administração de BPA para ratos com idade de 45 dias nas concentrações de 0,2, 2, e 20µg/kg, via oral, durante 45 dias levou a diminuição na contagem de espermatozoides e na motilidade espermática, sendo considerado dose-dependente. Posteriormente, os mesmos autores observaram que o BPA causa degeneração no epitélio epididimário nas regiões de cabeça, corpo e cauda com redução no número de espermatozoides no epidídimo em todas as concentrações de BPA administradas (0,2, 2, e 20 µg/kg) após 60 dias de tratamento, em ratos machos com idade inicial de 45 dias (Chitra *et al.*, 2003).

Muitos estudos encontraram mudanças na concentração dos hormônios sexuais (estrógeno, andrógenos, e gonadotróficos) bem como hormônios sexuais ligados a globulinas (SHBG) em relação a adultos e neonatos expostos ao BPA (AKINGBEMI *et al.*, 2004; TAKAO *et al.*, 1999; TOHEI *et al.*, 2001; NANJAPPA; SIMON; AKINGBEMI, 2012). No desenvolvimento, agentes estrogênicos tais como o BPA podem regular negativamente a secreção do hormônio esteroide pelas gônadas (AKINGBEMI *et al.*, 2004; NANJAPPA; SIMON; AKINGBEMI, 2012), podendo induzir alterações epigenética na qual ocorre o aumento na expressão dos receptores de estrógeno (BROMER *et al.*, 2010). Akingbemi *et al.* (2004) avaliaram a exposição ao BPA nas concentrações de 2,4µg, 10µg, 100mg e 200mg/kg/dia em ratos (DPN 21-35), evidenciando uma diminuição nos níveis de LH e testosterona plasmática apenas na concentração de 2,4µg/kg. Supõe-se que houve um mecanismo compensatório nos animais tratados com maiores concentrações.

A administração de BPA (1mg/kg) na água de beber ou por via subcutânea, durante 14 dias, em ratos adultos *Wistar* aumentou os níveis de LH e de prolactina e reduziu as concentrações plasmáticas de testosterona testicular. Entretanto, os níveis de FSH plasmático não foram alterados pela exposição ao BPA (TAKAO *et al.*, 1999; TOHEI *et al.*, 2001). Outros autores também afirmam que a exposição ao BPA nas doses de 3mg/kg, via subcutânea, em ratos *Wistar* adultos, resulta em uma diminuição nos níveis de testosterona plasmática, acompanhada de uma redução no número de espermatozoides no epidídimo (HERALTH *et al.*, 2004). Neste contexto observou-se que BPA causa uma redução na contagem espermática, que pode ser resultante da redução nos níveis de testosterona plasmática logo após a puberdade.

Nakamura *et al.* (2010), também buscaram esclarecer mecanismos pelo qual o BPA exerce a sua atividade tóxica no sistema reprodutor. Administraram BPA nas

concentrações (0, 20, 100 e 200 mg/kg/dia) ou E2 (Estradiol) (10 e 100 µg/Kg/dia) durante 6 semanas em ratos machos no período pré-puberal. Os resultados encontrados foram a diminuição dos níveis de testosterona testicular e hormônio luteinizante no plasma, e também houve uma diminuição da expressão de enzimas esteroidogênicas e proteína transportadora de colesterol nas células de Leydig podendo ter uma correlação entre a diminuição da testosterona e da expressão dessas enzimas e proteínas. As mudanças nas enzimas esteroidogênicas e proteína transportadora foram observadas em níveis mais baixo sem relação aos níveis normais. Diante dos fatos, acredita-se que o BPA afeta diretamente não só as células de Leydig, mas também a glândula pituitária, sendo que o primeiro pode ser prejudicado em concentrações mais baixas de BPA (10µg/Kg/dia) do que o último.

1.7 Estresse oxidativo e BPA

O estresse oxidativo é considerado uma importante condição fisiopatológica que pode promover uma variedade de desordens até a morte celular. As reações que geram intermediários altamente reativos, como, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio ou radicais hidroxila causam danos oxidativos aos lipídios das membranas biológicas causando lipoperoxidação (MELCHIORRI *et al.*, 1996).

Os ânion superóxido é formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron, de forma espontânea, principalmente pela membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória (NODBERG; ARNÉR, 2001). É uma das principais espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelos espermatozoides (AITKEN, 1995). O mesmo autor sugere que NAD(P)H (nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato) seja a principal fonte de elétrons responsável pela produção do ânion superóxido pelo espermatozoide humano com o possível envolvimento do sistema NAD(P)H-oxidase, de modo similar em que ocorre e outros tipos celulares. Por outro lado, De Lamirande e Lamonthe (2009) mostraram que uma oxidase não identificada localizada na membrana é responsável pela produção de ânion superóxido.

A lipoperoxidação das membranas celulares acarreta em alterações da sua estrutura e permeabilidade (MELLO FILHO *et al.*, 1983) e como consequência, a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Além disso, a ativação das reações de lipoperoxidação tem como principal consequência formação de aldeídos de baixo peso molecular, como 4-HNE e o MDA. Estes reagem com proteínas citoplasmáticas e são tóxicos para as células. Desta forma,

a lipoperoxidação alterara a permeabilidade de membrana, causando também a toxicidade celular, frequentemente culmina com a morte celular (HERSHKO, 1989).

Existem vários mecanismos que protegem as células contra o dano oxidativo causado por radicais livres. Estes mecanismos são conhecidos como antioxidantes, e possuem, intracelularmente, formas de ação por vias enzimáticas e não enzimáticas. Assim, podem atuar removendo o radical antes que este cause lesão, ou mesmo reparado a lesão ocorrida (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). As enzimáticas, incluem: superóxido dismutase (SOD), catalase, a glutathionaredutase (GR) e glutathionaperoxidase (GPx). A SOD promove a dismutação de duas moléculas de ânion superóxido em uma de peróxido de hidrogênio, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Já foram detectadas no espermatozoide e no plasma seminal do homem enzimas antioxidantes como: a SOD e GR e GPx (AITKEN *et al.*, 1996; ZINI *et al.*, 2000; MISRO *et al.*, 2004).

O BPA pode afetar o metabolismo biológico do sistema celular e seu controle redox, levando às alterações das características reprodutivas e sexuais (KABUTO *et al.*, 2003). O BPA é considerado agente pró-oxidante, mostrando atividade através do receptor de estrógeno ou pelo seu metabólito. O BPA é metabolizado na sua maior parte pelo citocromo P450 hepático gerando dois metabólitos, 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano e 3-hydroxybisphenol A (3-OH-BPA) formados durante a hidroxilação do anel do BPA. Além disso, Atkison e Roy (1995) detectaram um metabólito reativo, 3,4-quinona BPA, que juntamente com a presença da peroxidase forma uma ligação covalente com o DNA. Os mesmos autores mostraram que os metabólitos do BPA como as quinonas e semiquinonas são capazes de formar adutos de BPA-DNA, participando da produção de ROS, o que poderia trazer danos ao DNA. Os metabólitos gerados na presença do citocromo P450 são caracterizados pela forte ação estrogênica quando comparado com o BPA próprio (KOVACIC, 2010). Outros citocromos como, CYP11, CYP17 e CYP19 estão envolvidos na biotransformação endógena do BPA (QUESNOT *et al.*, 2014). O citocromo CYP19A1 (enzima aromatase) é responsável pela formação de estrógenos (testosterona em estrógeno). Considerando uma propriedade do BPA a mimetização de estrógenos, muitos estudos tem se direcionado sobre estas enzimas chaves, uma vez que a maioria dos vertebrados possuem uma única isoforma de CYP19A1, o qual é expresso em vários tecidos, sendo um deles o testículo (QUESNOT *et al.*, 2014).

Estudos realizados por Kabuto *et al.* (2003), mostraram que altas doses de BPA (25 e 50mg/Kg) não altera os níveis de TBARS no testículo, enquanto GSH diminuía

neste órgão. Sugerindo que o BPA induz a superprodução de peróxido de hidrogênio no testículo. Outro estudo realizado por Citra et al (2002), relataram que quando administrados BPA via oral nas concentrações de 0,2, 2, e 20µg/Kg durante 45 dias em ratos com idade de 45 dias, observou-se um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica, e diminuição nas atividades da superóxido dismutase, catalase, glutathionaredutase e glutathionaperoxidase, levando ao estresse oxidativo no epidídimo.

Nanjappa et al. (2014) mostraram que a exposição de ratas prenhas ao BPA (2,5 e 25µg/kg) durante o 12º dia gestacional até o 21º dias pós-natal, com uma dieta hipercalórica (70DPN), aumentaram as concentrações de TBARS plasmáticos e produção de ROS em células de Leydig.

1.8 Inflamação e sistema genital masculino

A inflamação é uma resposta natural do organismo a uma variedade de injúrias teciduais, incluindo aquelas mediadas por patógenos, irritantes, disfunção celular e trauma físico. A inflamação envolve a ação de múltiplos tipos celulares, residentes e recrutados. O local afetado irá sofrer modificações fisiológicas, resultantes das alterações na perfusão vascular, na permeabilidade e na produção de mediadores locais de inflamação, estes irão promover o influxo de células imunes. A resposta inflamatória quando bem sucedida, resulta em retenção inicial da injúria, seguida de maneira ideal por sua remoção e restauração da homeostase tecidual (KARALIS *et al.*, 2009).

A literatura mostra que no testículo normal, leucócitos são encontrados quase exclusivamente dentro do tecido intersticial, zona peritubular e cápsula testicular. Estas células incluem principalmente macrófagos residentes, células dendríticas e linfócitos circulantes, embora variável do número de mastócitos e eosinófilos, também estão presentes, dependendo da espécie (EL-DEMIRY *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 1994; ANTON *et al.*, 1998). Já é bem estabelecido que a maioria dos macrófagos residentes no testículo, tem uma atividade pró-inflamatória reduzida, tendo uma preferência para produção de citocinas imunossupressoras quando estimuladas e expressão marcadores em sua superfície de acordo com a sua ativação (KERN; MADDOCKS, 1995; HAYES *et al.*, 1996; HEDGER, 2002; BRYNIARSKI *et al.*, 2004; MARESZ *et al.*, 2008). Estes macrófagos exercem um importante papel na regulação das respostas aos antígenos no ambiente testicular.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória de fase aguda da inflamação secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos,

células da glia e principalmente pelo tecido adiposo visceral (REXRODE *et al.*, 2003), sendo TNF- α e IL-1 potentes indutores da produção de IL-6. Além disso, a IL-6 promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células matadoras naturais frente a uma injúria tecidual.

Em ratos normais, essa citocina é produzida pela maioria das células somáticas testiculares como macrófagos intersticiais (BRYNIARSKI *et al.*, 2005), células de Leydig (BOOCKFOR *et al.*, 1994), células de Sertoli (RIVAL *et al.*, 2006), células peritubulares e somáticas (POTASHNIK *et al.*, 2005). Os mesmos autores mostraram o envolvimento de gonadotrofinas e testosterona na regulação da IL-6 (POTASHNIK *et al.*, 2005).

A literatura mostra que a exposição ao BPA é capaz de modular a atividade imunitária através o efeito sobre os receptores estrogênicos (ER), receptor de arylhydrocarbonetos (AHR) e provavelmente pelo receptor ativador de proliferador do peroxissoma (PPAR) (ROGERS *et al.*, 2013). Sugita-Konishi *et al.* (2003) observaram que a exposição ao BPA diminuem a atividade dos neutrófilos e inibe a produção de IL-6 em camundongos infectados com *E.coli* (não patogênico). Não só interfere na resposta imune inata mas também na adaptativa. Já foi mostrado que o BPA causa o aumento nos níveis de IFN- γ , (resposta Th1) em baixas doses (30 μ g/kg) em ratos machos DBA1/J (YOSHINO *et al.*, 2003). Por outro lado, altas doses (25mg/kg) de BPA causam o aumento na produção de IL-4 (resposta Th2) (LEE *et al.*, 2003). Apesar da escassez de informações sobre os efeitos do BPA no sistema imune, sabe-se que a inflamação e infecção dos órgãos genitais masculinos são consideradas importantes fatores etiológicos de infertilidade. Em torno de 5-15% dos fatores de infertilidade masculina são de etiologia conhecida e têm o envolvimento inflamatório, infeccioso ou auto-imune, que incluem a formação de anticorpos antiespermáticos, orquite e epididimite (SCHUPPE; MEINHARTDT, 2005). Porém, a literatura ainda não traz informações relacionando o BPA, a inflamação e os órgãos reprodutores.

2.0 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o aumento significativo da contaminação ambiental mundial tem contribuído para o crescimento do número de indivíduos portadores de doenças graves como cânceres, doenças cardiovasculares, respiratórias e distúrbios endócrinos. Neste contexto é importante relatar o crescente aumento do declínio da qualidade espermática e conseqüentemente dos problemas de fertilidade em homens em idade reprodutiva. Dentre essas substâncias, destaca-se o bisfenol A (BPA). O BPA é um estrógeno não esteroidal sintético amplamente utilizado na produção de plástico policarbonato e como aditivo para outros tipos de plásticos. Está presente em uma série de produtos de consumo humano e contamina o solo e água através de sua liberação pelas fábricas. Ele também é liberado dos produtos que o constitui (copos, garrafas plásticas, selantes dentários, brinquedos, mamadeiras) podendo ser ingerido. Por ser um xenoestrógeno, no organismo humano ou animal, o BPA pode causar alterações no sistema endócrino devido a sua atividade estrogênica (desregulador endócrino xenoestrogênico). Sabe-se que o BPA exerce os seus efeitos através da ligação aos receptores nucleares esteróides: receptor de estrógeno (ER α e ER β). Deste modo, nos indivíduos do sexo masculino podem ter graves alterações endócrinas, morfológicas e fisiológicas tanto em idade adulta, mas principalmente durante o desenvolvimento dos órgãos do sistema reprodutor masculino (período pré-natal ou pós-natal) onde as células ainda não estão totalmente diferenciadas. Os principais danos causados pela exposição ao BPA no sistema reprodutor masculino são alterações nos níveis de FSH e de LH, redução nos níveis de testosterona, perda da integridade da barreira hematotesticular e aumento nos níveis de estresse oxidativo. No entanto, os estudos encontrados até o momento utilizam doses muito altas ou tratamento agudos, o que não remete à realidade na qual as populações humanas ou animais estão expostos ao BPA. Além disso, não avaliam com exatidão o período de desenvolvimento pós-natal do testículo, já que utilizam de animais adultos.

O FDA (*Food and Drug Administration*), em julho de 2012, alterou a regulamentação sobre a utilização de resinas de policarbonato à base de BPA em mamadeiras e copos plásticos. É importante salientar que, embora o BPA esteja proibido em alguns países, e desde 2012 no Brasil, e mesmo com essa proibição ainda tem uma quantidade mínima liberada para a sua utilização.

O presente estudo justifica-se, uma vez que adolescentes ou mesmo crianças do sexo masculino, que foram expostas ao BPA ainda não atingiram a idade reprodutiva e

podem ainda estar em contato com este agente uma vez que a durabilidade, vida útil, do plástico e sua degradação no ambiente são muito longas. Outro importante motivo que torna relevante a realização deste estudo é que essa proibição não é mundial, ou seja, muitas populações ainda estão expostas a este agente. Assim, como este estudo visa a saúde da população humana e animal do ponto de vista global, a publicação deste estudo que ocorrerá em revista internacional chegará à comunidade científica e poderá auxiliar na regulamentação deste xenoestrógeno em países que o utilizam de modo deliberado. Por conseguinte, insere-se muito a todo esse contexto, a população carente a qual carece de informações adequadas sobre o assunto e utilizam produtos plásticos devido ao seu baixo custo, versatilidade de uso e durabilidade, ou seja, mesmo em países onde o BPA foi proibido ele pode estar em uso.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Diante da relevância clínica, social e política do assunto e também pela falta de informações precisas na literatura especializada o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição ao bisfenol A durante o período peripuberal poderia trazer danos para o desenvolvimento do testicular e epididimário de ratos.

3.2 Específicos:

- Determinar a possível toxicidade do BPA sobre o sistema genital masculino;
- Avaliar se o BPA altera o desenvolvimento pós-natal do testículo e epidídimo em ratos peripuberais;
- Detectar indícios de que o BPA altere a fertilidade dos animais.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p.659-668, 1995.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 21, p. 495-504, 1996.

AKINGBEMI, B. T.; SOTTAS, C. M.; KOULOVA, A. I.; KLINEFELTER, G. R.; HARDY, M. P. 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, p. 592-603, 2004.

ANDRESSON, A. M.; JORGENSEN, N.; MAIN, K. M.; TOPPARI, J.; RAIPER-DE MEVTS, E.; LEFFERS, H.; JUUL, A.; JENSEN, M. T. K.; SAKKEBAEK, N. E. Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial 'tipping point'. *International Journal of Andrology*, v. 31, p. 74–80, 2008.

ANTON, F.; MORALES, C.; AGUILAR, R.; BELLIDO, C.; AGUILAR, E.; GAYTAN, F. A comparative study of mast cells and eosinophil leukocytes in the mammalian testis. *Zentbl Veterinarmed*, v. 45, p. 209–218, 1998.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária -
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/alimentos>> Acesso em 20/01/2014

ATKINSON, A.; ROY, D. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 26, p. 719–720, 1995a.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, v. 26, p. 539-549, 2005.

BEN-JONATHAN, N.; STEINMETZ, R. Xenoestrogens: The emerging story of Bisphenol A. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 9, p. 124–128, 1998.

BERN, H. A.; BLAIR, P.; BRASSEUR, S.; COLBORN, T.; CUNHA, G.; DAVIS, W. Statement from the work session on chemically-induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection. In: Colborn T, Clement C. Chemically-induced alterations in

sexual and functional development: The Wildlife/Human Connection. eds Princeton Scientific Publishing Co., NJ, U.S. 1992. p. 1-8.

BESERRA, M. R.; SCHIAVINI, J. A.; RODRIGUES, W. C.; PEREIRA, C. S. S. O Bisphenol A: sua utilização e atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde. **Revista Eletrônica TECCEN**, Vassouras, v. 5, p. 37-46, 2012.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no ambiente: efeitos e consequências. Rio de Janeiro- RJ. **Química Nova**, v. 30, p. 651-666, 2007.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. 1st ed. USA: IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC, 2003.

BISPHENOL – A < <http://www.bisphenol-a.org> > Acesso em 03/02/2014.

BLANCHARD, Y.; ROBAIRE, B. Le mode d'action des androgènes et la 5 α -reductase, **Médecine/Sciences**, v. 13, p. 467–473, 1997.

BOOCKFOR, F.; WANG, D.; LIN, T.; NAGPAL, M. L.; SPANGELO, B. L. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. **Endocrinology**, v. 134, p. 2150-2155, 1994.

BREDE, C.; FJELDAL, P.; SKJEVRAK, I.; HERIKSTAD, H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dish washing, boiling, and brushing. **Food Additives & Contaminants**, p. 684–689, 2003.

BRYNIARSKI, K.; SZCZEPANIK, M.; MARESZ, K.; PTAK, M.; PTAK, W. Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. **Am Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 27–35, 2004.

BRYNIARSKI, K.; SZCZEPANIK, M.; PTAK, M.; PTAK, W. The influence of collagenase treatment on the production of TNF- α , IL-6 and IL-10 by testicular macrophages. **Journal of immunological methods**, v. 301, p. 186-189, 2005.

BROMER, J. G.; ZHOU, Y.; TAYLOR, M. B.; DOHERTY, L.; TAYLOR, H. S. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 2273–2280, 2010.

BROTONS, J. A.; OLEA-SERRANO, M. F.; VILLALOBOS, M.; OLEA, N. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 608–612, 1994.

BURGMER, T.; HILLEBRAND, H.; PFENNINGER, M. Effects of climate-driven temperature changes on the diversity of freshwater macroinvertebrates. *Oecologia*. 151, p. 93–103, 2007.

BURRIDGE E. Bisphenol A product profile. **European Chemical News**, p. 14–20, 2003.

CALAFAT, A. M.; YE, X.; WONG, L. Y.; REIDY, J. A.; NEEDHAM, L. L. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiaryoctylphenol:2003–2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 39–44, 2008.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295–311, 2000.

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.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Review**, v. 52, p. 198–236, 1972.

COSENTINO, M. J.; COKETT, A. T. Structure and function of the epididymis. **Urological Research**, v. 14, p. 229–240, 1986.

COSTANZO, L. S. *Fisiologia*. 3ª edição. São Paulo: Editora Elsevier, 2005.

CUDICINI, C.; LEJEUNE, H.; GOMEZ, E.; BOSMANS, E.; BALLEST, F.; SAEZ, J.; JEGOU, B. Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukin-1 and-6. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, p. 1426–1433, 1997.

DAMGAARD, I. N.; MAIN, K. M.; TOPPARI, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Impact of exposure to endocrine disrupters in utero and in childhood on adult reproduction. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 16, p. 289-309, 2002.

DE LAMIRANDE, E.; LAMONTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 502-510, 2009.

EL-DEMIRY, M. I.; HARGREAVE, T. B.; BUSUTTIL, A.; ELTON, R.; JAMES, K.; CHISHOLM, G. D. Immunocompetent cells in human testis in health and disease. **Fertility Sterility**, v. 48, p. 470-479, 1987.

ERICKSON, B. E. Bisphenol A under scrutiny. **Chemical and Engineering News**, v. 86, 2008.

EZER, N.; ROBAIRE, B. Androgenic regulation of the structure and functions of the epididymis. In: Robaire B., Hinton B.T. (Eds). **The epididymis: from molecules to clinical practice**, p. 279-316, 2002.

FDA – Food and Drug Administration
<<http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm064437.htm>> Acesso em 20/01/2015.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 1-16, 1997.

FERNANDEZ, M. F.; ARREBOLA, J. P.; TAOUFIKI, J.; NAVALON, A.; BALLESTEROS, O.; PULGAR, R.; VILCHEZ, J. L.; OLEA, N. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 259-264, 2007.

FERREIRA, M.G.M. Remoção da atividade estrogênica de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂. Tese de Doutorado, p.173, 2008.

FREDERIKSEN, H.; SORENSEN, K.; MOURITSEN, A.; AKSGLAEDE, L.; HAGEN, C. P.; PETERSEN, J. H.; SKAKKEBAEK, N. E.; ANDERSSON, A. M.; JUUL, A. High urinary phthalate concentration associated with delayed pubarche in girls. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 216-226, 2012.

FROMME, H.; KÜCHLER, T.; OTTO, T.; PILZ, K.; MÜLLER, J.; WENZEL, A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Research**, v. 36, p. 1429-1438, 2002.

GALLOWAY, T.; CIPELLI, R.; GURALNIK, J.; FERRUCCI, L.; BANDINELLI, S.; CORSI, A. M.; MONEY, C.; MCCORMACK, P.; MELZER, D. Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the In CHIANTI adult population study. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1603–1608, 2010.

GAROMA, T.; MATSUMOTO, S. Ozonation of aqueous solution containing bisphenol A: effect of operational parameters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 1185-1191, 2009.

GEENS, T.; NEELS, H.; COVACI, A. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylophenol in human adipose tissue, liver and brain. **Chemosphere**, v. 87, p. 796–802, 2012.

GHISELLI, G. E.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.

GOLUB, M. S.; COLLMAN, G. W.; FOSTER, P. M.; KIMMEL, C. A.; RAIPERT-DE MEYTS, M. E.; REITER, E. O.; SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E.; TOPPARI, J. Public health implications of altered puberty timing. **Pediatrics**, v. 121, p. 218-230, 2008.

GUYTON, A.C. Hall, J. E. Tratado de fisiologia médica.10ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

HARLEY, K. G.; SCHALL, R. A.; CHEVRIER, J.; TYLER, K.; AGUIRRE, H.; BRADMAN, A.; HOLLAND, N. T.; LUSTIG, R. H.; CALAFAT, A. M.; ESKENAZI, B. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and body mass index in childhood in the CHAMACOS cohort. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, 514–520, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press, p. 936, 1999.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G. Fundamentals of toxicologic pathology. San Diego: Academic Press, p. 443-484, 1998.

HAYES, R.; CHALMERS, S. A.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; ATKINS, R. C.; HEDGER, M. P. Secretion of bioactive interleukin 1 by rat testicular macrophages *in vitro*. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 41–49, 1996.

HEDGER, M. P. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 19–34, 2002.

HERALTH, C. B.; JIN, W.; WATANABE, G.; ARAI, K.; SUZUKI, A. K.; TAYA, K. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. **Endocrine**, v. 25, p. 163-172, 2004.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their function. In: Robaire B., Hinton B.T. (Eds). **The epididymis: from molecules to clinical practice**. p. 81-102, 2002.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, p. 277-285, 1989.

IKEZUKI, Y.; TSUTSUMI, O.; TAKAI, Y.; KAMEI, Y.; TAKETANI, Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2839-2841, 2002.

INOUE, K.; WADA, M.; HIGUCHI, T.; OSHIO, S.; UMEDA, T.; YOSHIMURA, Y.; et al. Application of liquid chromatography–mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. **Journal of Chromatograph B**, p. 97–102, 2002.

JACKSON, R. B.; CARPENTER, S.R.; DAHM, C.N.; MCKNIGHT, D.M.; NAIMAN, R.J.; POSTEL, S. L. RUNNING, S.W. Water in a changing world. **Ecological Applications**, v. 11, p. 1027-1045, 2001.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515–540, 1990.

JENSEN, T. K.; VIERULA, M.; HJOLLUND, N. H.; SAARANEN, M.; SCHEIKE, T.; SAARIKOSKI, S.; SUOMINEN, J.; KEISKI, A.; TOPPARI, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Semen quality among Danish and Finnish men attempting to conceive. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. **European Journal of Endocrinology**, v. 142, p. 47-52, 2000.

JIANG, Y.; KUO, C. L.; PERNECKY, S. J.; PIPER, W. N. The detection of cytochrome P450 2E1 and its catalytic activity in rat testis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 578–583, 1998.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCRUTCHFIELD, W. L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v. 7, p. 1199-1216, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. **Aparelho reprodutor masculino**. In: Histologia básica. (eds. Junqueira L C and Carneiro J), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 415-431, 2004.

KABUTO, H.; HASUIKE, S.; MINAGAWA, N.; SHISHIBORI, T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. **Academic Press**, v. 93, p. 31-35, 2003.

KARALIS, K. P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, p. 5747-5754, 2009.

KAVLOCK, R. J. 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.

KERN, S.; MADDOCKS, S. Indomethacin blocks the immunosuppressive activity of rat testicular macrophages cultured *in vitro*. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 28, p. 189–201, 1995.

KIM, K.; PARK, H. Association between urinary concentrations of bisphenol A and type 2 diabetes in Korean adults: a population-based cross-sectional study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, p. 467–471, 2013.

KLINFELTER, G. R.; LASKEY, J. W.; FERRELL, J.; SUAREZ, J. D.; ROBERTS, N. L. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 139–150, 1997.

KOVACIC, P. How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: metabolism, electron transfer and oxidative stress. **Medicine Hypotheses**, v. 75, p. 1–4, 2010.

LAGARRIGUE, M.; BECKER, M.; LAVIGNE, R.; DEININGER, S. O.; WALCH, A.; SUBRY, F.; SUCKAU, D.; PINEAU, C. Revisiting Rat Spermatogenesis with MALDI Imaging at 20- μ m Resolution. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, 2011.

LAKIND, J. S.; NAIMAN, D. Q. Daily intake of Bisphenol A and potential source of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 21, p. 272-279, 2010.

LEE, M. H.; CHUNG, S. W.; KANG, B. Y.; PARK, J.; LEE, C. H.; HWANG, S. Y.; KIM, T. S. Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²⁺. **Immunology**, v. 109, p. 76–86, 2003.

LEE, C. H.; JIANG, L. Y.; KUO, Y. L.; HSIEH, C. H. Y.; CHEN, C.; TIEN, C. H. J. The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. **Chemosphere**, v. 91, p. 904–911, 2013.

LI, D. K.; ZHOU, Z.; QING, D.; HE, Y.; WU, T.; MIAO, M.; WANG, J.; WENG, X.; FERBER, J. R.; HERRINTON, L. J.; ZHU, Q.; GAO, E.; CHECKOWAY, H.; YUAN, H. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. **Human Reproduction**, v. 25, p. 519–527, 2010.

LI, D. K.; ZHOU, Z.; MIAO, M.; HE, Y.; QING, D.; WU, T.; WANG, J.; WENG, X.; FERBER, J.; HERRINTON, L. J.; ZHU, Q.; GAO, E.; YUAN, W. Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. **Journal of Andrology**, v.31, p. 500–506, 2010.

LI, D. K.; ZHOU, Z.; MIAO, M.; HE, Y.; WANG, J.; FERBER, J.; HERRINTON, L. J.; GAO, E.; YUAN, W. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. **Fertility and Sterility**, v. 95, p. 625–630, 2011.

MAEDA, K.; OHKURA, S.; TSUKAMURA, H. Physiology of reproduction. In: Krinke G.J. (Ed). **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, p. 145-176, 2000.

MANFFINI, M. V.; RUBIN, B. S.; SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of Bisphenol-A. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 179-186, 2006.

MANTOVANI, A. Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1076, p. 239–252, 2006.

MANTOVANI, A, FUCIC, A. Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action. **Reproductive Toxicology**, 2013.

MARESZ, K.; PONOMAREV, E. D.; BARTENEVA, N.; TAN, Y.; MANN, M. K.; DITTEL, B. N. IL-13 induces the expression of the alternative activation marker Ym1 in a subset of testicular macrophages. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, p. 140–148, 2008.

MELCHIORRI, D.; REITER, R. J.; SEWERYNEK, E.; HARA, M.; CHEN, L.; NISTICO, G. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1095–1099, 1996.

MELNICK, R. L. Introduction – Workshop on characterizing the effects of endocrine disruptors on human health at environmental exposure level. **EHP**, v. 107, p. 603-604, 1999.

MELLO-FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1983.

MERCEA, P. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, p. 579–593, 2009.

MEYER, A; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro: v. 15, p. 845-850, 1999.

MIAO, M.; YUAN, W.; ZHE, G.; HE, X.; LI, D. K. In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 32, 64–68, 2011.

MISRO, M. M.; CHOUDHURY, L.; UPRETI, K.; GAUTAM, D.; CHAKI, S. P.; MAHAJAN, A. S.; BABBAR, R. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. **International Journal of Andrology**, v. 27, p. 82-87, 2004.

NAKAMURA, D.; YANAGIBA, Y.; DUANA, Z.; ITOA, Y.; OKAMURA, A.; ASAEDA, N.; TAGAWA, Y.; LIC, C. M.; TAYA, K.; ZHANGA, S-Y.; NAITOA, H.; RAMGHANA, D. H.; KAMIJIMA, M.; NAKAJIMA, T. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. **Toxicology**, v. 194, p. 16–25, 2010.

NAM, S.; SEO, Y.; KIM, M. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. **Chemosphere**, v. 79, p. 949–952, 2010.

NANJAPPA, M. K.; SIMON, L.; AKINGBEMI, B. T. The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. **Biology of Reproduction**, v. 86, p. 131-112, 2012.

NANJAPPA, M. K.; AHUJA, M.; DHANASEKARAN, M.; COLEMANA, E. S.; BRADEN, T. D.; BARTOL, F. F.; BIRD, R. C.; WANDERS, D.; JUDD, R. L.; AKINGBEMI, B. T. Bisphenol A regulation of testicular endocrine function in male rats is affected by diet. **Toxicology Letters**, v. 225, p. 479-487, 2014.

NIKULA, H.; TALONPOIKA, T.; KALEVA, M.; TOPPARI, J. Inhibition of hCG-stimulated steroidogenesis in cultured mouse Leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 157, p. 166–173, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OJEDA, S. R.; ANDREWS, W. W.; ADVIS, J. P.; WHITE, S. S. Recent advances in the endocrinology of puberty. **Endocrinology Review**, v. 1, p. 228-257, 1980.

OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: Knobil E., Neil, J.D. (Eds). **The physiology of reproduction**, v. 1, p. 365-409, 1994.

OTTO, S.; BHATTACHARYYA, K. K.; JEFCOATE, C. R. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in rat adrenal, ovary, and testis microsomes is catalyzed by the same novel cytochrome P450 (P450RAP). **Endocrinology**, v. 131, p. 3067–3076, 1992.

PASQUALOTTO, F. F.; LOCAMBO, C. V.; ATHAYDE, K. S.; ARAP, S. Measuring male infertility: epidemiological aspects. **Revista Hospital Clínicas Faculdade Medicina Universidade São Paulo**, v. 58, p. 173-178, 2003.

PATRAO, M. T. C. C.; SILVA, E. J. R.; AVELLAR, M. C. W. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 934–945, 2009.

PAUGARTTEN, F. J. R. Adverse health consequences of environmental exposure to ‘endocrine disruptors’. **Annual Review of Biomedical Science**, v. 5, p. 45-55, 2003.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine Review**, v. 25, p. 947–970, 2004

PEROBELLI, J. E.; ALVES, T. R.; TOLEDO, F. C.; FERNANDEZ, C. D. B.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KLINEFELTER, G. R.; KEMPINAS Wde. G. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive Toxicology**, v. 33, p. 308-315, 2011.

PFLIEGER-BRUSS, S.; SCHUPPE, H. C.; SCHILL, W. B. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. **Andrologia**, v. 36, p. 337-345, 2004.

POTASHNIK, H.; ELHIJA, M. A.; LUNENFELD, E.; POTASHNIK, G.; SCHLATT, S.; NIESCHLAG, E.; HULEIHEL, M. Interleukin-6 expression during normal maturation of the mouse testis. **European Cytokines Network**, v. 16, p. 161-165, 2005.

QUINLAN, G. J.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; GUTTERIDGE, J. M. C. Action of lead (II) and aluminium (III) ions on iron stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. **Biochimical and Biophysica Acta**, v. 962, p. 196–200, 1988.

RATO, L.; ALVES, M. G.; SOCORRO, S.; DUARTE, A. I.; CAVACO, J. E.; OLIVEIRA, P. F. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Review Urology**, v. 9, p. 330–338, 2012.

REID, B.L.; CLEAND K. W. The structure function of the epididymis. I-The histology of the rat epididymis. **Australian Journal of Zoology**, v. 5, p. 223-251, 1957.

REXRODE, K. M.; PRADHAN, A.; MANSOS, J. E.; BURING, J. E.; RIDKER, P. M. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. **Annual Epidemiology**, v. 13, p. 1-9, 2003.

ROBAIRE, B.; EWING, L. L.; ZIRKIN, B. R.; IRBY, D. C. Steroid delta4-5alpha-reductase and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis. **Endocrinology**, v. 101, p. 1379–1390, 1977.

ROBAIRE, B.; HENDERSON, N.A. Actions of 5 α -reductase inhibitors in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 190-195, 2006.

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

RODRIGUES, J. A.; FAVARETTO, A. L. V. **Sistema reprodutor**. Aires, M.M., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, PP. 877-917, 1999.

RODRÍGUEZ, C. M.; KIRBY, J. L.; HINTON, B. T. The development of the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT, editors. The epididymis – from molecules to clinical practice. New York: **Kluwer Academic/Plenum Publisher**; p. 251-268, 2002.

ROGAN, W. J.; RAGAN, N. B. Some evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, p. 659-667, 2007.

ROGERS, J.; METZ, L.; YONG, W. Review: endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. **Molecular Immunology**, v. 53, p. 421–430, 2013.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. *Histologia: texto e atlas*. 2ª edição. Editora Médica Panamericana. 1993.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R. A.; SINHAHIKIN, A.T.; CLEGG, E.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache River Press, Clearwater, 1990.

RYAN, D. E.; THOMAS, P. E.; LEVIN, W.; MAINES, S. L.; BANDIERA, S.; REIK, L. M. Monoclonal antibodies of differentiating specificities as probes of cytochrome P450h (2C11). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 301, p. 282–293, 1993.

SAFE, S. Endocrine disruptors and falling sperm counts: lessons learned or not! **Asian Journal of Andrology**, v. 14, p. 1–4, 2012.

SAIYED, H.; DEWAN, A.; BHATNAGAR, V.; SHENOY, U.; SHENOY, R.; RAJMOHAN, H.; PATEL, K.; KASHYAP, R.; KULKARNI, P.; RAJAN, B.; LAKKAD, B. Effect of endosulfan on male reproductive development. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 1958-1962, 2003.

SCHIAVINI, J. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES, W. C. Desreguladores Endócrinos no meio ambiente e o uso de potenciais bioindicadores. **Revista Eletrônica TECCEN**, Vassouras, v. 3, p. 33-48, 2011.

SCHUPPE, H. C.; MEINHARDT, A. Immune privilege and inflammation of the testis. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 88, p. 1-14, 2005.

SETCHELL, B. P. Innervation and vasculature of the excurrent duct system. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice.* (eds. Robaire B and Hinton BT), **Kluwer Academic/ Plenum Publisher**, New York. p. 35-48, 2002.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill J.D. (Eds). **The physiology of reproduction**. 2ed. v. 2, p. 1363-1434, 1994.

SHARPE, R. M. Development and maturation of the normal male reproductive system. In Woodruff TJ, Janssen SJ, Guillette LJ and Giudice LC, Eds. **Environmental impacts on reproductive health and fertility**, 2010.

SKINNER, M. K. Sertoli cell-somatic cell interactions. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.317-328, 2005.

SOKOL, R. Z. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. **Comprehensive toxicology**, Cambridge University Press, Cambridge, p. 87-98, 1997.

SONDERFAN, A. J.; ARLOTTO, M. P.; PARKINSON, A. Identification of the cytochrome P-450 isozymes responsible for testosterone oxidation in rat lung, kidney, and testis: Evidence that cytochrome P-450a (P450IIA1) is the physiologically important testosterone 7-alpha-hydroxylase in rat testis. **Endocrinology**, v. 125, p. 857–866, 1989.

STAHLHUT, R. W.; WELSHONS, W. V.; SWAN, S. H. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 784-789, 2009.

STEINMETZ, R.; BROWN, N. G.; ALLEN, D. L.; BIGSBY, R. M.; BEN JONATHAN, N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. **Endocrinology**, v. 138, p. 1780-1786, 1997.

SUGITA-KONISHI, Y.; SHIMURA, S.; NISHIKAWA, T.; SUNAGA, F.; NAITO, H.; SUZUKI, Y. Effect of Bisphenol A on non-specific immune defenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. **Toxicology Letters**, v. 136, p. 217– 227, 2003.

SUN, E. L.; FLICKINGER, C. J. Development of cell types and regional differences of the postnatal rat epididymis. **American Journal of Anatomy**, v. 154, 1979.

SUN, Y.; WADA, M.; AL-DIRBASHI, O.; KURODA, N.; NAKAZAWA, H.; NAKASHIMA, K. High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a label. **Journal of Chromatograph B**, p. 49–56, 2000.

TAKAO, T.; NANAMIYA, W.; NAGANO, I.; ASABA, K.; KAWABATA, K.; HASHIMOTO, K. Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice. **Life Sciences**, v. 65, p. 2351-2357, 1999.

TAKEUCHI, T.; TSUTSUMI, O. Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 291, p. 76-78, 2002.

TOHEI, A.; SUDA, S.; TAYA, K.; HASHIMOTO, T.; KOGO, H. Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, p. 216-221, 2001.

TURNER, T. T.; BOMGARDNER, D.; JACOBS, J. P.; NGUYEN, Q. A. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. **Reproduction**, v. 125, p. 871–878, 2003.

VANDERBERG, L. N.; MAFFINI, M. V.; SONNENSCHNEIN, C.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M. Bisphenol –A and great divided: a review of controversies in the field of endocrine disruption. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 75-95, 2010.

WAISSMANN, W. Health surveillance and endocrine disruptors. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro: v.18, mar./abr. 2002.

WANG, J.; WREFORD, N. G.; LAN, H. Y.; ATKINS, R.; HEDGER, M. P. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. **Biology Reproductive**, v. 51, p. 551–561, 1994.

WETHERILL, Y.; AKINGBEMI, B.; KANNO, J.; MC LACHLAN, J.; NADAL, A.; SONNENSCHNEIN, C.; WATSON, C.; ZOELLER, T.; BELCHER, S. In vitro molecular mechanisms of Bisphenol A action. **Toxicology**, v. 24, p. 178–198, 2007.

WOLFF, M. S.; TEITELBAUM, S. L.; WINDHAM, G.; PINNEY, S. M.; BRITTON, J. A.; CHELIMO, C. GODBOLD, J.; BIRO, F.; KUSHI, L. H.; PFEIFFER, C. M.; CALAFAT, A. M. Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls. *Environmental Health Perspectives*, v. 115, p. 116-121, 2007.

WONG, K. O.; LEO, L. W.; SEAH, H. L. Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles. ***Food Addition & Contaminants***, p. 280–288, 2005.

YOSHINO, S.; YAMAKI, K.; YANAGISAWA, R.; TAKANO, H.; HAYASHI, H.; MORI, Y. Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice. ***British Journal of Pharmacology***, v. 138, p. 1271–1276, 2003.

ZAYA, R.; HENNICK, C.; PEARL, C. A. In vitro expression of androgen and estrogen receptors in prepubertal and adult rat epididymis. ***General and Comparative Endocrinology***, v. 178, p. 573-586, 2012.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*, v. 55, p. 922-926, 2000.

5.0 ARTIGO 1

Baixas doses de Bisfenol A pode prejudicar o desenvolvimento pós-natal diretamente, sem afetar os níveis hormonais e estresse oxidativo

Low doses of bisphenol can impair postnatal testicular development directly, without affecting hormonal levels or oxidative stress

Este Artigo foi submetido à revista Toxicology

Low doses of bisphenol can impair postnatal testicular development directly, without affecting hormonal levels or oxidative stress

Fernanda M. Ogo^{1,2}, Glaucia E. M. L. Siervo^{1,2}, Géssica D. Gonçalves^{1,2}, Rubens Cecchini², Flavia A. Guarnier², Janete Ap. Anselmo-Franci³, Glaura S. A. Fernandes^{1*}

1 - Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

2 - Department of General Pathology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

3 – Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

***Corresponding author**

Tel.: +55 43 33714417

E-mail address: glaura@uel.br (G.S. A Fernandes)

Abstract

Bisphenol A is considered one of the most potent endocrine disrupting chemicals, causing changes in the endocrine system due to its estrogenic activity. Thus, male individuals may have serious endocrine, morphological and physiological alterations in not only adults, but also during development of the organs of the male reproductive system. The peripuberal period may be a critical stage of reproductive development and therefore more susceptible to the action of toxic agents. Thereby, due to the clinical, social and political relevance of the subject, coupled with the lack of information in the literature, the aim of this study was to evaluate whether exposure to BPA during the peripuberal period can damage testicular development. For this purpose, male Wistar rats were treated with BPA via gavage at doses of 20µg/Kg or 200µg/Kg body weight, from PND 36-66. The BPA was diluted in 1% DMSO and subsequently in corn oil. The control group received these vehicles under the same conditions. On PND 67 the animals were anesthetized, weighed and euthanized; blood was collected for hormonal analysis. The testes were collected and weighed and later used to evaluate the level of oxidative stress, sperm count, histopathological parameters, morphometric analysis and immunohistochemistry. Sperm from vas deferens was used to evaluate the spermatid morphology. The results showed that BPA causes abnormal spermatid morphology and seminiferous tubules at both doses and at the highest dose causes increased proliferation of stem cells, thus increasing the height of the germinal epithelium and reducing stages IX - XIII of spermatogenesis. It was concluded that BPA, at both doses, affected the development of the male reproductive system during the peripuberal period directly since it did not affect hormone levels or the redox profile.

Keywords: Bisphenol A, Testis, Sperm, Peripuberal period, male rats

Abbreviations: PND, post natal day; C, Control group; BPA20, Bisphenol A 20 μ g/kg, BPA200, Bisphenol A 200 μ g/kg, MDA, malondialdehyde; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; TBA, thiobarbituric acid; GSH, reduced glutathione; DSP, daily sperm production; LH, luteinizing hormone; FSH follicle-stimulating hormone. ER α , estrogen receptor alfa; ER β , Estrogen receptor beta.

1. Introduction

Taking into consideration the diversity of customs and cultures around the world, an increase in male infertility has been observed, constituting an international phenomenon (Pasqualotto et al., 2003). Authors report that most of the effects exerted on reproductive function are through disturbance processes mediated by androgens or estrogens (Waissmann, 2002). In this context, several chemicals present in environmental pollution can cause damage to the health of humans and animals. These chemicals act as hormones and are therefore known as endocrine disruptors (Paugartten, 2003). These compounds have the ability to interfere with the natural functioning of the endocrine system of humans and animals and can result from anthropogenic or natural activity (Ghiselli and Jardim, 2007). The changes caused by endocrine disruptors may be temporary or permanent.

Bisphenol A (BPA, 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane), a non-steroidal synthetic estrogen, is used as the monomer to manufacture polycarbonate plastic, considered one of the most important components in many industrial processes, being one of the major chemicals produced in the world (Burrige, 2003). BPA has been extensively used in the production of polycarbonate plastic and epoxy resins, and as part of a wide variety of common products including toys, food packaging and reusable bottles, such as baby bottles and beverage containers, and also dental sealants (Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Vogel, 2012). Biomonitoring studies found bisphenol A in 90% of human samples tested (Vanderberg et al., 2009).

The BPA is considered such as endocrine disruptors and may exert its effects through its binding with estrogen receptors (ER) and androgens receptors (AR). ER is a member of the nuclear receptor superfamily of proteins that modulate gene expression. Two subtypes of ER have been identified, ER α and ER β . Thus, its affinity

for estrogen receptors makes this compound potentially toxic in organs with such receptors (Matthews et al., 2001). In addition, oxidative toxicity is considered an important effect of BPA since the molecule is biotransformed during oxidation reactions, generating reacting oxygen species as metabolites (Michalowicz, 2014). Although the most part of BPA is metabolized by cytochromes P450 in the liver, other organs are also capable to modulate its biotransformation as kidney, cerebellum, prostate and testis (Quesnot et al., 2014).

Studies report that the testis is considered a highly sensitive target for the toxic effects of BPA (VomSaal et al., 1998; Chitra et al., 2003; El-Beshbishy et al., 2015). In adult male rats, the effects of BPA on the testes include decreased weight (Tamilselvan et al., 2014; El-Beshbishy et al., 2015), disruption of the hematotesticular barrier (VomSaal et al., 1998; Fiorini et al., 2004) and reduction in daily sperm production at 200 mg/kg (Sakaue et al., 2001). In addition a decrease in plasma testosterone has been demonstrated with BPA doses of 1mg/rat/day (Tohei et al., 2001) and 300µg/kg (Castro et al., 2013).

Exposure of the male reproductive system to one or more endocrine disruptors may take place at different stages of human or animal development. In pre and postnatal development, estrogenic agents such as BPA may negatively regulate gonadal steroid hormone secretion (Akingbemi et al., 2004; Nanjappa et al., 2012) and may cause epigenetic modifications (Bromer et al., 2010). In the postnatal period, puberty is a dynamic event during which complex sexual development occurs due to a series of events that result in the maturation of the hypothalamic pituitary testicular and consequently the start of the reproductive cycle of the species (Ojeda and Urbanski, 1994). During peripuberty (PND 36-55 or 65) spermatogenesis and steroidogenesis are not fully established, thus, this period is considered a critical

stage of reproductive development and consequently more vulnerable to the action of toxic agents (Johnson et al., 1997).

Exposure to BPA at a low dose (2.4µg/kg/day) in male rats (PND 21-35) caused a decrease in the plasmatic levels of LH and testosterone and daily sperm production, however high doses did not cause these effects (Akingbemi et al., 2004) or caused a reduction in these hormones in male rats with PND 21 (100 and 200mg/kg BPA) (Nakamura et al., 2010). In contrast, Gámez et al. (2014) recently observed an increase in plasma testosterone in prepubertal male rats ingesting BPA (3µg/kg/day). Wisniewski et al. (2015) showed that BPA (5 and 25mg/kg) caused a decrease in the sperm count and daily production in mice of PND 50. BPA at 0.2, 2 and 20µg/kg reduced sperm count and weight of testis in male rats (PND 45) (Chitra et al., 2003) and reduced the expression of the steroidogenic enzyme 17α – hydroxylase *in vitro* (Akingbemi et al., 2004). Furthermore, estimates indicate that children between 6 and 12 years of age have greater urinary BPA concentrations compared to adults (Calafat et al., 2008).

Until now, the majority of studies found used very high doses or acute treatment, which does not reflect the reality of exposure to BPA by human or animal populations. Furthermore, no studies clearly evaluate the peripubertal testicular development, period since many are conducted with sexually mature adult animals. It is very important to note that although BPA is banned in some countries, there are still many countries that use BPA; considering the durability of plastic products, people in the different parts of the world are exposed to BPA.

Therefore, due to the clinical, social and political relevance of the subject coupled with the lack of information in the literature, the objective of this study was to

evaluate whether exposure to BPA during the peripuberal period can damage testicular development.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental conditions

Adult male Wistar rats (30 days old) were supplied from Central Animal House, State University of Londrina (CCB-UEL), Paraná, Brazil. Animals were acclimated to the new environment for five days before the beginning of the period experimental. During the experiment, animals were allocated in polypropylene cages (43 x 30 x 15 cm) under a well regulated light and dark (12 h light/dark photoperiod, lights switched off at 07:00 am), and controlled temperature ($\pm 23^{\circ}\text{C}$). There were provided with standard commercial laboratory chow and tap water *ad libitum*. Experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazillian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on Animal Use of State University of Londrina (CEUA/UEL protocol number 10156.2013.59).

2.2. Experimental design

Male rats (PND 36) were randomly assigned to three experimental groups of 15 animals each: Control (C), Bisphenol A 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BPA 20) and Bisphenol A 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BPA 200). These doses were selected according to Chitra et al. (2003) with minor adaptations and administered from PND 36 to PND 66. The peripubertal period was selected according to Ojeda et al. (1980). Thus, the animals were orally treated (gavage) with 20 or 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight of BPA (CAS no. 80-05-7, Sigma-Aldrich Co®, USA) diluted in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)/99% corn oil-vehicle, or alone solution vehicle to control group. In this study we considered the BPA doses as low because the LD₅₀ value of BPA is 2 g / kg for male rats (Bakker et al., 2014).

2.3. Preparation of Bisphenol A

Bisphenol A (BPA, 4,4'-di-hidroxi-2,2-difenilpropano) 97% of purity was obtained from (CAS no. 80-05-7) Sigma-Aldrin Co®, USA. BPA was dissolved in DMSO and solubilized in corn oil and stored protected from light.

2.4. Body weight and weight of some reproductive organs

At the end of experimental period, the animals were anesthetized with a combination of ketamine (Sedomin® 10%, Avellaneda, Argentina) and xylazine (Anasedan®, Paulínia, Brazil), weighed and killed by cardiac puncture. Blood was collected (between 8:00 and 11:30 am) for determination of luteinizing hormone (LH) and testosterone levels (n=10/group). Testis, vas deferens and seminal vesicle (without the coagulating gland, full and empty) were removed and their weights (absolute and relative to body weights) were determined. Testis were used for sperm counts (n=10/group), oxidative stress assays (n=10/group), histopathological analysis (n=5/group) and immunohistochemistry (n=5/group). Spermatozoa from vas deferens were used for morphological analysis (n=10/group).

2.5. Daily sperm production per testis

Testicular spermatids resistances to homogenization were counted according to the method described by Robb et al. (1978) with the adaptations described by Fernandes et al. (2007). For this the testis, descapsulated and weighed soon after collection, was homogenized in 5mL of NaCl 0.9% containing Triton X 100 0.5% (SIGMA, St. Louis, USA) followed by sonication for 30 seconds. After 10-fold dilution, small sample was transferred to Neubauer chambers (4 field per animal) and late spermatids were counting. To calculate daily sperm production (DSP), the

concentration of spermatids per testis was divided by 6.1 which is the number of days in which mature spermatids are present in the seminiferous epithelium.

2.6. Sperm morphology

The vas deferens were removed by and washed internally with 1.0 ml of saline formol 10%. Smears of histological slides were prepared from this solution and observed in photomicroscope (Opton) at 400X magnification. Two hundred spermatozoa per animal were analyzed. The morphological analysis was classified into three general categories: normal morphology, head abnormalities (without characteristic curvature or isolated form i.e., no tail attached) and tail abnormalities (broken, rolled into a spiral and isolated i.e., no head attached). This evaluation was conducted as previously described by Fernandes et al. (2007).

2.7. Testosterone and LH levels

Blood plasma was collected and used for determination of testosterone and luteinizing hormone (LH) plasmatic levels, according as described by Fernandes et al. (2011). Plasma testosterone levels were ascertained by double-antibody radioimmunoassay using a TESTOSTERONE MAIA® KIT (BiochemImmuno System). The LH doses used specific kits supplied by the National Institute of Arthritis, Diabetes and kidney Diseases (NIADDK, USA). All samples were included in the same assay to avoid inter-assay errors. The lowest detection limits and intra-assay errors for LH and testosterone were respectively: 0.04 and 0.065 ng/mL and 3.4 and 4.0%.

2.8. Oxidative stress in the testis

2.8.1. Malondialdehyde (MDA)

The lipid peroxidation in testis homogenates (5mg/ml) from all experimental groups was determined by TBARS reaction. The malondialdehyde is produced as end product of lipid peroxidation chain. MDA formed during lipid peroxidation reacts with thiobarbituric acid (TBA) to produce a colored product representing the protein adduct TBA–MDA. In acid solution, this adduct absorbs light at 532 nm and is easily extractable in organic solvents such as *n*-butanol. MDA levels were quantified by its extinction coefficient and the results are expressed in nmol/g tissue, as described by Oliveira and Cecchini (2000).

2.8.2. Reduced glutathione (GSH) measurement

Reduced glutathione (GSH), an indicator of redox balance on tissues, was performed according to the method described by Sedlak and Lindsay (1968). GSH levels were determined with 5,5'-dithiobis 20-nitro benzoic acid in testis homogenate supernatant (50mg/mL), and evidenced by a yellow color formation. GSH levels were assayed at 412nm, and the results expressed in micromoles/mg of protein.

2.9. Morphometric and histopathological analysis

The testis were removed, fixed in Metacarn, embedded in Paraplast® and sectioned at 5µm. These sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined for general histopathological and morphometric analysis as described to Favareto et al. (2011).

2.9.1. Histopathological analysis in the testis

One hundred random testicular cross-sections per animal were examined using an Opton microscope (100X and 400X magnifications). The seminiferous tubules were divided into normal and abnormal, according to the cells present at the seminiferous tubules. The abnormal tubules were subdivided into: immature germ cells in the lumen, acidophilic cells and vacuolization.

Nuclei of Sertoli cells were counted in 10 seminiferous tubules (3 non-consecutive testis cross-sections) per rat (n = 10 animals/group) at stage VII of spermatogenesis, under a light microscope (Opton), at 1000 magnification.

2.9.2. Seminiferous tubule diameters and seminiferous epithelium height

Ten random testicular cross-sections were examined per animal in stage IX of the seminiferous epithelium cycle. For this, seminiferous tubule diameters were measured using an Opton photomicroscope (400X magnification) and BELview software (version 6.2.3.0 for Windows). The seminiferous epithelium heights were measured using the same tubules and methodology mentioned above. In each seminiferous tubule the mean of four measures for diameters and height was calculated and used in the statistical analysis.

2.9.3. Spermatogenesis kinetics

For this, one hundred random seminiferous tubular sections per animal were classified into four categories: stages I-VI, VII-VIII, IX-XIII and XIV of the seminiferous epithelium cycle, according to Leblond and Clemont (1952), using a light microscope (Opton) at 100X and 400X magnification.

2.10. Immunohistochemistry of Ki-67 in the testis

Histological sections of the testes were submitted to antigen recovery at 100°C in Tris / EDTA buffer pH 9.0 for 30 minutes. After washing in distilled water, sections were subjected to the blocking of endogenous peroxidase in hydrogen peroxide and methanol (3%) and blocking of nonspecific proteins (3% BSA + 1% goat serum in PBST). The immunohistochemistry for proliferative cells detection was then carried out using Ki-67 primary antibody (Abcam -Ab16667) diluted 1:100 when sections were incubated in antibody solution overnight at 4°C. After incubation with primary antibodies, cross-sections were washed with PBST (0,5% of triton plus PBS) and incubated for 2 hours with the secondary anti-rats antibody. After this period, the tissue was once again washed with PBST. The substrate for peroxidase Nova RED™ (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and cuts were finally counter-stained with hematoxylin. For final analysis one hundred random seminiferous tubular sections per animal were classified into marked and unmarked with Ki-67.

2.11. Statistical analysis

One-way ANOVA, with the *post hoc* Tukey test or the non-parametric Kruskal-Wallis test with the Dunn *post hoc*, according to the data distribution were utilized to compare the results among the experimental groups. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed by GraphPadInstat (version 3.01).

3. Results

3.1. Body, reproductive organ and liver weights

Body (initial and final), testis, seminal vesicles and vas deferens weights (absolute and relative) are shown in Table 1. There were no significant differences among the experimental groups for any of the parameters analyzed.

3.2. Sperm parameters: sperm number, daily sperm production and sperm morphology

The sperm number (C = 119.01 ± 8.55 ; BPA 20 = 125.54 ± 13.10 ; BPA 200 = $103.09 \pm 11.48 - \times 10^6$, mean \pm SEM) and daily sperm production (C = 19.51 ± 1.40 ; BPA 20 = 20.58 ± 2.14 ; BPA 200 = $16.90 \pm 1.88 - \text{days}$, mean \pm SEM) were not significantly different among the experimental groups. However, exposure to BPA at the two doses (20 and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) caused a significant increase in abnormal sperm compared to the control group ($p < 0.0001$). The major abnormalities found in this organ were head without the characteristic curvature (more than 4 times higher) and isolated tail (at least 7 times higher). There were no observed significant differences in relation to the BPA 20 and BPA 200 experimental groups. Quantitative data are summarized on Table 2.

3.3. Plasmatic testosterone and LH levels

Testosterone levels (C = 2.25 ± 0.78 ; BPA 20 = 2.91 ± 0.97 ; BPA 200 = $2.94 \pm 0.87 - \text{ng}/\text{ml}$) and LH plasmatic levels (C = 0.13 ± 0.02 ; BPA 20 = 0.16 ± 0.04 ; BPA 200 = $0.15 \pm 0.04 - \text{ng}/\text{ml}$) were not altered after exposure to either 20 or 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA doses.

3.4. Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) assay

The results of the MDA (C = 0.73 ± 0.04 ; BPA 20 = 0.64 ± 0.06 ; BPA 200 = 0.67 ± 0.06) and GSH (C = 111.68 ± 14.01 ; BPA 20 = 87.91 ± 5.90 ; BPA 200 = 102.37 ± 10.26 , mean \pm SEM) were not significantly different among the experimental groups. Thus, BPA did not cause detectable levels of lipid peroxidation or change the redox balance in the testes.

3.4. Histopathological analysis, spermatogenesis kinetics and Sertoli cells count

The histopathological analysis of the testes (Table 3, Fig 1) from animals exposed to BPA presented a significant increase in the number of abnormal tubules in relation to the control group ($p < 0.0001$). The number of seminiferous tubules with immature germ cells in the tubular lumen was statistically higher in the BPA 20 and 200 groups compared to the control group ($p < 0.0001$). However, the number of acidophilic cells was higher only in the BPA 20 group when compared to the control ($p < 0.05$). The number of tubules with vacuolization was not altered after bisphenol A exposure. The Leydig cells and interstitial connective tissue seemed to be uniform in size and shape in the three groups.

Moreover, there was a significant reduction in Sertoli cell number per seminiferous tubule (stage VII of spermatogenesis; Table 3).

The results of the spermatogenesis kinetics (Table 4) revealed significant reductions from stages IX - XIII in the BPA 200 group in relation to the control, which were not different from the BPA 20. On the other hand, there was a significant increase in stage XIV of spermatogenesis in the animals exposed to BPA at the

highest concentration (200 μ g/kg) ($p < 0.001$) compared to the control and BPA 20 groups.

3.5. Testicular morphometric analysis

The highest dose (200 μ g/kg) of BPA caused a significant increase in the seminiferous epithelium height compared to the control and BPA 20 groups. However the diameters of the seminiferous tubules were statistically similar among the experimental groups (Table 5).

3.6. Immunohistochemistry of Ki-67 in the testis

The quantitative immunohistochemical analysis (Fig 2) showed that BPA at a dose of 200 μ g/kg caused an increase in the number of Ki-67 labeled cells in the seminiferous tubule, indicating increased proliferation when compared with the control group ($p < 0.01$). In the qualitative analysis, the labeled germ cells represented spermatogonia and primary spermatocytes (Fig 3).

4.0. Discussion

Concern is lacking regarding the human health and environmental effects of BPA. This fact is probably due to the diversity of data presented on literature that describes a number of experimental effects in rats from such different ages and exposed to such different doses on such different ways. Thus, there is a very clear necessity of establishing, age, time of exposure and dose when contaminants are investigated.

Puberty is a period of changes between the juvenile period and adulthood in which there is an increase in gonadotropin secretion, stimulating the growth and

maturation of the testes (Sharpe, 2010). This period is considered an important phase in which several events occur such as a decrease in the proliferation and development of germ cells, an increase in testosterone levels and proliferation of Sertoli cells (Sharpe, 2010). Thus, peripuberty is an important window for the development of the male reproductive system, being susceptible to many endocrine disruptors that act by possibly mimicking hormones. These interferences can result in permanent changes when these individuals become adults (Chapin et al., 1997). The endocrine disruptor BPA was detected in the testes after oral administration (Miyakoda et al., 2000; Xiao et al., 2006) and it has been shown to be a potent inducer of adverse effects on fertility by interfering in the spermatogenesis process, such as production of androgens (Akingbemi et al., 2004), and Sertoli cell activity (Salian et al., 2009).

In the present study, the maintenance of body, testis, seminal vesicle and vas deferens weights is consistent with a previous study by Toyama et al. (2004) which used the same dose of BPA in adult rats. Heralth et al. (2004) used BPA (3mg/kg) in pubertal rats and Morgan et al. (2014) used 25 mg/kg of BPA in rats (120-150g) and also found no changes in testicular weight. This demonstrates that BPA cannot affect testicular weight. The maintenance of testicular weight found in the present study also is in accordance with the number and concentration of sperm in the testes as well as the daily sperm production. Recently Wisniewski et al. (2015) showed that BPA (5 and 25 mg/kg) caused a decrease in the sperm count and daily production in mice of PND 50, i.e., much higher doses than the ones used here.

The testosterone and LH plasma levels in the present study corroborate both with the weight of the reproductive organs and the study of Akingbemi et al. (2004). These authors did not observe changes in testosterone or plasma LH levels in rats

(DPN 21-35) subjected to BPA (10µg/kg, 100 and 200mg/kg). The author reports that this fact may be due to compensatory mechanisms that were activated *in vivo*. However, during development, estrogenic agents such as BPA may negatively regulate gonadal steroid hormone secretion (Akingbemi et al., 2004; Nanjappa et al., 2012), and could lead to epigenetic alterations, in which there is an increase in the expression of estrogen receptors (Bromer et al., 2010).

In the literature there are many reports that BPA exposure induces oxidative stress by generating reactive oxygen species in its metabolization (Kabuto et al., 2004; Richter et al., 2007; Aydogan et al., 2010), and that BPA can affect the biological metabolism of the redox control system, affecting the reproductive and sexual characteristics (Kabuto et al., 2004). These results were not found in the present study at 20 µg and 200 µg. Similarly, studies by Kabuto et al. (2003) showed that BPA (25 and 50mg/kg) did not alter the MDA levels, but caused a decrease in the levels of GSH in the testis. Morgan et al. (2014) demonstrated an increase in MDA levels and a decrease in GSH levels when rats (120-150g) were exposed to 25 mg/kg of BPA. It seems that very low doses are incapable to induce detectable levels of oxidative stress disturbance. It is worth noting that BPA is able to induce increased oxidative stress in very high doses, which do not reflect the reality of the exposure of the human population.

The alterations in the sperm morphology caused by BPA (head without characteristic curve and isolated tail), at both doses, may be associated with changes in the dynamics of spermatogenesis acting specifically on the process of spermiogenesis. Our data corroborate the results obtained by Chitra et al. (2003) who reported the presence of spermatozoa with abnormal morphology when rats (PND 45) were exposed to BPA (2 and 20µg/kg). The same results were observed by

Tamilselvan et al. (2014) using BPA 200 mg/kg for 30 days. BPA levels in urine were associated with a reduction in human semen quality, including damage to spermatozooids (Meeker, 2010). In this way, it seems that bisphenol A could have a direct effect on spermatid morphology since neither hormonal changes nor oxidative stress were not reported in this study.

Furthermore, a previous study showed that neonatal exposure to BPA (1-600µg/kg/day) has the potential to impair spermatogenesis (Toyama and Yuasa, 2004). These effects have been attributed to alterations caused in Sertoli cells since they form a blood-testis barrier (Toyama and Yuasa, 2004; Anahara et al., 2006). The disengagement of immature germ cells in the seminiferous tubules of rats exposed to BPA may be due to the effect on junction proteins of the Sertoli cells on the blood-testis barrier (Anahara et al., 2006). Fiorini et al. (2004) presented alterations in protein junctions of Sertoli cells (PJSC) when treated with BPA. The same results were also found by Salian et al (2009), where exposure to BPA altered the PJSC complex in neonatal rats. According to these findings, changes in PJSC complexes may be one of the possible mechanisms of the BPA, leading to the loss of immature germ cells in the seminiferous tubule lumen observed in this study. In addition, it seems reasonable to assume that the reduction of Sertoli cells number after BPA treatment, as evidenced in this study, could be the cause of alterations in the seminiferous tubules. Thus, bisphenol A could be able to block the proliferation of Sertoli cells, which would occur at this developmental period (Sharpe, 2010).

Alterations in the number of Sertoli cells and the blood-testis barrier may have led to decreased stages IX - XIII of spermatogenesis at a dose of 200µg BPA. Studies indicate that restructuring of the blood-testis barrier occurs from stage IX of the spermatogenesis cycle, maintaining the immunological barrier, in which also

occur the zonula of adherens junctions (Russel, 1997). Li et al. (2009) showed that BPA in postnatal rats (DPN 20) disrupted the integrity of the blood-testis barrier (*in vitro*) acting on the intercellular junction proteins of the Sertoli cells, indicating a greater susceptibility to BPA at this stage of spermatogenesis. Therefore, the data suggest that BPA can act on stage IX of spermatogenesis, altering the integrity of Sertoli cells and thereby rendering the cell stages IX - XIII more vulnerable to BPA.

Another toxic outcome of bisphenol at a dose of 200µg/kg was the higher cell proliferation in the germinal epithelium, confirmed by Ki-67 immunostaining, which led to a significant increase in height of the epithelium. Over a long period exposition, this event can form massif cell or genetically altered gametes. Schlessner (2009) also found an increase in the number of germ cells when neonatal rats were treated with 50 mg/kg of BPA. However he used a much higher dose than that of the present study.

5. Conclusion

We concluded that bisphenol A in very low doses, which reflect the reality of the exposure of the human population, can directly affect the development of the testes during the peripuberal period, since hormone levels and the redox profile were not affected. It is important to point out that the damage found in this study prejudiced sperm quality, possibly causing chromosomal or genetic alterations. Further studies are required to determine the time of prevalence of the alterations shown in the present study and whether they can affect embryonic or postnatal development.

6. REFERENCES

Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R., Hardy, M. P., 2004. 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*. 145, 592-603.

Anahara, R., Yoshida, M., Toyama, Y., Maekawa, M., Kai, M., Ishino, F., Toshimori, K., Mori, C., 2006. Estrogen agonists, 17 beta-estradiol, Bisphenol A, and diethylstilbestrol decrease cortactin expression in the mouse testis. *Arch. Histol. Cytol.* 69, 101–107.

Aydogan, M., Korkmaz, A., Barlas, N., Kolankaya, D., 2010. Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug Chem. Toxicol.* 33, 193–203.

Bakker, J., Biesenbeek, J., Boon, P., Bos, P., Broekhuizen, Geertsma, R., Geraets, L., Jong, W., Mennes, W., Paelm, N., Piersma, A., Schuur, G., Sjim, D., Ven, L., Verbist, k., Wouters, M., Zeilmaker, M. 2014. High-performance liquid chromatographic analysis of bisphenol A and 4-nonylphenol in serum, liver and testis tissues after oral administration to rats and its application to toxicokinetic study. National Institute of Public Health and the Environmental. Ministry of Health, Welfare and Sport.

Burridge E. 2003. Bisphenol A product profile. *European Chemical News*. 14–20.

Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L., Taylor, H. S., 2010. Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *FASEB J.* 24, 2273–2280.

Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., Needham, L. L., 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiaryoctylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 116, 39–44.

Castro, B., Sánchez, P., Torres, J. M., Preda, O., Moral, R. G., Ortega, E., 2013. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One.* 8, 55905.

Chapin, R. E., Harris, M. W., Davis, B. J., Ward, S. M., Wilson, R. E., Mauney, M. A., Lockhart, A. C., Smialowicz, R. J., Moser, V. C., Burka, T. L., Collins, B. J., 1997. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function. *Fund. Applied Toxicol.* 40, 138-157.

Chitra, K. C., Rao, K. R., Mathur, P. P., 2003. Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study. *Asian. J. Androl.* 5, 203-208.

El-Beshbishy, H. A., Aly, H. A. A., El-Shafey, M., 2015. Lipoic acid mitigates bisphenol A-induced testicular mitochondrial toxicity in rats. *Toxicol. Indust. Health.* 29, 875-887.

Favareto A. P., Fernandez, C. D., da Silva, D. A., Anselmo-Franci, J. A., Kempinas, W. de G., 2011. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic & Clin. Pharmacol. & Toxicol.* 109, 85–96.

Fernandes, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A., Barbisan, L. F., Kempinas, W. G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23, 106-112.

Fernandes, G. S., Fernandez, C. D., Campos, K. E., Damasceno, D. C., Anselmo-Franci, J. A., Kempinas, W. D., 2011. Vitamin C partially attenuates male reproductive deficits in hyperglycemic rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 100.

Fiorini, C., Mograbi, B., Cronier, L., Bourget, I., Decrouy, X., Ferrua, B., Malassine, A., Samson, M., Fenichel, P., Segretain, D. Pointis, G., 2004. Dominant negative effect of connexin33 on gap junctional communication is mediated by connexin43 sequestration. *J. Cell Sci.* 117, 4665-4672.

Gámez, J. M., Penalba, R., Cardoso, N., Ponzio, O., Carbone, S., Pandolfi, M., Scacchi, P., Reynoso, R., 2014. Low dose of bisphenol A impairs the reproductive axis of prepuberal male rats. *J. Physiol. Biochem.* 70, 239–246.

Ghiselli, G. E., Jardim, M, W. F. 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova.* 30, 695-706.

Heralth, C. B., Jin, W., Watanabe, G., Arai, K., Suzuki, A. K., Taya, K., 2004. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine*. 25, 163-172.

Johnson, L., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Scrutchfield, W. L., 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*. 7, 1199-1216.

Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., Shishibori, T., 2003. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Academic Press*. 93, 31-35.

Kabuto, H., Amakawa, M., Shishibori, T., 2004. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes under development of the brain and testis in mice. *Life Science*. 74, 2931-2940.

Leblond, C. P., Clermont, Y., 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.* 90(2), 167-215.

Li, M. W., Mruk, D. D., Lee, W. M., Cheng, C. Y., 2009. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *International J. Biochem. & Cell Biol.* 41, 2302-2314.

Matthews, J. B., Twomey, K., Zacharewski, T. R., 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors and . *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157.

Meeker, J. D., Ehrlich, S., Toth, L. T., Wright, D. L., Calafat, A. M., Trisini, A. T., Ye, X., Hauser, R., 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod. Toxicol.* 30, 532–539.

Michalowicz, J., 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicol. and Pahrmacol.* 37, 738-758.

Miyakoda, H., Tabata, M., Onodera, S., Takeda, K., 2000. Comparison of conjugative activity, conversion of bisphenol A to bisphenol A glucuronide, in fetal and mature male rat. *J. Health Science.* 46, 269-274.

Morgan, A. M., El-Ballal, S. S., El-Bialyc, B. E., EL-Borai, N. B., 2014. Studies on the potential protective effect of cinnamon against bisphenol A- and octylphenol-induced oxidative stress in male albino rats. *Toxicol. Reports.* 1, 92-101.

Nakamura, D., Yanagiba, Y., Duana, Z., Itoa, Y., Okamura, A., Asaeda, N., Tagawa, Y., Lic, C. M., Taya, K., Zhanga, S-Y., Naitoa, H., Ramghana, D. H., Kamijima, M., Nakajima, T., 2010. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicology.* 194, 16–25.

Nanjappa, M. K., Simon, L., Akingbemi, B. T., 2012. The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biol. Reprod.* 86, 131-112.

Quesnot, N., Bucher, S., Fromenty, B., Robin M., 2014. Modulation of metabolizing enzymes by bisphenol A in human and animal models. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1463-1473.

Ojeda, S. R., Andrews, W. W., Advis, J. P., White, S. S. 1980. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr. Rev.*, 1, 228-257.

Ojeda, S. R., Urbaniski, H. F. 1994. Puberty in the rat. In: Knobil E., Neil, J.D. (Eds). *Physiol. Reprod.* 1, 365-409.

Oliveira, F. J. A., Cecchini, R., 2000. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) Chagasi*. *J. Parasitol.* 86, 1067–1072.

Pasqualotto, F. F., Locambo, C. V., Athayde, K. S., Arap, S., 2003. Measuring male infertility: epidemiological aspects. *Revista Hospital Clínicas Faculdade Medicina Universidade São Paulo.* 58, 173-178.

Paugarten, F. J. R., 2003. Adverse health consequences of environmental exposure to 'endocrine disruptors'. *Annual Review of Biomedical Science.* 5, 45-55.

Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E., Vandenberg, J. G., Walser-Kuntz, D. R., VomSaal, F. S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* 199–224.

Robb, G. W., Amman, R. P., Killian, G. J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103-107.

Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M. J., Barceló, D., 2004. Monitoring of estrogens, pesticides 545 and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants 546 by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromat. A.* 1045, 85–92.

Russel, L. 1997. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.* 148, 313-328.

Sharpe, R. M. 2010. Development and maturation of the normal male reproductive system. In Woodruff TJ, Janssen SJ, Guillette LJ and Giudice LC, Eds. *Environmental impacts on reproductive health and fertility.*

Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., Aoki, Y., Yonemoto, J., Tohyama, C., 2001. Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at low dose. *J. Occup. Health.* 43,185–190.

Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009. Neonatal exposure of male rats to bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*. 265, 56-67.

Schlesser, H. N. Neonatal exposure to endocrine disruptors. 2009.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal.Biochem*. 25, 192-205.

Tohei, A., Suda, S., Taya, K., Hashimoto, T., Kogo, H., 2001. Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. *Experiment. Biol. Med*. 226, 216-221.

Tamilselvan, P., Langeswaran, K., Vijayaprakash, S., Kumara, S. G., Revathy, R., Balasubramanian, M. P., 2014. Efficiency of lycopene against reproductive and developmental toxicity of Bisphenol A in male Sprague Dawley rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 4, 491-498.

Toyama, Y., Yuasa, S., 2004. Effects of neonatal administration of 17 β -estradiol, estradiol 3-benzoate or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod. Toxicol*. 19, 181–188.

Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Maekawa, M., Ito, C., Toshimori, K., 2004. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Archiv. Histol. Cytol*. 67, 373-381.

Vanderberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., Soto, A. M., 2009. Bisphenol A and great divided: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endoc Rev.* 30, 75-95.

Vogel, S. A., 2009. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol A safety. *Am. J. Public Health.* 559–566.

VomSaal, F., Cooke, P., Buchanan, D., Palanza, P., Thayer, K., Nagel, S., Parmigiani, S., Welshons, W., 1998. 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. *Toxicol. Ind. Health.* 14, 239–260.

Xiao, Q., Li, Y., Ouyang, H., Xu, P., Wu, D., 2006. High-performance liquid chromatographic analysis of bisphenol A and 4-nonylphenol in serum, liver and testis tissues after oral administration to rats and its application to toxicokinetic study. *J. Chromatography B.* 830, 322-329.

Waissmann, W., 2002. Health surveillance and endocrine disruptors. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro:* v.18, mar./abr.

Wisniewski, P., Romano, R. M., Kizys, M. M. L., Oliveira, K. C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M. I., Dias-da-Silva, M. R., Romano, M. A., 2015. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology.* 51490, 1-9.

Legend of tables

Table 1

Reproductive organs and body weights.
Values expressed as mean \pm SEM.

^{a, b} Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$). ANOVA test, followed by Tukey's *post hoc* test.

Table 2

Sperm morphology
Values expressed as median [Q1 – Q3].

^{a, b} Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0,05$). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post test.

Table 3

Testicular histopathological analysis
Values expressed as mean \pm SEM. ^{a, b}

^{a, b} Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$). ANOVA test, followed by Tukey's *post hoc* test.

Table 4

Spermatogenesis kinetics
Values expressed as mean \pm SEM.

^{a, b} Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$). ANOVA test followed by Tukey's *post hoc* test.

Table 5

Seminiferous tubular diameters and seminiferous epithelium height.
Values expressed as mean \pm SEM.

^{a, b} Different letters indicate groups that differ statistically ($p < 0.05$). ANOVA test followed by Tukey's *post hoc* test.

Legend of figure

Figure 1 –Photomicrographs of testis: Control (A), BPA 20 (B and C) and BPA 200 (D) groups. (A) Normal aspect of the seminiferous epithelium; (B) Sertoli cell vacuolization; (C and D) Presence of immature germ cells in the lumen (asterisk). *It* = interstitial tissue; *L* = lumen; *Lc* = Leydig cells. Hematoxylin and eosin staining. X100 magnification.

Figure 2 – Quantitative analysis of immunohistochemistry for Ki-67.

*** Groups that differ statistically from control ($p < 0.001$) by One way ANOVA followed by Tukey's post test.

Figure 3 - Immunohistochemistry for Ki-67 on testis from Control (A and B), BPA 20 (C and D) and BPA 200 (E - H) groups. (A – D) Primary spermatocytes are the labeled cells (arrow). (E and F) Only spermatogonias are the labeled cells (head of arrow). (G and H) Note both type of cells, primary spermatocyte and spermatogonia, are labeled. 100X magnification (A, C, E, G) and 400X (B, D, F, H).

Table 1.

	Control	BPA 20	BPA 200
Initial body weight (g)	87.66 ± 3.14	88.59 ± 3.09	89.08 ± 2.56
Final body weight (g)	243.69 ± 8.13	227.79 ± 4.59	242.35 ± 5.79
Testis (g)	1.24 ± 0.03	1.17 ± 0.02	1.27 ± 0.03
Testis (g/100g)	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.00	0.53 ± 0.01
Seminal vesicle (full) (g)	0.57 ± 0.03	0.50 ± 0.04	0.58 ± 0.04
Seminal vesicle (full) (g/100g)	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.01
Seminal vesicle (empty) (g)	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02
Seminal vesicle (empty) (g/100g)	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.00
Vas deferens (g)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Vas deferens (g/100g)	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00

Table 2.

	Control	BPA 20	BPA 200
Normal morphology	77.8 [72.75 – 81.05] ^a	39.15 [30.62 – 47.5] ^b	32.1 [6.5 - 49] ^b
Abnormal morphology	22 [18.5 – 27.37] ^a	61 [52.75 – 69.37] ^b	67.85 [51 – 93.5] ^b
Isolated head	10.37 [6 -11.87] ^a	11.4 [7.37 – 14.12] ^a	7.5 [3.37 – 12.5] ^a
Head without characteristic curvature	8.05 [7.25 – 12.62] ^a	37.2 [30.37 – 44.75] ^b	32.6 [21.25 – 41.25] ^b
Isolated tail	1.45 [0 – 3.87] ^a	10.5 [0.85 – 27.5] ^b	23.1 [3.37 – 47.12] ^b
Broken tail	3.02 [2 – 3.95] ^a	1.75 [0.5 - 2.37] ^a	4,40 [0.87 – 6.12] ^a

Table 3.

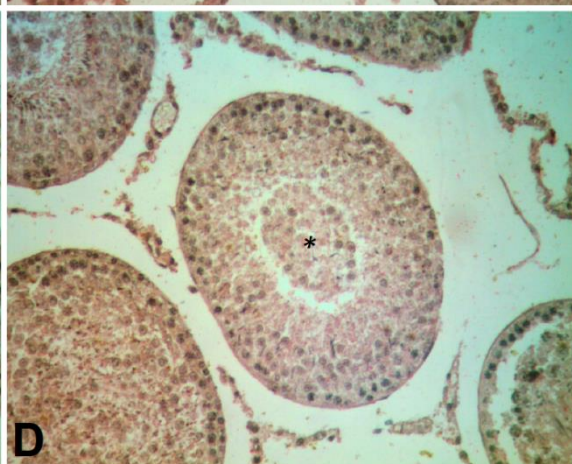
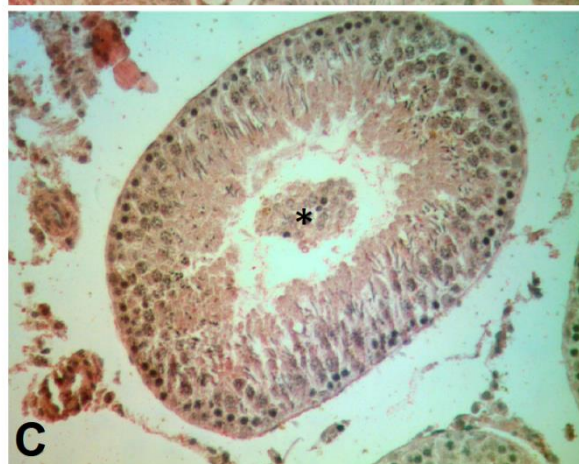
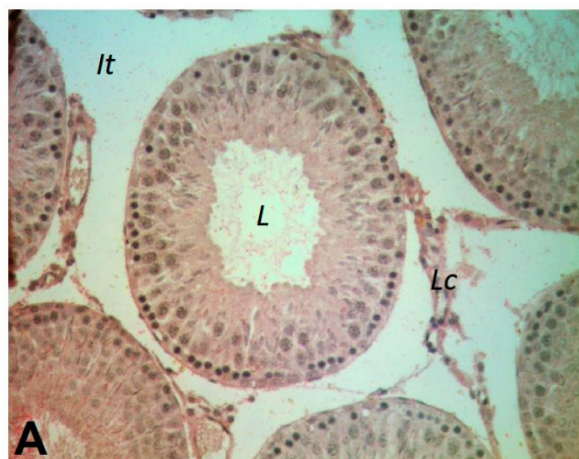
	Control	BPA 20	BPA 200
Normal tubules	90.6 ± 1.69 ^a	64.8 ± 3.35 ^b	66.2 ± 1.39 ^b
Abnormal tubules	9.4 ± 1.69 ^a	35.2 ± 3.35 ^b	34 ± 1.65 ^b
Immature germ cells in the lumen	1.8 ± 0.58 ^a	20.6 ± 3.28 ^b	22.2 ± 2.08 ^b
Acidophilic cells	0.00 ± 0.00 ^a	3 ± 0.77 ^b	1.2 ± 0.48 ^a
Vacuolization	7.6 ± 1.16 ^a	11.2 ± 1.35 ^a	10.4 ± 1.28 ^a
Sertoli cell number per seminiferous tubule	28.5 ± 0.45 ^a	16.98 ± 0.51 ^b	17.34 ± 0.51 ^b

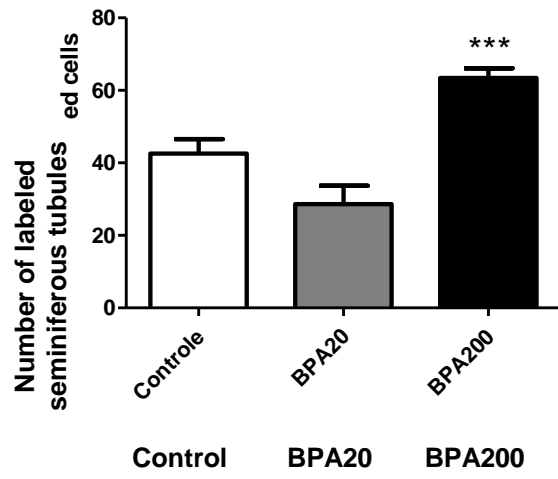
Table 4.

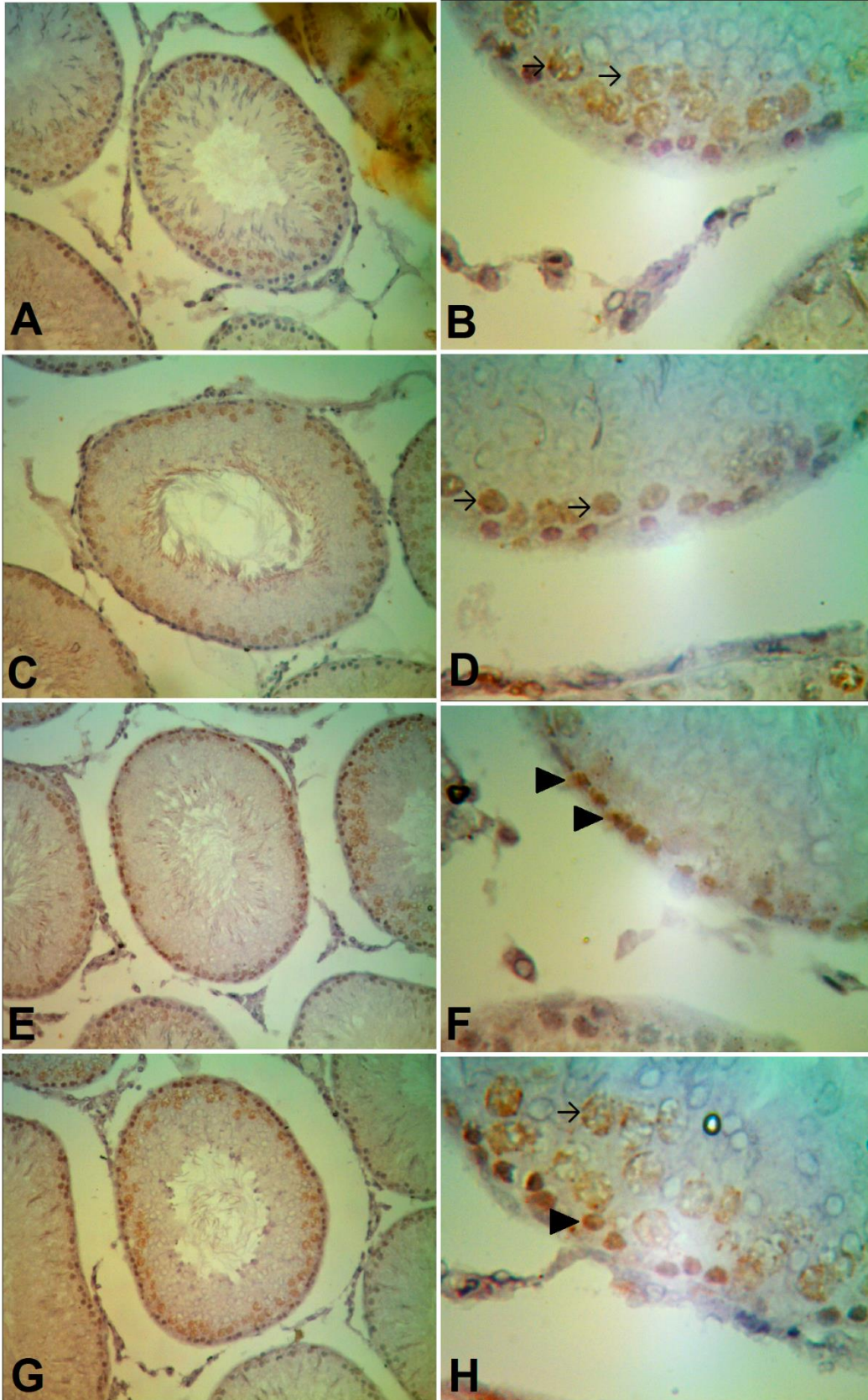
	Control	BPA20	BPA200
I – VI	37.6 ± 2.11^a	38.8 ± 0.80^a	31 ± 3.16^a
VII – VIII	45 ± 1.87^a	44.4 ± 2.29^a	$50.8 \pm 3,24^a$
IX – XIII	11 ± 1.04^a	$9.6 \pm 0.40^{a,b}$	$7.8 \pm 0,73^b$
XIV	4.4 ± 0.4^a	5.2 ± 1.31^a	10.4 ± 0.2^b

Table 5.

	Control	BPA 20	BPA 200
Seminiferous tubules diameters	273.45 ± 2.96 ^a	276.54 ± 2.90 ^a	271.56 ± 2.78 ^a
Seminiferous epithelium height	85.58 ± 1.07 ^a	87.75 ± 1.07 ^a	91.55 ± 1.03 ^b







6. ARTIGO 2

Exposição ao Bisfenol A altera o desenvolvimento pós-natal do epidídimo em ratos na peripuberdade em associação com a inflamação

Bisphenol A exposure alters postnatal development of the epididymis in peripubertal rats in association with inflammation

Este Artigo será submetido à revista Toxicology Letters

Bisphenol A exposure alters postnatal development of the epididymis in peripubertal rats in association with inflammation

Fernanda M. Ogo^{1,2}, Gláucia E. M. L. Siervo^{1,2}, Larissa Staurengo-Ferrari², Leonardo O. Mendes³, Nicla R. Luchetta¹, Henrique R. Vieira^{1,2}, Victor Fattori², Waldiceu A. Verri, Jr², Wellerson R. Scarano³, Glaucia S. A. Fernandes^{1*}

1 - Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

2- Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

3 - Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

***Corresponding author**

Tel.: +55 43 33714417

E-mail address: glaura@uel.br (G.S. A Fernandes)

Abstract

Bisphenol A (BPA) is a synthetic non-steroidal estrogen widely used in the production of plastic products which can be released into the environment, and ingested. BPA can cause alterations in the endocrine system of humans and animals at varied stages of development. Puberty is characterized by a period of many morphological, hormonal and behavioral changes, during which the completion of the development of organs such as the epididymis also occurs. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of BPA on the postnatal epididymal development of rats during the peripubertal period. For this study, male Wistar rats, 36 PND (postnatal days) were weighed and randomly distributed into three groups: control group that received vehicle (corn oil and 1% DMSO), and two groups were treated with BPA (20 µg /kg or 200 µg/kg). Rats were treated during 30 consecutive days via gavage. Feed and water were provided *ad libitum*. Rats (66DPN) were anesthetized with a combination of xylazine and ketamine and euthanized through cardiac puncture in the 31st experimental day. The epididymis were removed, weighed, divided into caput/corpus and cauda sections, and used for sperm count, histopathological and stereological evaluation, inflammatory cell profile (myeloperoxidase activity - MPO and N-acetylglucosaminidase - NAG), immunohistochemistry for IL-6 and evaluation of anion superoxide levels and malondialdehyde (MDA). The results showed that exposure to BPA did not affect the epididymal weight, sperm count, sperm transit, anion superoxide levels or MDA. MPO activity in the caput/corpus and cauda regions of the epididymis revealed a significant increase with the dose of 200 µg/kg, compared to the other experimental groups. However, the NAG activity in both the caput/corpus and cauda of the

epididymis was similar in all the experimental groups. Associated with this, an increase was observed in labeling intensity for IL-6 at both doses of BPA. Under these experimental conditions, it is concluded that BPA alters postnatal epididymal development evidenced by the onset of inflammation and remodeling of tissue components, which can cause epididymitis and alter the sperm maturation process, consequently reducing the breeding capacity of the individual.

Keyword: bisphenol A, epididymis, inflammatory, peripubertal period, rats

Abbreviations: PND, post natal day; C, Control group; BPA20, Bisphenol A 20µg/kg, BPA200, Bisphenol A 200µg/kg, MDA, malondialdehyde; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; TBA, thiobarbituric acid; DSP, daily sperm production; ER α , estrogen receptor alfa; ER β , Estrogen receptor beta; AR, androgen receptor; MPO, Myeloperoxidase, NAG, N-acetyl-b-D-glicosaminidase.

1. Introduction

Many exogenous agents interact with the human organism, and some of them can impair body varied functions (Schiavini et al., 2011). Bisphenol A (BPA, 4,4-dihydroxy-2,2-diphenylpropane) is an example of such agents. BPA is considered a non-steroidal synthetic estrogen widely used in the production of polycarbonate plastic and as an additive to other types of plastics. BPA is a component of daily products including dental sealants components, interior lining of food cans, and baby products (baby bottles, cups) (Groff, 2010). Heating, acidic and basic conditions accelerate ester hydrolysis bond that connects monomers of BPA leading it's to the release (Burrige, 2003). One of the most prominent consequences of BPA is the potent endocrine disruption (Maffini et al., 2006).

It is known that BPA exerts its effects at very low doses similar to values reached in environmental exposure (VomSaal, 2005). The accumulation of BPA in the male reproductive system generates clinical implications since exposure to low doses of BPA during the fetal period has been shown to decrease the efficiency in sperm production in male rats offspring (VomSaal et al., 1998).

Exposure to one or more endocrine disruptors in the postnatal phase can cause temporary or even permanent damage to the male reproductive system. In this context the peripubertal period (PND36-66) is a large window of vulnerability to the action of toxic agents (Johnson et. al., 1997). In this period the maturation of the hypothalamic pituitary testicular initiates and consequently the start of the reproductive cycle (Ojeda; Urbanski, 1994). Evidence shows that BPA exerts many effects on the male reproductive system with prominent role in the decline in the quality and quantity of human semen (Colborn et al.,

2003). It has been shown that BPA (20ug / kg) causes a decrease in epididymal weight in male rats with 45PND (Chitra et al., 2003). In addition, BPA causes a decrease in sperm counts and motility in the epididymis in concentrations as low as 10ug / kg in rats (PND56) during six consecutive days (Tiwari, Vanage, 2013).

ROS play an important role in the defense against pathological conditions, however, their excessive generation of oxygen free radicals can cause tissue damage (Kitas et al., 1991). BPA has the ability to induce the production of ROS (reactive oxygen species) leading to oxidative stress, tissue injury and cell death (Ho et al., 1998). There is evidence that the presence of high levels of ROS leads to lipid peroxidation of the sperm membrane, which can decrease motility (Irvine, et al., 2000), the melting capacity with the oocyte (Aitken, 1994) and sperm capacitation (Aitken et al., 2004). The toxicity ROS in mammals has been related to increased hydroxyl radical formation and decreased levels of endogenous antioxidants in the epididymal tissue of rats (Richter et al., 2007). Chitra et al. (2003) also observed diminishing of antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation and hydrogen peroxide in the epididymis at a dose of 20ug/kg of BPA.

Furthermore, BPA (2.5 and 3.0ug/kg/day) can modulate the immune function in relation to the production of cytokines and antibodies (Sawai et al. 2003; Yoshino, et al., 2003). BPA at a dose of 5mg/kg/day subcutaneously for 5 days in adult rats caused significantly decreases in the innate host response and IL-6 production (Sugita-Konishi et al., 2003). It also interferes with the acquired immunity causing an increase of Th1 response in a dose 30µg/kg/day of BPA in adult male rats DBA1/J characterized by increased concentration of

IFN- γ (Yoshino et al., 2003). In contrast, 25mg BPA results in a significant increase of Th2 response characterized by increased IL-4 production (Lee et al., 2003). These contrasting effects might be a result of the dose and time of exposure to BPA. Additionally, BPA binds to estrogen receptors and the expression of estrogen receptors by lymphocytes depends on age and strain (Lamason et al., 2006).

Despite the information presented above, it remains to be determined the effects of BPA in the epididymal in postnatal conditions and inflammatory status. Therefore, the present study evaluated the effects of BPA in the postnatal development of epididymis during the peripuberal period of rats.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Male rats of Wistar strain (30 days old) were provided by the Central Animal House, Londrina State University (CCB-UEL), Paraná, Brasil. Animals were acclimated to the new environment for five days before the beginning of the experimental period. During the experiment, animals were allocated in polypropylene cages (43 x 30 x 15 cm) under light and dark (12 h light/dark photoperiod, lights switched off at 07:00 am), and controlled temperature ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) and provided with standard commercial laboratory chow and tap water *ad libidum*. Experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on Animal Use of State University of Londrina (CEUA/UEL protocol number 10156.2013.59).

2.2 Experimental design

Male rats (PND 36) were randomly assigned to three experimental groups of 15 animals each: Control (C), Bisphenol A 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BPA 20) and Bisphenol A 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BPA 200). These doses were selected according to Toyama et al. (2004) and administered from PND 36 to PND 66; peripubertal period according to Ojeda et al. (1980). Thus, the animals were orally treated (gavage) with 20 or 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight of BPA (CAS no. 80-05-7, Sigma-Aldrich Co®, USA) diluted in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO)/ 99% corn oil-vehicle, or alone solution vehicle to control group. LD50 value of BPA is 2 g/kg in male rats (Bakker et al., 2014). Therefore, BPA doses used in this study were considered as low doses.

2.3 Preparation of solution of Bisphenol A

Bisphenol A (BPA, 4,4'-di-hidroxi-2,2-difenilpropano) of purity was obtained from (CAS no. 80-05-7) Sigma-Aldrin Co®, USA. BPA was dissolved in DMSO and solubilized in corn oil and stored protected from light.

2.4 Epididymis collection

At the end of treatment, rats were anesthetized with a combination of ketamine (Sedomin® 10%, Avellaneda, Argentina) and xylazine (Anasedan®, Paulínia, Brazil), weighed and killed. Epididymis was removed and their weight (absolute and relative to body weight) was determined. Epididymis were used for sperm counts (n=7/group), inflammatory profile (n=05/group), oxidative stress evaluation (superoxide anion and MDA levels; n=05/group), and histopathological, immunohistochemistry and stereological analysis (n=5/group).

2.5 Sperm count and sperm transit time in epididymis

The epididymis was used to count spermatozoa according to the method described by Robb et al. (1978) with the adaptations described by Fernandes et al. (2007). Epididymis were weighed soon after collection followed by homogeneization in 5 mL of NaCl 0.9% containing Triton X 100 0.5% (SIGMA, St. Louis, USA) and sonication for 30 s. After 10-fold dilution, sample was transferred to Neubauer chambers and late spermatozoa were counted (4 field per animal). To calculate sperm transit time through the epididymis, the number of sperm in each portion was divided by DSP (daily sperm production).

2.6 Histopathological and stereological analysis

The epididymis was removed, fixed in METACAN, embedded in Paraplast® and sectioned at 5 µm, these sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and underwent general histopathological examination as described by Favareto et al., 2011.

Histopathological inspection was performed qualitatively in caput-corporis and cauda. The duct of epididymis (caput-corporis) was evaluated per animal using Opton microscope (100X and 400X magnification).

For stereological analysis of the epididymis, 10 random epididymal cross-sections per animal were captured and analyzed. This analysis was performed by means of Weibel's multipurpose graticulate, with 120 points and 60 test lines to compare the relative proportion among the epididymal compartmental (epithelial, stroma and lumen) in the experimental groups.

2.7. Myeloperoxidase (MPO) activity

The neutrophil recruitment to the epididymis was evaluated by MPO kinetic-colorimetric assay (Bradley et al., 1982; Casagrande et al., 2006). First epididymis were separated at caput/corporis and cauda and were homogenized using a Tissue Tearor (Biospec) in ice-cold K₂HPO₄ buffer (400 µL, 50 mM, pH 6.0) containing HTAB (0.5% weight/volume), and the homogenates were centrifuged (16,100g 2 min 4 C). The supernatants (30 µL) were mixed with K₂HPO₄ buffer (200 µL, 50 mM, pH 6.0) containing *o*-dianisidine dihydrochloride (0.0167%, weight/volume) and hydrogen peroxide (0.05%, volume/volume). The absorbance was determined after 5 min at 450 nm (Multiskan GO

ThermoScientific). The results of MPO activity are expressed as the number of neutrophils per mg of tissue by using a standard curve of neutrophils (196–400,000 cells).

2.8 N-acetyl-b-D-glicosaminidase (NAG) activity

The determination of NAG activity at epididymis was performed as previously described (Hohmann et al., 2013). Briefly, the supernatants (20 μ L), obtained in the MPO activity assay, were placed in a 96-well plate and mixed with K_2HPO_4 buffer (80 μ L, 50 mM, pH 6.0). The reaction was initiated by the addition of K_2HPO_4 buffer (100 μ L, 50 mM, pH 6.0) containing 4-nitrophenyl N-acetyl-b-D-glicosaminidase substrate (2.24 mM). The plate was incubated at 37° C for 10 min, and glycine buffer (100 μ L, 0.2 M pH 10.6) was added. The enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO ThermoScientific). The results of NAG activity are expressed as the number of macrophages per mg of tissue by using a standard curve of macrophages (196–400,000 cells).

2.9 Quantification of superoxide anion

Superoxide anion production was evaluated in tissue homogenates as previously described (Hohmann et al., 2013). Briefly, the homogenates (50 μ L) were mixed with NBT solution (100 μ L, 0.1% in ddH₂O, weight/volume) and incubated in 96-well plates at 37° C for 1 h. The aqueous mixture was removed carefully from the wells, and the formazan precipitate was solubilized by adding KOH (120 μ L, 2 M) and DMSO (140 μ L) solutions in each well. The absorbance was measured at 600 nm (Multiskan GO Thermo-Scientific). The weight of each

sample was used for data normalization, and the results are expressed as NBT reduction (OD at 600 nm).

2.10 Lipid peroxidation measurement by malondialdehyde (MDA) formation

One mL of reaction medium containing 1 % TBA was added to samples to form MDA-(TBA)₂ complexes, and the proteins were precipitated with 1 mL of 28 % trichloroacetic acid. Samples were mixed by vortexing, incubated for 15 min in a boiling water bath, and transferred to an ice bath. The organic phase was extracted with 2 mL of butanol and centrifuged at 850×g for 20 min. The supernatants were read in a spectrophotometer at 535 and 572 nm, and results were calculated based on the difference in absorption at these wavelengths and expressed as MDA (μmol/mg of protein).

2.11 IL-6 immunohistochemistry detection in the epididymis

Silanized slides containing 5 microns sections (2 slides per animal 5 animals per group) underwent deparaffinization process, and the sections were rehydrated in alcohol series, and to display and antigen retrieval were incubated in citrate buffer 0.01M at pH 6.0 for air in a microwave for 30 minutes. Afterwards, sections were incubated in 3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase and nonspecific binding was blocked by incubating the sections in blocking solution at room temperature. Primary polyclonal Abcam AB6672 antibody for the IL-6 was diluted in 1% BSA (1:200) and applied to the sections overnight at 4°C. Bound antibody was detected with Novolink Polymer Detection Systems (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Secondary labeled polymer (Rabbit-on-Rodent HRP Polymer – Biocare Medical) was

applied for 30 min at room temperature. Peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen mixture (Novolink Polymer Detection Systems). Sections were lightly counterstained with Harris' hematoxylin and photographed with a Opton photomicroscope (100x magnification) and BELview software (version 6.2.3.0 for Windows). Epididymal sections were available qualitatively.

2.11 Statistical analysis

Parametric results were statistically analysed by one-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey test. Non-parametric results were statistically analysed by Kruskal-Wallis test with the Dunn *post hoc*. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed by GraphPad InStat (version 3.01).

3.0 Results

3.1 Weight of epididymis, sperm number and sperm transit time in the epididymis

Exposure to BPA did not significantly alter the epididymal weight among the experimental groups (C = 0.29 ± 0.01 , BPA20 = 0.29 ± 0.00 , BPA 200 = 0.30 ± 0.01 – Mean \pm SEM). The table 1 shows the results from sperm count, sperm concentration and sperm transit through the epididymal portions caput/corpus and cauda. BPA did not alter sperm count, sperm concentration and sperm transit (Table 1).

3.2 Histopathological and stereological analysis of the epididymis

The qualitative analysis of the epididymal histopathology (Figure 1) showed an increase of the inflammatory infiltrate in stroma and epididymal lumen in BPA200 group compared to vehicle and BPA20 groups (Figure 1). Furthermore, it was observed the presence of around cells, immune system cells and multinucleated cells in the epididymal lumen, in addition to sperm, in both BPA20 BPA200 groups, predominantly in the caput/corpus region while in the control group these cells were not observed. The epithelial tissue appeared to be normal in all the groups.

The stereological analysis (Table 2) showed that BPA in both dose caused a significant increase in the epithelial compartmental while the higher dose caused a significant decrease in stroma compartmental from 2A caput/corpus region compared to control group. Moreover, in 5A/B cauda region BPA200 caused a significantly increased of the epithelial compartmental, but the lumen significantly decreased compared to the control.

3.3 Inflammatory profile: myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl-b-D-glicosaminidase (NAG) activity

The MPO activity in the regions caput/corpus and cauda from epididymis revealed a significant increase at 200µg/kg BPA in relation to other experimental groups (Figure 2 A-B). On the other hand, NAG activity was not altered in the epididymal caput/corpus and cauda compared to vehicle group (Figure 2 C-D).

3.3.1 Quantification of superoxide anion and malondialdehyde (MDA)

Both doses of BPA did not alter the levels of anion superoxide (Figure 3 A-B) and MDA (Figure 3 C-D) in the epididymal compartments caput/corpus or cauda compared to vehicle group.

3.4 Immunohistochemical detection of IL-6

The immunoreactivity for IL-6 was stronger in the epididymal epithelium cells (caput/corpus and cauda) in both BPA doses (Figure C-E) compared to control group , staining was moderate (Figure 4 A-B).

4. Discussion

Environmental contaminants such as BPA (Wetherill et al., 2007) can be harmful to human reproduction system (Mantovani, 2006). The present data demonstrate that BPA alters postnatal epididymal development related to inflammatory response and tissue remodeling, which can cause epididymitis and alter the sperm maturation process, consequently reducing the breeding capacity of rats.

In vitro studies have demonstrated a variety of molecular pathways by which BPA can trigger a cellular response. As it is considered a non-steroidal estrogen, BPA exerts its effects through the estrogen receptors (ER) (Matthews et al., 2001). Thus, it can act by mimicking, amplifying or inhibiting estrogen activity, and may also act as an antagonist of androgens (Wetherill et al., 2007). It is known that differentiation of specific regions of the epididymis occurs during the postnatal development of the organ, from postnatal days (PND) 15-44 under the influence of androgens (Turner et al., 2003). In this period the participation of ER α and ER β also occurs (Zaya et al., 2012). Thus any oscillation or even

androgenic and estrogenic interference during this period can prejudice epididymal development and reduce fertility.

The maintenance of epididymal weight, sperm count and transit in the epididymis (caput/corpus and cauda) corroborate each other. In contrast, Chitra et al. (2003) observed a decrease in the epididymal weight of pubescent rats (DPN45) exposed to BPA20 μ g/kg. Similarly, Wisniewski et al. (2015) observed slow sperm transit throughout the epididymis when rats were exposed to high doses of BPA (5 and 25mg/kg) over a period of 40 days.

Although the weight of this organ was not altered, the stereological analysis demonstrated that the highest dose prejudiced epididymal development, since it caused remodeling of proportions of epididymal compartments, principally the epithelial. It has been suggested that BPA is connected to estrogen receptors (ER) (Matthews et al., 2001) or antagonizes the effects of androgens as described for the prostate (Wetherill et al., 2002). ER α and ER β are expressed from DPN21 to adulthood, aiding in epididymal development (Zaya et al., 2012).

The presence of rounded cells in the lumen of the epididymal duct of animals exposed to BPA could be cells that have broken off the epididymal epithelium or immature germ cells originating from the testicle. Although the origin of these cells is not known, data not yet published from our laboratory demonstrated the presence of rounded cells in the lumen of the seminiferous tubules of male rats (PND 67) exposed to BPA. This hypothesis is also suggested for the origin of multinucleate cells; however they could have originated from mutations. Tiwari et al. (2013) found DNA damage in sperm and germ cells after exposure to BPA. The immune system cells present in the

lumen of the epididymal duct may have originated from the stroma where inflammatory cell infiltrates were detected only at the highest dose of BPA. According to Naito et al. (2013) many inflammatory cells emigrated into the lumen of the epididymis of neonatal mice (3 weeks) exposed to 17- β -estradiol cypionate for 8 weeks.

Although there are no previous studies evaluating the inflammatory profiles in the epididymis after exposure to BPA, Brandt et al. (2014) showed multifocal inflammatory infiltrate in the ventral prostate of rats exposed to 25 and 250 μ g/kg BPA from gestational day (GD) 10 until GD21. In this context, we found that the higher dose of BPA tested caused significant neutrophil recruitment, as evidenced by higher MPO activity, indicating the presence of acute inflammatory response. This event may compromise epididymal development and the fertile capacity of the individual and lead to epididymitis. Macrophages are often observed in both the epithelium and in the interstitial tissue of the epididymis and are commonly identified as epithelial cells of halo sections (Dym and Romrell, 1975; Ritchie et al, 1984; Flickinger et al, 1997; Serre and Robaire, 1999). Resident macrophages upon stimulation produce cytokines such as IL-6, IL-8, which assist in neutrophil recruitment (Colic et al., 2010) playing an important role in the regulation of responses to antigens in the microenvironment. Naito et al. (2013) also observed inflammatory neutrophils and macrophages in the epididymis in neonatal mice exposed to β -estradiol 17-cypionate (0.02mL). indicating a chronic inflammation. In the present study was not observed change in the activity of macrophages, neutrophils just, showing that BPA exposure for 33 days caused acute phase of inflammation Furthermore, the high intensity of immunostaining for IL-6 in animals exposed to

BPA confirms and corroborates the present study regarding results of histopathology and MPO activity, Since IL-6 is an acute-phase proinflammatory cytokine that participates in neutrophil chemotaxis directly, or may induce production of mediators that are direct neutrophil chemoattractants in these inflammatory processes (Heinrich et al., 1990; Sato et al., 1996).

5. Conclusion

BPA alters postnatal epididymal development in rats during the peripubertal period, which may lead to alterations in sperm maturation and consequently fertility. Our data confirm that the peripubertal period is a period of extreme sensitivity to endocrine disruptors such as BPA, even at low doses. However, due to the lack of previous studies on the subject, future studies should be conducted to determine the mechanisms by which BPA causes the alterations found and whether they are persistent.

6. References

Aitken, R. J. 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Devel.* 6, 19-23.

Aitken, R. J., Ryan, A. L., Baker, M. A., Mc Laughlin, E. A. 2004. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Rad. Biol. Med.* 82, 1684-1686.

Bakker, J., Biesenbeek, J., Boon, P., Bos, P., Broekhuizen, ., Geertsma, R., Geraets, L., Jong, W., Mennes, W., Paelm, N., Piersma, A., Schuur, G., Sjim, D., Ven, L., Verbist, k., Wouters, M., Zeilmaker, M. 2014. High-performance liquid chromatographic analysis of bisphenol A and 4-nonylphenol in serum, liver and testis tissues after oral administration to rats and its application to toxicokinetic study. National Institute of Public Health and the Environmental. Ministry of Health, Welfare and Sport.

Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., Rothstein, G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206-209.

Brandt, J. Z., Silveira, L. T. R., Grassi, T. F., Anselmo-Franci, J. A., Fávoro, W. J.; Felisbino, S. L., Barbisana, L. F., Scarano, W. R. 2014. Indole-3-carbinol attenuates the deleterious gestational effects of bisphenol A exposure on the prostate gland of male F1 rats. *Reprod. Toxicol.* 43, 56-66.

Burridge E. 2003. Bisphenol A product profile. *European Chem. News.*14–20.

Casagrande, R., Georgetti. W. A., Verri Jr, W. A., Dorta, D. J. dos Santos, A. C., Fonseca, M. J. 2006, Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol.* B84, 21-27.

Chitra, K. C., Rao, K. R., Mathur, P. P. 2003. Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study. *Asian J. Androl.* 5, 203-208.

Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*101, 378-384.

Colic, M., Gazivoda, D., Vasilijic, S., Vucevic, D., Lukic, A. 2010. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in peripical lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 39, 690-696.

Dym, M., Romrell, L. J. 1975. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J. Reprod. Fertil.* 42, 1–7.

Favareto A. P., Fernandez, C. D., da Silva, D. A., Anselmo-Franci, J. A., Kempinas, W. de G., 2011. Persistent impairment of testicular histology and

sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic & Clin. Pharmacol. & Toxicol.* 109, 85–96.

Fernandes, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D., Mercadante, A., Barbisan, L. F., Kempinas, W. G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23, 106-112.

Flickinger, C. J., Bush, L. A., Howards, S. S., Herr, J. C. 1997. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat Rec.* 248, 380–390.

Groff, T. 2010 Bisphenol A: invisible pollution. *Current Opinion in Pediatrics.* 22, 524-529.

Heinrich, P. C., Castell, J. V., Andus, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265, 621-636.

Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Gargano, M., Cao, J., 1998. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ. Health Perspect.* 106, 1219-1228.

Hohmann, M. S. N., Cardoso, R. D. R., Pinho-Ribeiro, F. A., Crespigio, J., Cunha, T. M., Alves-filho, J. C., da Silva, R. V., Pinge-Filho, P., Ferreira, S. H., Cunha F. Q., Casagrande R., Verri Jr, W. A. 2013. 5-Lipoxygenase deficiency

reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *BioMed Research International*. 13.

Irvine, D. S., Twigg, J., Gordon, E., Fulton, N., Milne, P., Aitken, R. J. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *J. Androl*. 21, 33-44.

Johnson, L., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Scrutchfield, W. L. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*. 7, 1199-1216.

Kitas, G.D., Salmon, M., Young, S.P., Bacon, P.A., 1991. Effects of hydrogen peroxide on lymphocyte receptor functions. *Molecular Aspects of Medicine*. 12, 149-159.

Lamason, R., Zhao, P., Rawat, R., Davis, A., Hall, J., Chae, J., Agarwal, R., Cohen, P., Rosen, A., Hoffman, E. P., Nagaraju, K. 2006. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunology*. 7, 1472.

Lee, M. H., Chung, S. W., Kang, B. Y., Park, J., Lee, C. H., Hwang, S. Y., KIM, T. S. 2003. Enhanced interleukin-4 production in CD4⁺ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²⁺. *Immunology*. 109, 76–86.

Manffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Soto, A. M. 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of Bisphenol-A. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179-186.

Mantovani, A. 2006. Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1076, 239–252.

Matthews, J. B., Twomey, K., Zacharewski, T. R. 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors and . *Chem Res Toxicol.* 14, 149–157.

Naito, M., Hirai, S., Terayama, H., Qu, N., Hayashi, S., Hatayama, N., Kawamura, H., Nakano, T., Itoh, M. 2013. Neonatal estrogen treatment with b-estradiol 17-cypionate induces in post-pubertal mice inflammation in the ductuli efferentes, epididymis, and vas deferens, but not in the testis, provoking obstructive azoospermia. *Med. Mol. Morphol.* 47, 21-30.

Ojeda, S. R., Andrews, W. W., Advis, J. P., White, S. S. 1980. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr. Rev.*, 1, 228-257.

Ojeda, S. R., Urbaniski, H. F. 1994. Puberty in the rat. In:Knobil E., Neil, J.D. (Eds). *Pysiol. Reprod.* 1, 365-409.

Oliveira, F. J. A., Cecchini, R. 2000. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) Chagasi*. *J. Parasitol.* 86, 1067–1072.

Ritchie, A. W., Hargreave, T. B., James, K., Chisholm, G. D. 1984. Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens? *Br. J. Urol.* 56, 79–83.

Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E. Vandenberg, J. G., Walser-Kuntz, D. R., Vom Saal, F. S. 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* 199–224.

Robb, G. W., Amman, R. P., Killian, G. J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103-107.

Sato, M., Sawamura, D., Ina, S., Yaguchi, T., Hanada, K., Hashimoto, I. 1999. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 400-404.

Sawai, C., Anderson, K., Walser-Kuntz, D. 2003. Effect of bisphenol A on murine immune function: Modification of interferon- γ , IgG2a, and disease symptoms in NZB×NZW F1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 1883–1887.

Schiviani, J. A., Cardoso, C. E., Rodrigues, W. C. 2011. Desreguladores Endócrinos no meio ambiente e o uso de potenciais bioindicadores. Revista Eletrônica TECCEN. 3, 33-48.

Serre, V., Robaire, B. 1999. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. Biol. Reprod. 61, 705–714.

Sugita-Konishi, Y., Shimura, S., Nishikawa, T., Sunaga, F., Naito, H., Suzuki, Y. 2003. Effect of Bisphenol A on non-specific immune defenses against non-pathogenic Escherichia coli. Toxicol. Letters. 136, 217– 227.

Tiwari, D., Vanage, G. 2013. Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. Reprod. Toxicol. 40, 60-68.

Turner, T. T., Bomgardner, D., Jacobs, J. P., Nguyen, Q. A. 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. Reproduction. 125, 871–878.

VomSaal, F. S., Hughes, C. 2005. An extensive new literature concerning 581 low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. Environ. Health Perspect. 113, 926–933.

Wetherill, Y., Akingbemi, B., Kanno, J., Mc Lachlan, J., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C., Zoeller, T., Belcher, S. 2007. In vitro molecular mechanisms of Bisphenol A action. *Toxicology*. 24, 178–198.

Wetherill, Y. B., Petre, C. E., Monk, K. R., Puga, A., Knudsen, K. E. 2002. The Xenoestrogen Bisphenol A Induces Inappropriate Androgen Receptor Activation and Mitogenesis in Prostatic Adenocarcinoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1, 515-524.

Wisniewski, P., Romano, R. M., Kizys, M. M. L., Oliveira, K. C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M. I., Dias-da-Silva, M. R., Romano, M. A. 2015. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology*. 51490, 1-9.

Yoshino, S., Yamaki, K., Yanagisawa, R., Takano, H., Hayashi, H., Mori, Y. 2003. Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice. *British J. Pharmacol.* 138, 1271–1276.

Zaya, R., Hennick, C., Pearl, C. A. 2012. In vitro expression of androgen and estrogen receptors in prepubertal and adult rat epididymis. *General Compar. Endocrinol.* 178, 573-586.

3 Legend of tables

Table 1

Sperm number, sperm concentration and sperm transit time through epididymis. Values expressed as Mean \pm SEM. ANOVA test, with the *post hoc* Tukey test; $p > 0.05$.

Table 2

Epididymal stereological analysis
Values expressed as median [Q1 – Q3].

Kruskal–Wallis, with *post hoc* Dunn test; $p < 0.05$.

^{a, b} Different letters indicate groups that differ statistically

Legend of the figure

Figure 1 - Histopathological analysis of caput and cauda epididymidis.

Photomicrograph of caput (A, B, E and I) and cauda (C, D, F, G and H) epididymis sections from Control (A), BPA 20 (B, C, F and G) and BPA 200 (D, E, H and I) groups. (A) Epithelium, lumen and stroma with normal aspect. (B, C and D) Note the presence of around cells (thin arrow) and multinucleated cells in the lumen (head of arrow). (E) Observe the immune cell in lumen (thick arrow) (F - I) Shows greater magnification of image B, C D and E, respectively. L = lumem; S = Strom; Ep = Epitelium. Hematoxylin and eosin stain. Magnification X100 (A – E), X400 (F - I).

Figure 2 – Number of neutrophils and macrophages in caput/corpus and cauda epididymis.

Number of neutrophils (A and B) and macrophages (C and D) in caput/corpus (A and C) and cauda (B and D) epididymis measured by MPO (for neutrophils) and NAG (for macrophages) activity. Values expressed as mean \pm SEM. ANOVA test, with the post hoc Tukey test. * $p < 0,05$.

Figure 3 – Quantification of superoxide anion and lipid peroxidation.

Quantification of superoxide anion in caput/corpus (A) and cauda (B) epididymis by reduction of NBT. Lipid peroxidation measured by malondialdehyde (MDA) levels in caput/corpus (C) and cauda (D) epididymis. Values expressed as mean \pm SEM. ANOVA test.

Figure 4 – Immunohistochemistry analysis to IL-6 of epididymis.

Photomicrograph of caput epididymis sections from Control (A and B), BPA 20 (C and D) and BPA 200 (E and F) groups. (A and B) Not marked epithelium. (C - F) Labeled cells in epithelium. (B, D and F) Shows greater magnification of image A, C and E, respectively. L = lumem; S = Strom; Ep = Epitelium. Hematoxylin and eosin stain. Magnification X100 (A, C and E), X400 (B, D and F).

Table 1.

	Control (n=7)	BPA 20µg/kg (n=7)	BPA 200µg/kg (n=7)
Sperm number in caput/corpus epididymal (x10 ⁶)	25.54 ± 4.43	25.73 ± 2.96	32.98 ± 5.39
Sperm number in cauda epididymal (x10 ⁶ /g)	16.56 ± 3.61	22.64 ± 2.76	28.73 ± 7.42
Sperm concentration in caput/corpus epididymal (x10 ⁶ /g)	373.21 ± 72.53	293.13 ± 33.07	248.90 ± 50.60
Sperm concentration in cauda epididymal (x10 ⁶)	340.86 ± 37.42	400.94 ± 51.29	432.26 ± 82.96
Sperm transit time in caput/copus epididymal (day)	1.34 ± 0.20	1.54 ± 0.20	1.97 ± 0.40
Sperm transit time in tail epididymal (day)	0.84 ± 0.14	1.30 ± 0.16	1.77 ± 0.54

Table 2

	Control (n=5)	BPA 20µg/kg (n=5)	BPA 200µg/kg (n=5)
Caput (2A region)			
Epithelial	28.87 [24.25 – 34.23] ^a	33.04 [29.31 – 40.33] ^b	35.12 [29.02 – 41.67] ^b
Lumen	41.37 [30.65 – 54.17] ^a	44.05 [36.90 – 50.00] ^a	46.29 [40.48 – 54.91] ^a
Stroma	23.51 [17.26 – 34.67] ^a	20.83 [13.09 – 27.38] ^{ab}	18.15 [12.05 – 22.92] ^b
Cauda (5A/B region)			
Epithelial	34.22 [29.76 – 40.48] ^a	33.33 [27.38 – 42.55] ^a	42.56 [36.46 – 52.68] ^b
Lumen	39.88 [34.37 – 45.53] ^a	40.18 [29.91 – 51.34] ^a	28.57 [20.24 – 44.94] ^b
Stroma	24.70 [17.56 – 29.76] ^a	22.32 [13.39 – 34.08] ^a	21.43 [15.62 – 31.40] ^a

Figure 1.

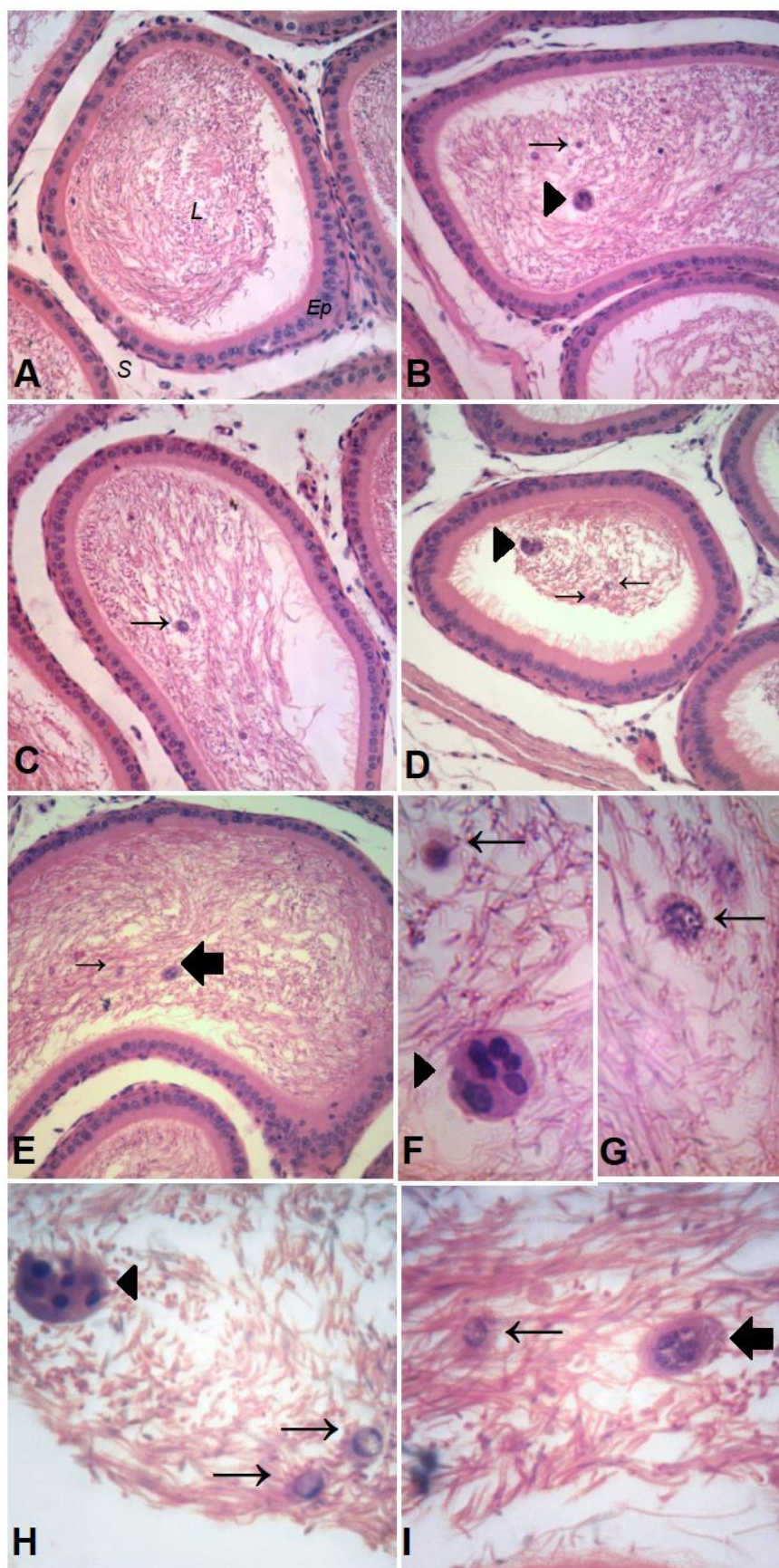


Figure 2.

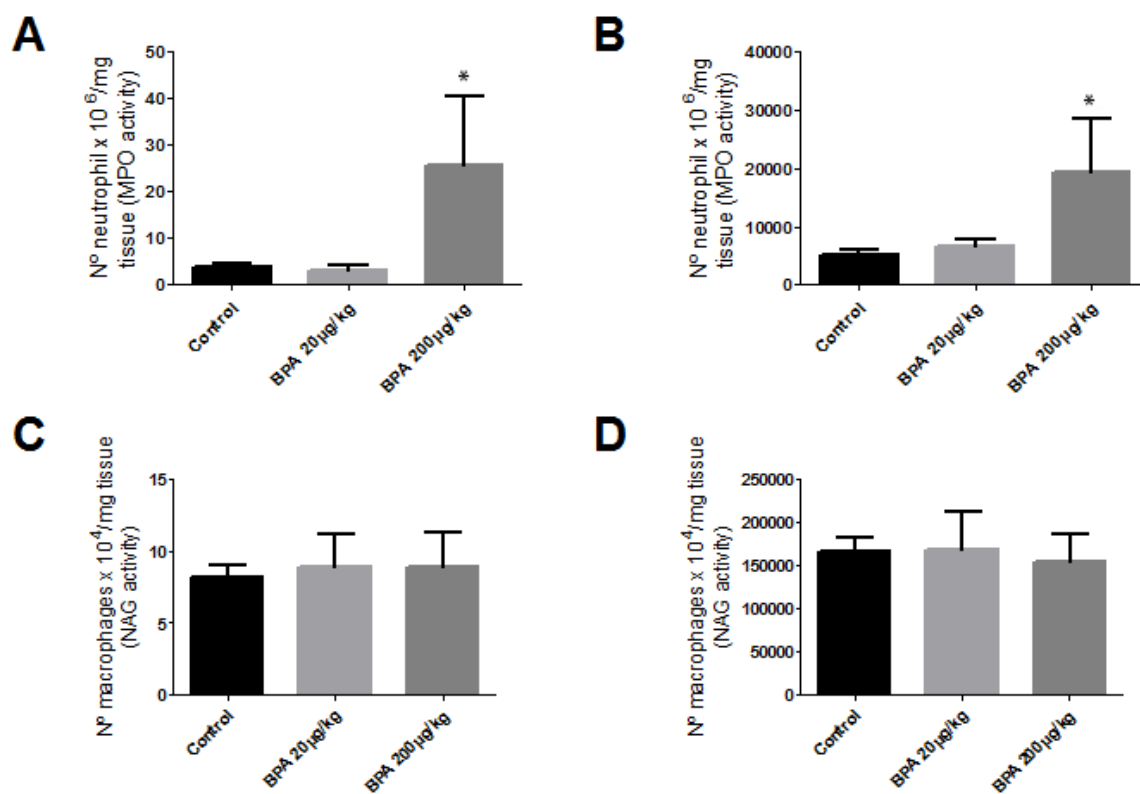


Figure 3.

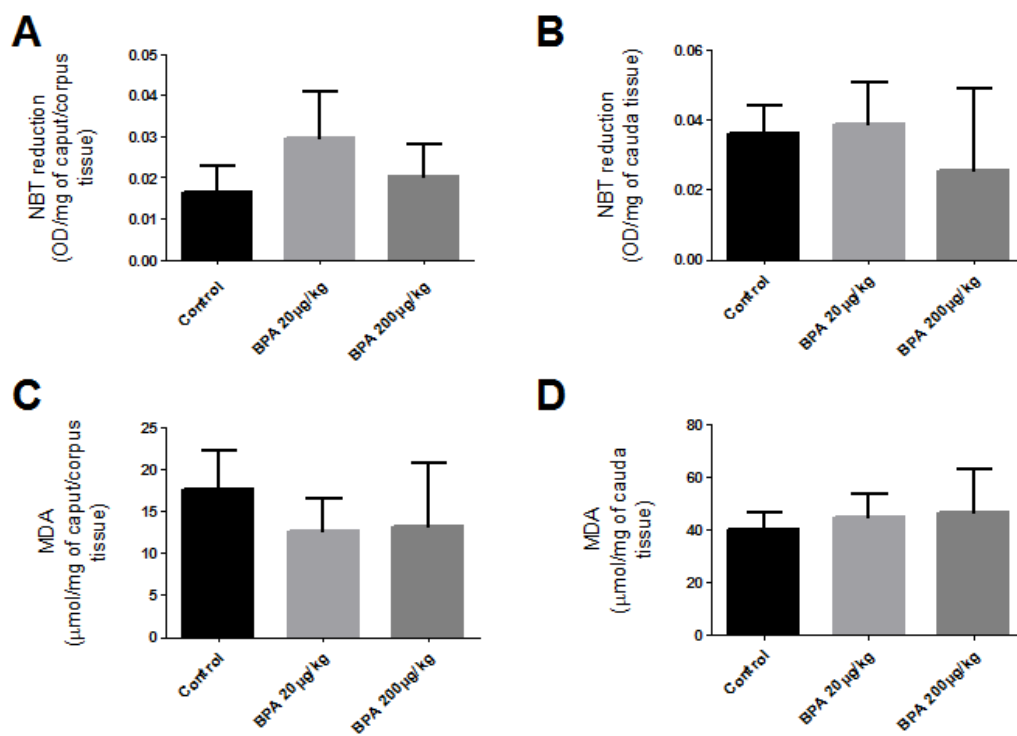
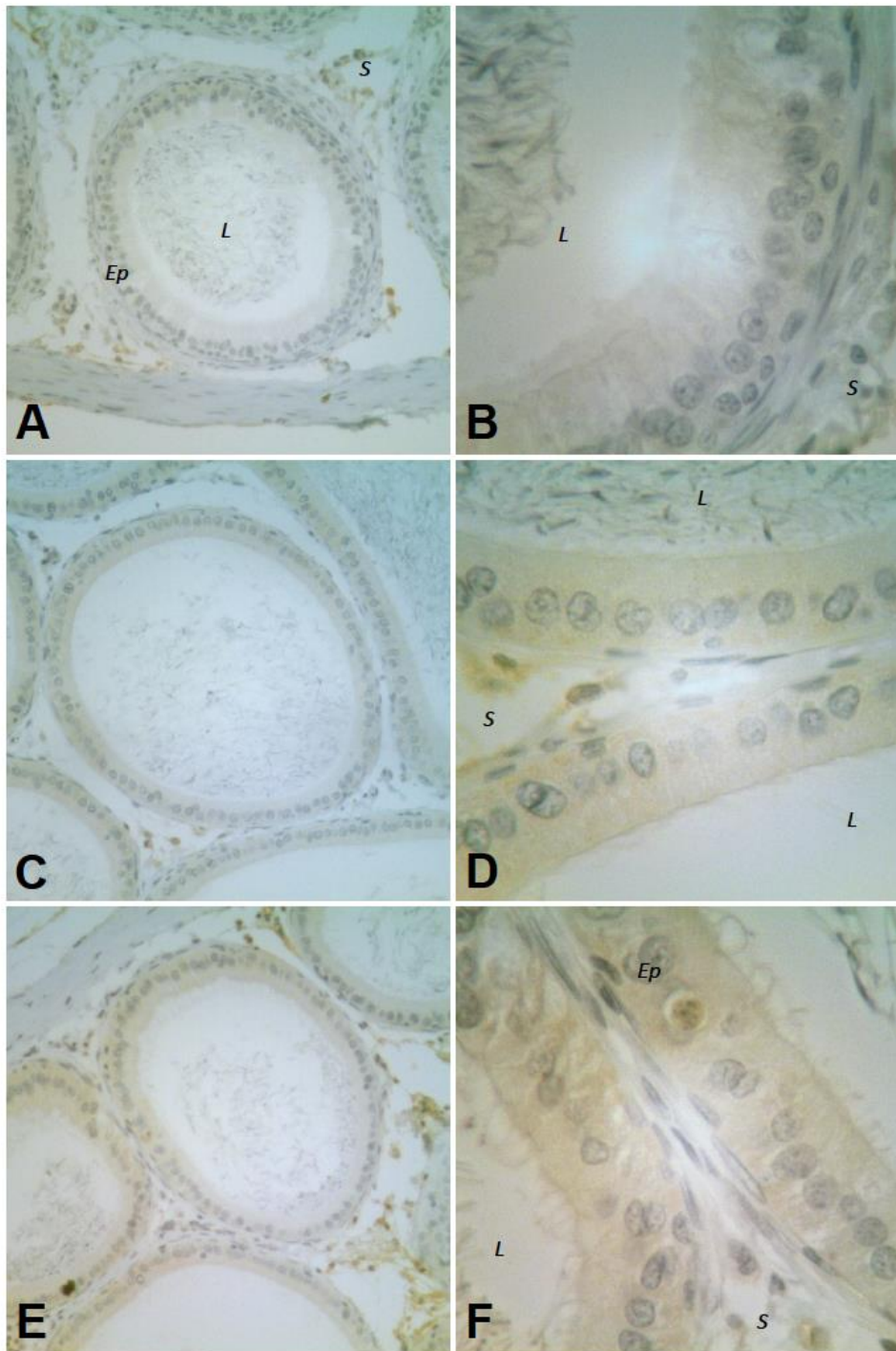


Figure 4.



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nestas condições experimentais, conclui-se que o bisfenol A é tóxico para o desenvolvimento pós-natal do sistema reprodutor masculino durante o período peripuberal, uma vez que muitos parâmetros avaliados nos testículos e epidídimo foram alterados. Essas alterações podem levar a problemas de fertilidade no indivíduo na fase de maturidade sexual, caso sejam persistentes, ou ainda, originarem outras.