



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE – PPGCS

JOÃO VICTOR SILVA ARAÚJO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO BISFENOL A (BPA) SOBRE O ÍLEO
DE RATOS Wistar JOVENS**

TERESINA – PI

2019

JOÃO VICTOR SILVA ARAÚJO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO BISFENOL A (BPA) SOBRE O ÍLEO
DE RATOS WISTAR JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde (PPGCS) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Mestrando: João Victor Silva Araújo

Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Kelly Palombit

Linha de Pesquisa: Métodos diagnósticos e análises das condições de Saúde.

TERESINA – PI

2019

JOÃO VICTOR SILVA ARAÚJO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO BISFENOL A (BPA) SOBRE O ÍLEO
DE RATOS WISTAR JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Ciências e Saúde (PPGCS) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

DATA DA APROVAÇÃO: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior - UFPI

(Presidente)

Profa. Dra. Eunice Anita de Moura Fortes -
UFPI

(1ª Examinadora)

Profa. Dra. Máira Soares Ferraz - UFPI

(2ª Examinadora)

Profa. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite - UFPI

(Suplente)

TERESINA – PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processos Técnicos

A663e Araújo, João Victor Silva.
Efeitos da administração do bisfenol A (BPA) sobre o fêto de
ratos Wistar jovens. / João Victor Silva Araújo. – 2019.
47 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro
de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Ciências e Saúde,
Teresina, 2019.

“Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior.”

1. Bisfenol A. 2. Sistema Nervoso Entérico.
3. Trato Gastrointestinal. 4. Mucosa Intestinal. 5. Xenoestrogênio.
I. Araújo, João Victor Silva. II. Título.

CDD 615.32

Bibliotecário: Gésio dos Santos Barros – CRB-3/1469

*A Deus, que se mostrou criador.
Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar
realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada. Por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A minha mãe, Rita de Cássia da Silva Araújo, que me deu não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo, pelo apoio, amor e por terem me dado as melhores oportunidades para conquistar o que conquistei até hoje;

A minha irmã, Maria Rita Silva Araújo, por nunca ter deixado de discutir comigo sobre a vida, o universo e por sempre torcer por mim.

Ao Dr. Aírton Mendes Conde Júnior, meu orientador por contribuir inigualavelmente para minha formação acadêmica, profissional e pessoal; mesmo de longe ele sempre soube como ajudar, sempre estava ali do meu lado e além disso pelo respeito, reconhecimento e companheirismo, sou grato;

A minha coorientadora professora Dr^a Kelly Palombit, que foi mais que uma amiga pra mim, por ter aceitado o desafio de me orientar no meio deste mestrado, por sua paciência nesses meses, pela oportunidade oferecida, confiança em mim depositada na realização deste trabalho e pela amizade. Que Deus lhe ilumine sempre professora, você é LUZ!

Aos membros da banca de qualificação, por terem aceitado o convite e pelas contribuições para melhoria deste trabalho. Aos membros da banca de Defesa professoras Profa. Dra. Eunice Anita de Moura Fortes, Profa. Dra. Maíra Soares Ferraz e Profa. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite por sempre estarem disposta a me ajudar nos momentos em que mais precisei, sou grato;

Ao Sergio Paulo Lima Guerra, por ter me dado uma oportunidade desde a

primeira conversa que tivemos, por ter acreditado em mim, por ter me incentivado, por todo o apoio... nunca vou esquecer;

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde, pela oportunidade de realização do meu tão sonhado mestrado. Ao Departamento de Morfologia, por abrir as portas para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de pesquisa Geisyane de Castro Paz Oliveira, Marcos Paulo Carvalho Castro e Raísa de Oliveira Santos agradeço por essa amizade que construímos, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Dissertação e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Sem vocês a etapa de coleta seria muito árdua. A participação de vocês foi primordial no decorrer desta pesquisa, muito obrigado!

Aos colegas do Departamento de Morfologia que tantas vezes me receberam de braços abertos nos meus momentos mais baixos de desânimo e fizeram de tudo pra me animar e me ajudar na realização desse trabalho;

A todas e todos os professores que com seus conhecimentos contribuíram de alguma forma para minha formação, por ter me mostrado a força das palavras em um dia de desespero.

Agradeço em especial a Profa. Dra. Patricia Castelucci que gentilmente cedeu reagentes para a marcação dos neurônios mioentéricos.

E por fim, a todos cujos nomes não foram citados, mas que, cada qual a sua maneira contribuiu direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Não deixe que as pessoas te façam desistir daquilo que você mais quer na vida.
Acredite. Lute. Conquiste. E acima de tudo, seja feliz!”*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.....	24
Figura 2 - Fotomicrografias da parede do íleo coradas pela técnica HE dos grupos controle, OM e BPA.....	31
Figura 3 - Histograma da altura das vilosidades em ratos dos grupos controle, OM e BPA.....	32
Figura 4 - Histograma da largura do ápice e da base das vilosidades do íleo em ratos dos grupos controle, OM e BPA.....	32
Figura 5 - Histograma da espessura da camada muscular circular e da camada muscular longitudinal do íleo em ratos dos grupos controle, OM e BPA.....	33
Figura 6 - Neurônios mioentéricos do íleo marcados para atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeo-diaforase nos grupos controle, OM e BPA...	34
Figura 7 - Histograma da densidade neuronal no plexo mioentérico do íleo dos grupos controle, OM e BPA.....	34
Figura 8 - Progressão do corante azul de metileno ao longo do trato gastrointestinal no íleo de rato em animais de controle, OM e BPA.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do BPA no peso corporal de ratos Wistar machos.....	29
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

BPA - Bisfenol A

B.wt.G - ganho de peso corporal

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CCA - Centro de Ciências Agrárias

CML - Camada de Músculo Circular

CO - Óleo de Milho

CCS - Centro de Ciências da Saúde

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

F.B.wt - peso corporal final

ENS - Sistema Nervoso Entérico

h - hora (s)

H.E - Hematoxilina - Eosina

I. B. peso - Peso corporal inicial

Kg - Quilograma

LML - Camada Longitudinal do Músculo

MC - Mucosa

mg - miligrama

ML - Camada Muscular

mL - mililitro

min - minutos

mol / L - Molaridade por litro

NADH-diaforase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo-diaforase

pH - potencial de hidrogênio

SL - Camada Serosa

SML - Camada Submucosa

T.D.I. - Ingestão diária tolerável

UFPI - Universidade Federal do Piauí

µm - micrômetros

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
01 INTRODUÇÃO.....	17
02 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivo Específicos.....	19
03 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Bisfenol A.....	20
3.2 Sistema Digestório e Sistema Nervoso Entérico.....	23
04 MATERIAL E METODOS.....	26
4.1 Aspectos Éticos.....	26
4.2 Animais e Design Experimental.....	26
4.3 Peso dos Animais.....	26
4.4 NADH diaforase.....	27
4.4.1 <i>Densidade Neuronal</i>	27
4.5 Análise Histológica.....	28
4.5.1 <i>Análises Qualitativas</i>	28
4.6 Avaliação da Motilidade Gastrointestinal.....	28
4.7 Análise Estatística.....	28
05 RESULTADOS.....	29
5.1 Análise Morfológica	29
5.2 Análise de NADH-diaforase.....	32
5.3 Análise da Motilidade Gastrintestinal.....	34
06 DISCUSSÃO.....	35
AGRADECIMENTOS.....	39
REFERENCIAS.....	40
ANEXOS.....	46

RESUMO

O Bisfenol A (BPA) faz parte de uma família de produtos químicos usados na fabricação de materiais plásticos, como garrafas de água, garrafas e embalagens reutilizáveis. Vários estudos têm demonstrado que o BPA apresenta efeitos tóxicos quando ingerido, causando exposição direta do trato gastrointestinal de humanos e animais a essa substância. Assim, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos da administração de BPA no sistema nervoso entérico de ratos Wistar jovens. Os animais foram divididos em três grupos: controle, óleo de milho (OM) e Bisfenol A (BPA). Do 15^o ao 30^o período pós-natal, os filhotes de BPA receberam doses diárias de BPA (5 mg kg⁻¹), enquanto os filhotes do grupo OM receberam apenas doses de 0,3 ml de óleo de milho e o grupo controle não recebeu nenhuma substância. No 31^o período pós-natal, os animais dos três grupos estudados foram eutanasiados. A região do íleo foi coletada e submetida à técnica de histoquímica NADH-d para detecção de neurônios do plexo mioentérico e processamento histológico para avaliação da parede e mucosa intestinal. Além disso, o trânsito gastrointestinal foi avaliado pela progressão do azul de metileno. No grupo BPA, houve aumento do número de neurônios entéricos e alterações na mucosa. Observou-se a espessura das camadas musculares, bem como diminuição da progressão do azul de metileno. O BPA tem efeito tóxico na parede e mucosa intestinal, bem como nos neurônios do plexo mioentérico, indicando alterações na motilidade intestinal.

Palavras-chave: Bisfenol A, Sistema Nervoso Entérico, Trato Gastrointestinal, Mucosa Intestinal, Xenoestrogênio.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is part of a family of chemicals used in the manufacture of plastic materials, such as water bottles, bottles and reusable packaging. Several studies have shown that BPA has toxic effects when ingested, causing direct exposure of the gastrointestinal tract of humans and animals to this substance. Thus, the objective of this work is to analyze the effects of BPA administration on the enteric nervous system of young Wistar rats. The animals were divided into three groups: control, corn oil (CO) and Bisphenol A (BPA). From the 15th to the 30th postnatal, BPA pups received daily doses of BPA (5 mg kg^{-1}), while the pups of the CO group received only 0.3 ml doses of corn oil and the control group received no substance. On the 31st postnatal, the animals of the three groups studied were euthanized. The ileum region was collected and submitted to the NADH-d histochemistry technique for the detection of myenteric plexus neurons and histological processing for assessment of the wall and intestinal mucosa. In addition, gastrointestinal transit was assessed by progression of methylene blue. BPA group there was increase in the number of enteric neurons and alterations in the mucosa. In the thickness of the muscular layers was observed, as well as a decrease in the progress of the methylene blue. BPA has a toxic effect on the wall and intestinal mucosa, as well as neurons in the myenteric plexus, indicating changes in intestinal motility.

Keywords: Bisphenol A, Enteric Nervous System, Gastrointestinal Tract, Intestinal Mucosa, Xenoestrogen.

01 INTRODUÇÃO

O Bisfenol A (BPA) é um xenoestrogênio sintético, que passou a ser utilizado na produção de plásticos em geral, principalmente, de policarbonatos e resinas epóxi. Dessa maneira, encontrou-se um composto transparente, leve, forte e ao mesmo tempo duradouro, o que deu maior resistência aos produtos (KAZEMI et al., 2016); BESERRA et al., 2012). O BPA é amplamente utilizado em uma gama de produtos, incluindo mamadeiras, tubulações de água, recipientes de armazenamento de alimentos, garrafas, brinquedos e equipamentos médicos e eletrônicos (BENACHOUR; ARIS, 2009; MICHALOWICZ, 2014).

Os seres humanos são cronicamente expostos a doses baixas de polímeros à base de BPA (CAMARCA et al., 2016). A principal via de exposição é a alimentar, quando o BPA acaba por entrar no organismo através da ingestão de alimentos armazenados ou embalados com resinas epóxi ou policarbonato, onde é absorvido e distribuído ao corpo através da corrente sanguínea (NIEHS, 2010; VANDEBERG et al., 2009). Considerando os potenciais riscos para a saúde, alguns países limitaram a aplicação do BPA na indústria (USMAN; AHMAD, 2016) e proibiram seu uso em produtos destinados à alimentação de recém-nascidos (FDA, 2012).

O intestino permite a absorção de nutrientes e água, sendo um dos primeiros órgãos de contato com o alimento ingerido, sendo também responsável pela proteção contra agentes e fatores indesejáveis. Evidências apontam para uma possível influência de estrogênios, como o BPA, na manutenção da estrutura do epitélio intestinal, direcionando a uma diferenciação e proliferação celular pela expressão de receptores de estrogênio α e β (BRANISTE, 2011; BRANISTE, 2009). Isso pode impactar diretamente o sistema nervoso entérico, pois é o principal responsável pela regulação da motilidade intestinal, com a atividade da camada mucosa, incluindo a secreção de enzimas e hormônios e/ou a absorção de nutrientes (FURNESS et al, 2014).

O SNE está presente em todo trato digestório tubular e é formado por redes interconectadas ou plexos de neurônios, seus axônios e células gliais entéricas. Este sistema é dividido em plexo submucoso, responsável pela inervação da mucosa e pela regulação da secreção, absorção e do fluxo sanguíneo e o plexo mioentérico, responsável pelo controle da motilidade intestinal (FURNESS, 2012).

Métodos histoquímicos são amplamente utilizados para análise bioquímica e morfológica do sistema nervoso. A técnica do NADH-diaforase marca o corpo celular de todos os grupos de neurônios através de uma reação de oxirredução catalisada pela enzima mitocondrial nicotinamida adenina dinucleotídeo-diaforase formando grânulos de formazana de cor azul e insolúveis o que permite uma avaliação quantitativa dos neurônios dos plexos entéricos (CASTELUCCI et al., 2002; GABELLA, 1971; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010).

Atualmente, são escassas pesquisas relacionadas aos efeitos do BPA no intestino de indivíduos jovens e mais ainda sobre o sistema nervoso entérico (SNE). Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo analisar a toxicidade do BPA sobre o SNE administrado em ratos Wistar jovens para elucidar as diferentes respostas do trato gastrointestinal nessa faixa etária e determinar se possuem características em potencial, visto que uma das vias importantes de contaminação por BPA é a alimentar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da exposição ao Bisfenol A sobre o íleo de ratos Wistar jovens.

2.2 Objetivos específicos

Após a administração do BPA em ratos jovens:

- a) avaliar se há alterações na densidade dos neurônios;
- b) analisar a morfologia do intestino;
- c) avaliar alterações na organização celular da mucosa intestinal e das camadas musculares, por meio de técnicas histoquímicas;
- d) analisar alterações na velocidade do trânsito gastrointestinal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bisfenol A

O Bisfenol a (BPA) é um monômero do plástico policarbonato de nome químico 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano. Suas propriedades físico-químicas correspondem a um peso molecular equivalente a 228,29 g/mol, temperatura de fusão: 155 – 157 °C e ponto de ebulição de 220 °C a 5 hPa⁵, em temperatura ambiente é uma substância sólida, branca, cristalina, geralmente sob a forma de flocos ou pó com odor fenólico (MICHALOWISCZ, 2014). Ele é pertencente ao grupo dos difenilalcanos, composto por dois anéis fenólicos unidos por uma cadeia carbonada, através de uma ponte de metil, com dois grupos funcionais de metil ligados a ponte e presença de grupos hidroxilas, que determinam a sua boa reatividade (BERNARDO et al., 2015).

O composto vem sendo utilizado em larga escala como adjunto de materiais plásticos em diversas utilidades como na preparação de policarbonatos; produção de mamadeiras e chupetas; brinquedos; utensílios domésticos; embalagens retornáveis de água; cervejas e refrigerantes; frascos para alimentos infantis ou ainda na área farmacêutica, em resinas de implantes médicos e dentários como obturações dentárias e selantes, eletrodomésticos e lentes de óculos (BESERRA et al., 2012; MANNIKAN et al., 2013; MICHALOWICZ, 2014). Pode ser encontrado também em discos compactos e equipamentos de segurança resistentes a impacto, revestimento automobilísticos, entre outros (NIEHS, 2010).

A exposição ao BPA pode ocorrer pela via ocupacional, ambiental e alimentar (MICHALOWICZ, 2014). A via ocupacional está restrita especificamente a trabalhadores de indústrias que mexem diretamente com a síntese de BPA e fabricação de seus subprodutos. A via ambiental resulta da contaminação atmosférica, aquática e dos solos, tendo a indústria e processo de reciclagem de papel térmico como causadores (MICHALOWICZ, 2014; BERNARDO et al., 2015). O transporte do BPA em ambiente aquático contaminado caracteriza a maior rota de distribuição do monômero para os demais compartimentos do meio ambiente e sua velocidade de degradação biológica apresenta um tempo variado, onde o tempo de meia-vida no solo varia entre 1 a 180 dias, já na água de 2,5 a 4 dias (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Com relação a exposição por via alimentar, esta acontece quando o BPA acaba por entrar no organismo após ingestão de alimentos armazenados ou embalados com resinas epóxi ou policarbonato (NIEHS, 2010). Essa contaminação

ou lixiviação ocorre quando os produtos são submetidos a alterações de temperaturas induzindo uma despolimerização, ou então, polimerização incompleta dos produtos à base de BPA durante a fabricação, causando a liberação do composto e de seus derivados para o meio, podendo ser detectados em alimentos enlatados, líquidos engarrafados e no ar que respiramos (COOPER; KENDIG; BELCHER, 2011).

Segundo a organização mundial de saúde (WHO, 2010) a exposição diária ao BPA em crianças com idade de 0 a 6 meses amamentadas exclusivamente por lactante foi de 0,3 µg/kg de peso corporal, já em crianças na mesma faixa etária de idade, alimentados com fórmula líquida em mamadeiras de policarbonato foi de 2,4 µg/kg por dia em média, sendo um motivo de preocupação, especialmente para os pais, porque alguns estudos com animais de laboratório relataram efeitos no desenvolvimento de fetos e recém-nascidos expostos a baixas doses de BPA (NHIES, 2010; GEENS et al., 2012).

Em relação aos grupos de risco de exposição ao BPA alimentar focando principalmente em recém-nascidos e crianças devido a condição de massa corporal, redefiniu-se que os parâmetros toleráveis para limite de BPA no organismo (T.D.I. – Ingestão Diária Tolerável) em 0,05 mg / Kg de massa corporal (GATTI, 2009). A agência de Vigilância Sanitária, por sua vez, preconiza um limite de exposição máxima (LME) de 0,6 mg/kg (ANVISA, 2011).

Devido à falta de precisão sobre possíveis efeitos tóxicos, alguns países, inclusive o Brasil, optaram por proibir a importação e fabricação de mamadeiras que contenham BPA, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários deste produto. Esta proibição está vigente desde janeiro de 2012 e foi feita por meio da Resolução RDC nº 41/2011. Assim, mamadeiras em policarbonato não podem ser comercializadas no Brasil (ANVISA, 2011).

O metabolismo e distribuição do BPA difere significativamente entre humanos e roedores. Em primatas humanos e não humanos, ocorre quando uma dose única (baixa ou elevada) de BPA é extensamente absorvida a partir do trato gastrointestinal após administração oral e o composto sofre metabolização de primeira passagem completa no fígado e parede intestinal, sendo conjugado com ácido glucurônico o transformando em glucuronídeo de BPA (BPA-glucoronídeo) ou reagindo com sulfato para formar o BPA-sulfato, como principais metabólitos. Este glucuronídeo é, em seguida, transportado para o sangue e levado até os rins, para ser excretado na urina

de uma forma rápida, com um tempo correspondente a menos de 6 horas (h) (EFSA, 2010; VOLKEL et al., 2008; GEENS et al., 2012; BERNARDO et al., 2015).

Em ratos o BPA sofre o mesmo processo de biotransformação, porém nesta espécie o BPA sofre recirculação entero-hepática. Uma vez excretado do fígado pela bile no trato gastrointestinal como conjugados do BPA, estes conjugados são novamente quebrados e o BPA livre é reabsorvido, para posteriormente ser eliminado com as fezes, variando o tempo de meia-vida de 19-78 h (EFSA, 2010; WILLHITE et al., 2008).

O BPA é bastante evidenciado como um xenoestrogênio sintético (SOHRAB et al., 2016), caracterizado como um disruptor endócrino, por interferir com síntese, secreção, transporte, ligação ação ou eliminação de hormônios naturais no próprio organismo (VANDEMBERG et al., 2009; BETANCOURT et al., 2012; COOPER; KENDIG; BELCHER, 2011; THARP et al., 2012). Baixas doses de BPA podem levar a distúrbios endócrinos e patologias como doenças reprodutivas e obesidade (MANNIKKAM et al., 2013), diabetes (ALONSO-MAGDALENA et al., 2011) e hipertensão arterial (BAE et al., 2012; SHANKAR et al., 2012), bem como doenças cardiovasculares e propensão a infarto (LIND; LIND, 2011), além de possíveis efeitos sobre o neurodesenvolvimento (STUMP et al., 2010). Estudo realizado por Zoeller et al. (2005) evidencia que o BPA tem propriedade de ligar-se ao receptor do hormônio da tireoide, agindo como um antagonista, impedindo a ligação da triiodotironina (T3), sendo propenso ao desenvolvimento de hipertireoidismo.

Há evidências substanciais que indicam que a exposição ao BPA desde os primeiros anos de vida, abaixo da dose de referência oral, pode levar ao aumento da susceptibilidade ao câncer de mama e de próstata (SEACHRIST et al., 2016). O efeito carcinogênico do BPA ainda não está bem elucidado e ainda é alvo de muitas pesquisas. Um modelo experimental utilizando primatas não humanos constatou sensibilidade da glândula mamária a exposição ao BPA, apresentando aumento do sistema ductal da glândula (THARP et al., 2012). Em outros estudos usando ratos, bem como o realizado por Cao et al. (2013), observou que a exposição ao BPA durante a gestação e lactação poderia induzir à neoplasia mamária na sua prole

O BPA é detectado em praticamente todos os tecidos humanos (fígado, medula óssea, testículos, urina, sangue, saliva, sêmen, placenta, cordão umbilical, feto, líquido amniótico e leite) (MAFFINI et al., 2006) e está altamente disseminado no meio ambiente (KANG; KATAYAMA; KONDO, 2006).

3.2 Sistema Digestório e Sistema Nervoso Entérico

O aparelho digestório compreende todos os órgãos responsáveis pela apreensão, digestão química, absorção de alimentos e água e eliminação da parte não absorvida. Sendo formado pela boca, faringe, esôfago, estômago e intestinos delgado e grosso, e suas glândulas anexas (glândulas salivares, pâncreas e fígado) (DYCE; SOCKE; WESING, 2004). Os intestinos iniciam-se a partir do piloro e se estendem até o reto. O intestino delgado é composto de duodeno, jejuno e íleo, sendo sustentados pelo grande mesentério, já o intestino grosso compõe-se de ceco, cólon (ascendente, transverso, descendente e sigmoide) e reto. (DYCE; SACK; WENSING, 2004).

A função do intestino delgado está relacionada a digestão e absorção de nutrientes necessários para a manutenção, o crescimento e as demais necessidades energéticas do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Os componentes do intestino apresentam certas características estruturais em comum, dessa forma, trata-se de um tubo oco composto por um lúmen, que apresenta variação no seu diâmetro, circundado por uma parede formada por 4 camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (GENESER, 2000).

A camada mucosa possui um revestimento epitelial simples cilíndrico, uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo e uma muscular da mucosa. A camada submucosa é composta por tecido conjuntivo denso fibroelástico e um plexo nervoso submucoso, também denominado plexo de Meissner. As duas primeiras camadas são ricas em vasos sanguíneos e linfáticos e podem apresentar células glandulares e tecido linfóide (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

A camada muscular contém células musculares lisas orientadas em espiral, divididas em duas subcamadas, uma camada circular interna e uma longitudinal externa. Entre essas duas subcamadas observa-se o plexo nervoso mioentérico, também conhecido como plexo de Auerbach, na qual realiza e coordena as contrações de segmentação e peristalse (GARTNER; HIATT, 2007).

A serosa é formada por uma camada delgada de tecido conjuntivo frouxo, revestida por um epitélio pavimentoso simples. Na cavidade abdominal, a serosa que reveste os órgãos é denominada peritônio visceral e está em continuidade com o mesentério (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

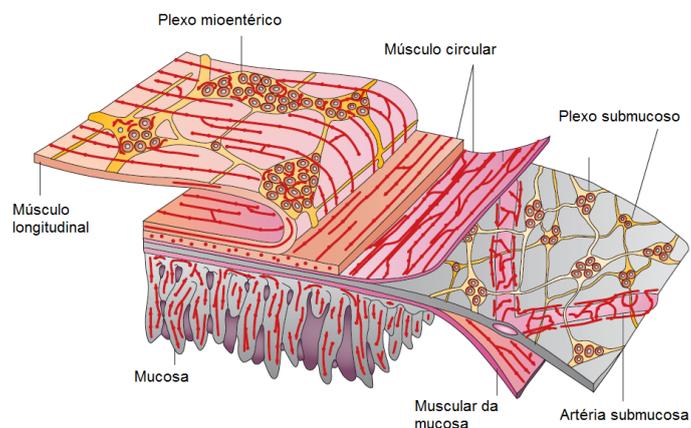
O trato gastrintestinal difere de todos os outros órgãos periféricos porque possui um extenso sistema nervoso intrínseco, denominado SNE que controla as

funções viscerais mesmo quando está completamente separado do SNC (BAYLISS; STARLING, 1899).

O SNE está presente em todo trato gastrointestinal tubular e é composto por pequenos agregados de células nervosas, gânglios entéricos, conexões neurais entre esses gânglios e fibras nervosas que suprem os tecidos efetores, incluindo o músculo da parede intestinal, o epitélio, os vasos sanguíneos intrínsecos e as células enteroendócrinas (FURNESS, 2006, 2012). O número total de neurônios entéricos em humanos chega de 400 a 600 milhões, que é maior do que o número total de neurônios de todos os gânglios simpáticos e parassimpáticos e aproximadamente igual ao número de neurônios da medula espinal (FURNESS, 2006).

O plexo mioentérico está localizado entre as camadas musculares longitudinal e circular e é responsável pelo controle primário da contração e relaxamento da musculatura lisa gastrointestinal (KUNZE; FURNESS, 1999). O plexo submucoso recebe esse nome devido à sua localização na camada submucosa e é responsável pelo controle da absorção e secreção do epitélio, do fluxo sanguíneo local e apresenta uma função neuroimune (COOKE, 1998) (Figura 1). As células gliais também estão presentes no SNE e contribuem na manutenção da integridade da barreira epitelial entre o lúmen intestinal e as células presentes no interior da parede das vísceras (MENDES et al., 2015; TOUMI et al., 2006; SAVIDGE et al., 2007).

Figura 1 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.



FONTE: Adaptado de Furness, 2012.

A importância do SNE é destacada pela variedade de neuropatias entéricas que são causadas após a falha de uma ou mais funções. Essas neuropatias têm sido

agrupadas como neuropatias congênitas e de desenvolvimento; neuropatias adquiridas e esporádicas; neuropatias associadas com outras doenças; e neuropatias iatrogênicas ou induzidas por drogas (FURNESS, 2012).

Geralmente os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato gastrointestinal, porém, a densidade, o tamanho dos neurônios e o formato dos gânglios podem variar em animais com idades diferentes (MATINI et al., 1997; MCKEOWN et al., 2001; QU et al., 2008), ou quando submetidos a condições experimentais como a desnutrição (CASTELUCCI et al., 2002), isquemia intestinal (MAROSTI et al., 20015; PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011) e colite ulcerativa (DA SILVA et al., 2017).

Os neurônios entéricos têm sido classificados por sua morfologia, propriedades fisiológicas, marcações imunohistoquímicas e histoquímicas, estruturas que inervam, transmissores que utilizam e as conexões que recebem (FURNESS, 2006). Esses podem ser agrupados em neurônios motores, interneurônios e neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs), também chamados de neurônios sensoriais (FURNESS, 2006).

Os neurônios motores do plexo mioentérico são divididos em neurônios inibitórios e excitatórios das camadas musculares longitudinal e circular, responsáveis pelo controle da motilidade intestinal. Já os neurônios motores do plexo submucoso, também chamados de neurônios secretomotores e vasodilatadores têm como função a regulação da secreção, absorção e do fluxo sanguíneo (FURNESS, 2000, 2006).

Os interneurônios entéricos são os neurônios conectores e apresentam projeções na direção oral e na direção anal. Estão envolvidos principalmente com os reflexos propulsivos do intestino (FURNESS, 2000, 2006; POMPOLO; FURNESS, 1998). Os neurônios sensoriais são aqueles responsáveis por captar os estímulos que ocorrem na parede das vísceras, como por exemplo o pH intestinal, a osmolalidade, uma distensão da parede do órgão, entre outros (HAMMER; MCPHEE, 2014).

As camadas musculares do trato gastrointestinal apresentam como principais funções uma propulsão direta, a mistura dos conteúdos, capacidade de reservatório (notavelmente no estômago) e a eliminação de patógenos e substâncias químicas nocivas. O grau de importância do SNE para o controle coordenado da musculatura varia com a região do trato gastrointestinal e com a circunstância fisiológica. O SNE domina o controle da motilidade dos intestinos delgado e grosso, com exceção da defecação, que é responsabilidade do SNC (FURNESS, 2006, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O delineamento da pesquisa é do tipo experimental. Todos os procedimentos descritos relacionados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, registrado sob nº 291/17. Os procedimentos realizados neste estudo estão em conformidade com as diretrizes éticas para experimentação animal preconizadas com os preceitos da LEI nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Animais e Design Experimental.

Seis ratas Wistar grávidas (*Rattus norvegicus albinus*) e trinta e nove filhotes foram mantidos em condições padrão a 23 ° C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, e todos os grupos receberam dieta e água *ad libitum*. As fêmeas foram divididas aleatoriamente em três grupos: grupo controle, grupo óleo de milho (OM) e grupo experimental (BPA). Os filhotes foram separados das matrizes no 14º dia (desmame). A partir do 15º dia, os filhotes de BPA (n=13) receberam doses diárias da substância (BPA - 5 mg kg⁻¹ - Chem Service Inc.®, West Chester, PA) diluída em 0,3 ml de óleo de milho administrado por gavagem oral. Nos filhotes do grupo OM (n=13), apenas 0,3 ml de óleo de milho foi administrado por gavagem oral e os filhotes do grupo controle (n=13) não receberam nenhuma substância. No 31º dia, esses animais foram eutanasiados com overdose da associação anestésica de xilazina (10 mg kg⁻¹) e cetamina (80 mg kg⁻¹) administrada por via intramuscular profunda. Em seguida, os ratos foram submetidos à laparotomia mediana com exposição das alças intestinais, na qual foram coletados os segmentos do íleo distal dos grupos estudados (controle, OM e BPA).

4.3 Peso dos Animais

Os ratos foram pesados no início do experimento (dia 15) e depois pesados no final do experimento (dia 30). O ganho de peso corporal (B.wt.G) foi calculado subtraindo o inicial (I.B.wt) do peso corporal final (F.B.wt).

4.4 Técnica de NADH-diaforase

Após a anestesia e laparotomia mediana, o íleo distal dos animais (n=5 para cada grupo) foi coletado e lavado em solução de Krebs. Cada segmento do íleo foi ligado com um fio de algodão na extremidade proximal e delicadamente distendido com solução de Krebs introduzido com uma seringa pela extremidade distal. Quando o intestino ficou suficientemente distendido, a seringa foi retirada e as ligaduras foram simultaneamente apertadas. Para realizar a marcação de neurônios foi utilizada a técnica de histoquímica da NADH-diaforase (CASTELUCCI et al., 2002, GOMES et al., 2006). Seguindo a incubação em solução de Krebs a temperatura ambiente de 15-30 min, o intestino delgado foi transferido para um agente permeabilizante (Triton-X 100 0,3% em solução de Krebs) por 5 min e então submetido a 3 lavagens de 10 min cada em solução de Krebs. As amostras foram incubadas por 4 h a temperatura ambiente em 20 mL em um meio de incubação contendo 0,5 mg/mL de nitroazul de tetrazólio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) em água destilada, 0,1 mol/L tampão fosfato de sódio, pH 7,3, água destilada e 0,5 mg/mL da forma reduzida de β -NADH (Sigma, Estados Unidos). A reação foi interrompida pela imersão em uma solução de 10% de formalina tamponada, onde as amostras foram fixadas por no mínimo 24 h a temperatura ambiente. Para a realização dos preparados de membrana, o íleo foi seccionado, as camadas mucosa e submucosa foram removidas com auxílio de instrumental cirúrgico sob microscópio estereoscópio; a seguir, os preparados totais de membrana foram montados com glicerina tamponada entre lâmina e lamínula. A análise qualitativa e o número de neurônios mioentéricos foram analisados, mensurados e fotografados em fotomicroscópio binocular.

4.4.1 Densidade Neuronal

Quantificação neuronal. Os neurônios mioentéricos foram identificados pela presença de intenso produto da reação formazan preenchendo o pericário, bem como por núcleos grandes, redondos e não corados. O número de neurônios foi medido examinando todas as preparações de montagem sob um microscópio óptico de luz com uma ampliação de 1000 \times . Todos os neurônios bem delimitados em cada fragmento foram contados. Para a quantificação foram feitas contagens em 40 campos microscópicos alternados para cada animal.

4.5 Análises Histológicas

Os tecidos colhidos (n=5) foram lavados em PBS, abertos na borda mesentérica, colocados em jangadas de madeira e fixados em paraformaldeído 15% por no mínimo 36 h. Os tecidos foram tratados em concentrações crescentes de álcool (Synth, Brasil) e, a seguir, depurados em xilol (Anidrol, Brasil) e realizada a inclusão em parafina histológica (Easy Path, Brasil). Os tecidos foram cortados longitudinalmente (5 µm) em micrótomo (Leica® RM 2235) e corados por Hematoxilina (Qeel, Brasil) e Eosina (Dinâmica, Brasil) (HE). Os cortes histológicos foram montados em bálsamo do Canadá (Synth, Brasil). As imagens foram adquiridas em microscópio óptico de luz LEICA® DM2000.

4.5.1 Análises Quantitativas

A altura das vilosidades e a largura do ápice e da base das vilosidades foram medidas. Dez vilosidades foram analisadas em campos aleatórios (aumento de 200X) em cada um dos animais (n=5) de cada grupo estudado. As camadas musculares circulares e longitudinais também foram analisadas medindo-se a espessura de cada uma. Vinte pontos aleatórios (aumento de 400X) foram analisados em cada um dos grupos estudados. Essas análises foram realizadas com o software Leica® application suite versão 4.

4.7 Avaliação da Motilidade Gastrointestinal

A avaliação da motilidade gastrointestinal foi realizada in vivo, por gavagem oral, através da administração de azul de metileno 2,5% (Dinâmica Brasil). A progressão do corante no trato gastrointestinal (%) foi avaliada após 30 min nos grupos controle, OM e BPA (n=5).

4.8 Análise estatística

Médias \pm SE foram calculadas e comparadas por análise de uma via de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparações múltiplas. Os testes estatísticos foram realizados usando o software Graph Pad Prism 6. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

05 RESULTADOS

Os animais apresentaram comportamento característico para roedores em todos os grupos analisados, independente da aplicação da solução. Porém, os animais submetidos à exposição ao BPA apresentaram um padrão diferente, relevante para a pesquisa. Durante a aplicação, os animais dos grupos controle e OM, mesmo no manejo, apresentaram um padrão de evacuação rápido, típico desses animais, com fezes úmidas e claras.

No grupo BPA, a evacuação foi sensivelmente reduzida, onde durante os dias de aplicação foi menor, e as fezes apresentaram aspecto mais seco. Frequentemente, as fezes foram aderidas ao corpo do animal no momento da aplicação do BPA. Maior quantidade de fezes foi observada nos grupos controle e OM em relação aos animais do grupo BPA.

Ao analisar os pesos inicial e final, não foi observada diferença significativa nos animais dos grupos estudados ($P > 0,05$). Comparando o ganho de peso dos animais (B.wt.G), verificou-se que o B.wt.G dos ratos BPA e OM diminuiu significativamente ($P < 0,001$) quando comparado aos ratos controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do BPA no peso corporal de ratos Wistar machos.

Parâmetro	Grupos experimentais		
	Controle	OM	BPA
I. B. wt (g)	20.0±1.2	25.8±1.0	27.7±1.2
F. B. wt(g)	75.3±5.6	68.5±1.6	72.0±3.8
B. wt. G(g)	51.8±5.3	42.7±1.7*	42.3±3.4*

Os valores são expressos como médias \pm SE (n=6) em cada grupo. OM: óleo de milho; BPA: Bisfenol A; I. B. wt: peso corporal inicial; F.B.wt: peso corporal final; B.wt.G: ganho de peso corporal. (* versus grupo controle) $P < 0,05$.

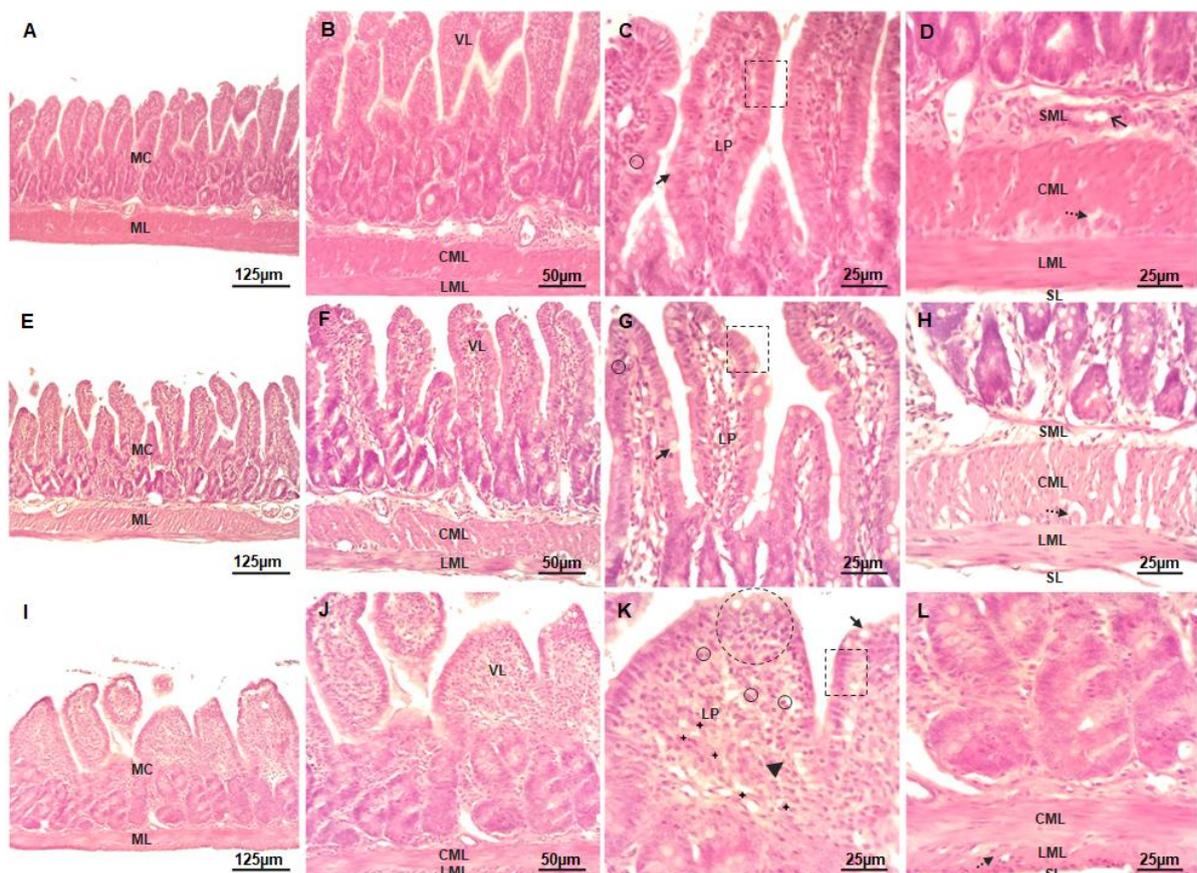
5.1 Análises Morfológicas

Após a laparotomia mediana, as alças intestinais expostas não apresentaram diferenças macroscópicas entre os grupos controle, OM e BPA. Nos grupos controle e OM, a integridade da mucosa intestinal foi mantida apresentando vilosidades revestidas por epitélio cilíndrico simples, composto de células absorventes e células caliciformes. A lâmina própria apresentou uma constituição padrão por tecido conjuntivo frouxo, presença de poucos linfócitos, vasos sanguíneos e linfáticos e glândulas tubulares denominadas criptas de Lieberkühn. A submucosa é composta por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado, separado da mucosa por uma

fina camada de músculo liso. A camada muscular é desenvolvida e, como em outros órgãos cavitários, é composta por uma camada circular interna e outra camada longitudinal externa de músculo liso, onde o plexo mioentérico está presente. Revestindo o órgão, encontra-se a membrana serosa, fina camada formada por tecido conjuntivo recoberta por um simples epitélio pavimentado (Figura 2A-H).

No grupo BPA, observou-se espaçamento de vilosidades onde estavam morfológicamente espessadas, apresentando formato irregular com epitélio cúbico simples (possível metaplasia) e com grande concentração de células no ápice. A lâmina própria é "desorganizada", com presença de células epiteliais, hemácias fora dos capilares, o que sugere hemorragia, infiltrado inflamatório agudo com leucócitos e células eosinofílicas. Essas células também foram observadas na luz das criptas intestinais, onde nos demais grupos de animais essas células não foram observadas. Pontos de necrose também foram observados na base e no ápice das vilosidades com extravasamento de grânulos celulares. A camada submucosa histologicamente parece intacta, mas com baixa atividade celular. A camada muscular é fina quando comparada aos outros grupos (Figura 2I-L).

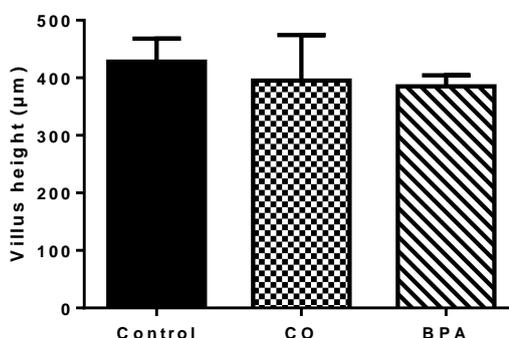
Figura 2 - Fotomicrografias da parede do íleo coradas pela técnica HE dos grupos controle, OM e BPA.



Grupo controle (A-D), grupo OM (E-H) e grupo BPA (I-L). A parede dos grupos de controle e OM são semelhantes. Vilosidades altas e integrativas (MC: mucosa) com epitélio cilíndrico simples (quadrado pontilhado) com células caliciformes (seta); abaixo das criptas de Lieberkühn estão a camada submucosa (SML); camada de músculo circular (CML); camada muscular longitudinal (LML). Entre as camadas musculares estão os gânglios de tamanhos variáveis, onde se localizam os corpos dos neurônios do plexo mioentérico (setas pontilhadas). Íleo após administração de 5 mg kg⁻¹ de BPA apresentava vilosidades com epitélio de formato irregular, lâmina própria "desorganizada" com intenso aumento de células epiteliais no ápice (círculo pontilhado); presença de células inflamatórias (círculos completos); numerosos eosinófilos (estrelas); presença de hemácias fora dos vasos (ponta de seta) com camada muscular mais fina. Barras de escala: A, E, I = 125 µm; B, F, J = 50 µm; C, D, G, H, K, L = 25 µm.

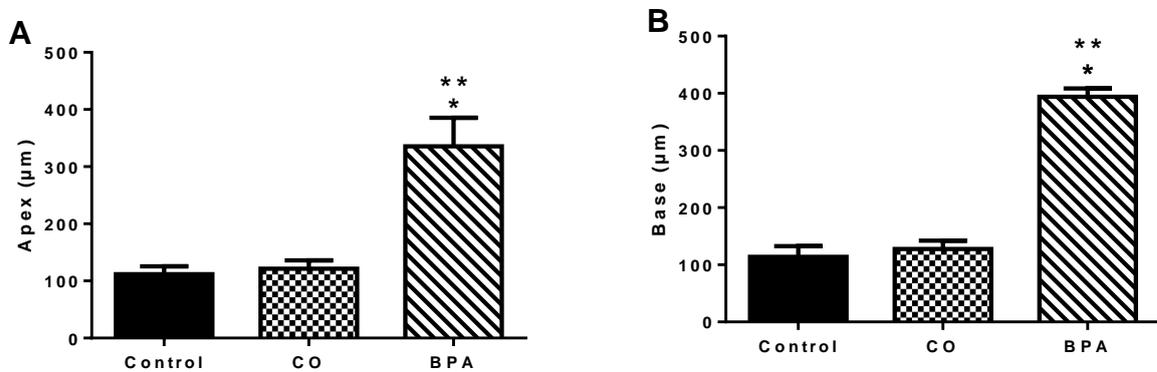
A análise comparativa da morfometria da altura das vilosidades do íleo não revelou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos controle ($428,2 \pm 39,7$), OM ($395,4 \pm 78,9$) e BPA ($385,3 \pm 19,1$) (Figura 3). No entanto, uma diferença significativa ($P < 0,001$) foi observada entre as regiões do ápice e da base das vilosidades do íleo do grupo BPA. O ápice das vilosidades do grupo BPA ($335,7 \pm 49,8$) apresentou aumento significativo de 66,7% e 63,8% quando comparado aos grupos controle ($111,7 \pm 14,1$) e OM ($121,4 \pm 14,6$), respectivamente (Figura 4A). O grupo BPA ($393,8 \pm 14,6$) apresentou aumento significativo de 71,1% e 69,6% quando comparado ao controle ($113,8 \pm 19,1$) e OM ($127,6 \pm 14,5$), respectivamente (Figura 4B). Em relação ao músculo íleo, a camada muscular circular BPA ($131,6 \pm 21,9$) apresentou uma diminuição significativa ($P < 0,05$) de 66,6% e 80,2% quando comparada aos grupos controle ($219,3 \pm 17,7$) e OM ($237,1 \pm 46,0$), respectivamente (Figura 5A). O grupo BPA ($87,6 \pm 14,7$) teve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) de 50% quando comparado ao grupo controle ($131,9 \pm 24,9$) e quando comparado ao grupo OM ($120,4 \pm 20,8$) não apresentou diferença significativa $P > 0,05$ (Figura 5B).

Figura 3 - Histograma da altura das vilosidades em ratos dos grupos controle, OM e BPA.



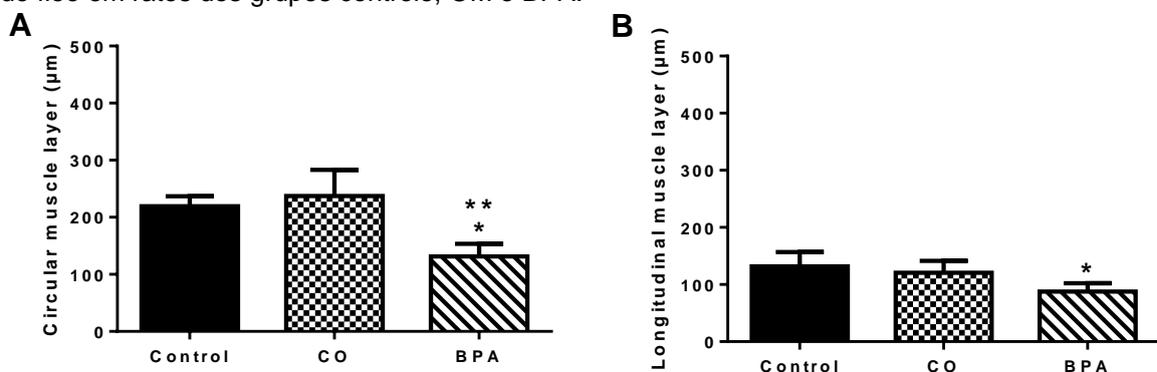
Os dados são de n=5 e são expressos em média ± erro padrão. OM: óleo de milho; BPA: Bisfenol A. $P > 0,05$.

Figura 4 - Histograma da largura do ápice e da base das vilosidades do íleo em ratos dos grupos controle, OM e BPA.



Ápice (A) e base (B). Os dados são de $n=5$ e são expressos em média \pm erro padrão. OM: óleo de milho; BPA: Bisfenol A. (* versus grupo controle; ** versus grupo OM) $P < 0,05$.

Figura 5 - Histograma da espessura da camada muscular circular e da camada muscular longitudinal do íleo em ratos dos grupos controle, OM e BPA.



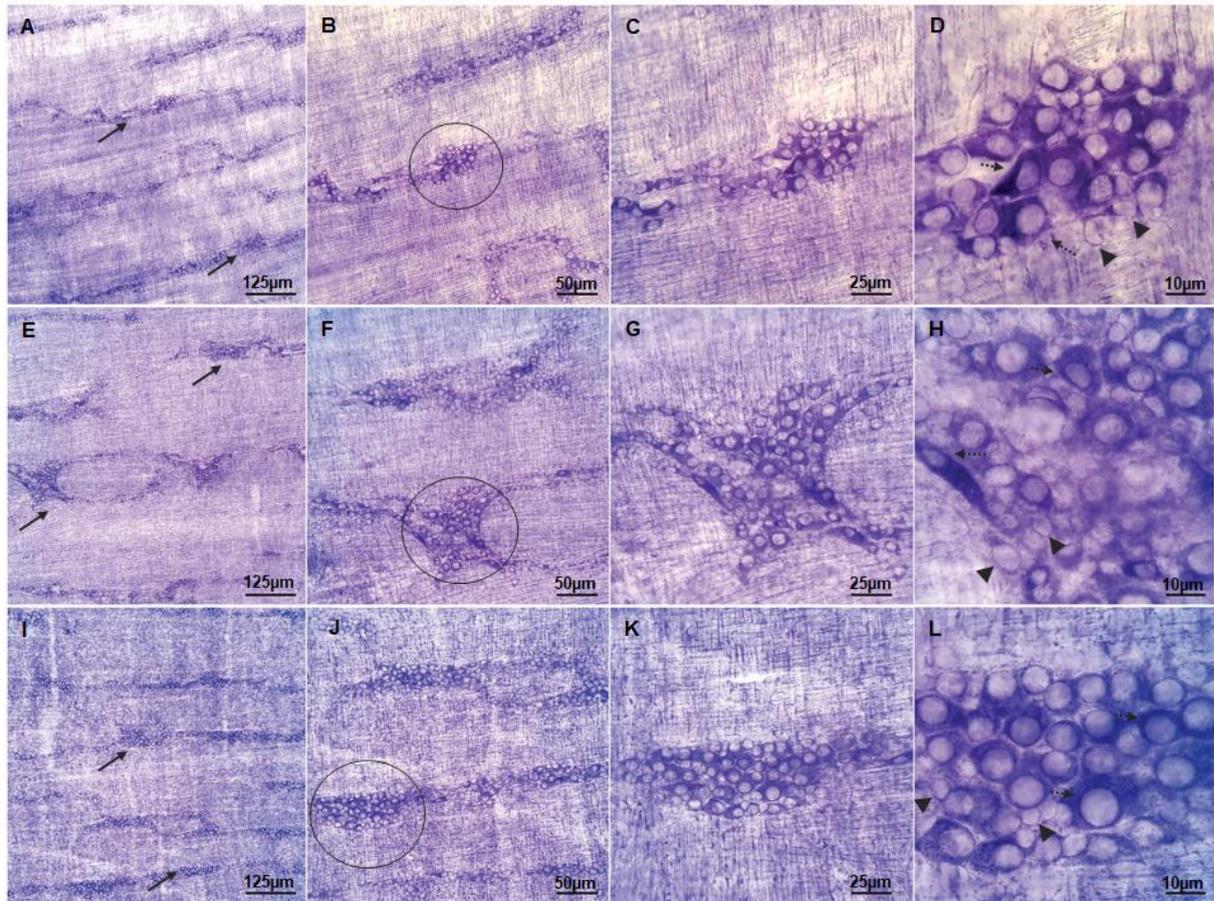
Camada muscular circular (A) e camada muscular longitudinal (B). Os dados são de $n=5$ e são expressos em média \pm erro padrão. OM: óleo de milho; BPA: Bisfenol A. (* versus grupo controle; ** versus grupo OM) $P < 0,05$.

5.2 Análise de NADH-diaforase

Em geral, em todos os grupos, os gânglios foram observados como estruturas alongadas e paralelas, de tamanhos e formas diferentes com quantidades variadas de neurônios, não sendo possível diferenciar os grupos quanto a isso. Em maior aumento (1000x), foram observados neurônios com diferentes formas, tamanhos e intensidades de coloração. Os núcleos dos neurônios do grupo BPA parecem maiores quando comparados aos grupos controle e OM (Figura 6). Na avaliação da densidade

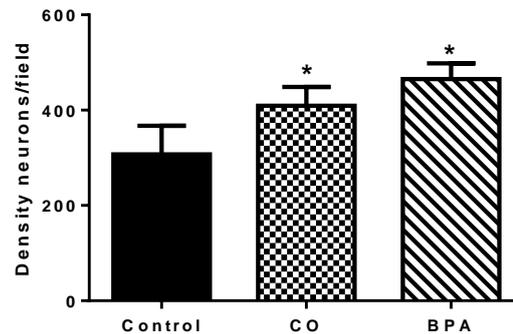
de neurônios positivos para NADH, os grupos OM e BPA apresentaram um aumento significativo ($P < 0,001$) de 24,9% e 34% quando comparados ao grupo controle. O grupo BPA apresentou aumento de 12% quando comparado ao grupo CO, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$) (Figura 7).

Figura 6 - Neurônios mioentéricos do íleo marcados para atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeo-diaforase nos grupos controle, OM e BPA.



Grupo controle (A-D), grupo OM (E-H) e grupo BPA (I-L). A seta mostra as diferentes conformações do plexo mioentérico. O círculo pontilhado mostra as diferenças de densidade em cada grupo. As setas pontilhadas mostram neurônios fortemente marcados. As cabeças dos neurônios de seta são fracamente marcadas. Barras de escala: A, E, I = 125 μm ; B, F, J = 50 μm ; C, G, K = 25 μm , D, H, L = 10 μm .

Figura 7 - Histograma da densidade neuronal no plexo mioentérico do íleo dos grupos controle, OM e BPA.

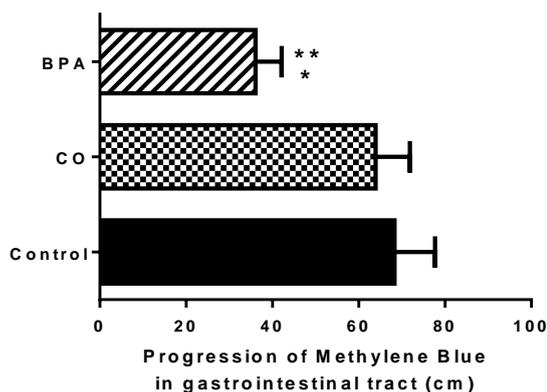


Neurônios por campo: marcação positiva para atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeo-diaforase. Os dados são de $n=5$ e são expressos em média \pm erro padrão. OM: óleo de milho; BPA: Bisfenol A. (* versus grupo controle) $P < 0,05$.

5.3 Análise de Motilidade Gastrintestinal

Nos animais do grupo BPA houve diminuição significativa (47,1% e 43,5%) na progressão do azul de metileno ao longo do intestino delgado in vivo quando comparados aos grupos controle e OM. Não foram observadas diferenças significativas na motilidade gastrointestinal ao comparar o OM e o grupo controle (Figura 8).

Figura 8 - Progressão do corante azul de metileno ao longo do trato gastrintestinal no íleo de rato em animais de controle, OM e BPA.



Progressão em cm. Os dados são de $n=5$ e são expressos em média \pm erro padrão. OM: óleo de milho; BPA: Bisfenol A. (* versus grupo controle; ** versus grupo OM) $P < 0,05$.

06 DISCUSSÃO

Roedores são comumente utilizados como modelos de pesquisa experimentais e têm fornecido uma ampla base de conhecimento em relação à sua fisiologia e patogênese (LAPCHIK, et al., 2010; SIROIS, 2007). O presente estudo utilizou o rato Wistar, porque este apresenta facilidade de trabalho, adequabilidade ao protocolo e disponibilidade. A constituição anatômica visceral do rato é similar à do homem, apresenta porte pequeno, de fácil manuseio cirúrgico, além do baixo custo.

Controvérsias sobre a segurança dos plásticos na indústria alimentícia vêm sendo debatidas. Plastificantes e aditivos plásticos, amplamente utilizados para conferir flexibilidade, resistência e facilidade de manuseio às embalagens plásticas, migram do envoltório plástico para os alimentos ou bebidas (GUERREIRO et al., 2018). Devido à falta de ligações não covalentes entre plastificantes e as embalagens plásticas, pode haver significativa lixiviação e volatilização, levando a contaminação ambiental e alimentar (LE et al., 2008). Por esta razão principal, o interesse aumentou na investigação dos efeitos induzidos em organismos pela presença de xenobióticos, incluindo compostos relacionados à dieta (SERRANO et al., 2014).

A dose escolhida que foi presumida segura por muitos anos, baseado em estudos toxicológicos realizados para avaliação de risco (NOAEL - Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis) foi de 5 mg/kg/dia. (TYL et al. 2002). Essa dose também foi utilizada em trabalhos no metabolismo lipídico (CARNEVALI et al., 2017), no sistema nervoso central (Jardim NS et al, 2017) e no estresse oxidativo hepático (Müller SG et al, 2018). Em janeiro de 2015, a EFSA reduziu a dose segura a um TDI de 4 µg/kg/dia enquanto se aguarda dados de um estudo de longo prazo em ratos (EFSA, 2015). A aplicação via oral foi definida pois é a principal via de exposição ao BPA em humanos (NIEHS, 2010).

O presente estudo demonstrou que o BPA não teve efeito nos pesos corporais inicial e final, contudo, o peso ganho expressou declínio significativo no grupo tratado com BPA. Estes resultados podem ser atribuídos ao efeito tóxico do BPA que poderia influenciar nas vias homeostáticas corporais, como por exemplo mecanismos neurais que controlam o apetite (SCHWITZGEBEL et al, 2009). Além disso, BPA pode alterar as enzimas antioxidantes em diferentes sistemas corporais (HASSANI et al., 2017). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os dados obtidos por Abdel-Rahman et al. (2018), Bushra Munir et al. (2017) e Christiansen et al. (2014), onde obtiveram uma redução significativa no peso ganho em ratos tratados com BPA.

Porém, esses dados divergem aos achados de Rubin; Soto (2009) onde ratos machos e fêmeas expostos ao BPA mostraram um aumento no peso corporal; no entanto, o aumento foi mais persistente nas fêmeas do que nos machos. Estes sugerem que a exposição precoce ao BPA pode influenciar vários mecanismos importantes para a regulação do peso corporal, incluindo a deposição de adipócitos, absorção de glicose e homeostase. Abdel-Rahman et al. (2018) sugerem que variação nos resultados do peso pode ser devido à composição da dieta, período e via de exposição, doses e estirpe animal.

A análise histológica revelou que o Bisfenol não afetou a altura das vilosidades, porém, estas eram mais espessadas com uma grande concentração de células epiteliais no ápice. Visto essa alteração na morfologia da parede intestinal sugere-se que houve uma modificação tanto na capacidade de absorção quanto na seletividade desses elementos. Foi visto por Braniste et al. (2011) que houve uma perda na capacidade de absorção das vilosidades em ratos expostos ao BPA. Sugere-se que para melhorar a capacidade de absorção de nutrientes houve uma grande atividade celular das criptas de Lieberkuhn, onde se encontram células-tronco multipotentes, para aumentar o volume de células epiteliais e absorptivas.

Russell et al. (2012), mostraram que fatores extrínsecos como dieta e xenobióticos podem perturbar a microbiota e, assim, influenciar a suscetibilidade à doença. Segundo Aleksunes; Manautou (2007), após a absorção dos xenobióticos pelo lúmen intestinal e, posterior distribuição na circulação sistêmica, as enzimas metabólicas frequentemente convertem esses xenobióticos em formas menos tóxicas e mais solúveis em água, mas, em alguns casos, seu metabolismo gera mais espécies tóxicas, tornando o trato gastrointestinal particularmente suscetível a doenças do tipo oxidativo.

As camadas musculares delgadas indicam que o BPA comprometeu a musculatura do segmento intestinal estudado, o que poderia induzir mudanças nos componentes do plexo mioentérico, podendo levar a uma alteração na motilidade intestinal nesses animais. Alves et al. (2014) relataram a redução da espessura da camada muscular em animais distróficos de 30/60 dias de idade e, de acordo com esses pesquisadores, essa redução poderia levar a distúrbios na resposta contrátil intestinal.

No presente estudo os neurônios do plexo mioentérico foram observados e quantificados por meio de preparados de membrana do intestino delgado, uma forma

eficiente para estudo da população neuronal, pois permite uma amostragem de grande número de gânglios em apenas um único preparado (SAFFREY, 2004). Segundo Gabella (1971), o plexo mioentérico apresenta-se com gânglios dispostos paralelamente e com um número variável de neurônios que podem exibir coloração mais ou menos intensa. Características que foram vistas neste estudo, podendo esta intensidade de marcação estar relacionada a uma maior atividade de síntese proteica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Essas observações em muito se assemelham àquelas verificadas por Gomes et al, 2006 no intestino delgado de ratos submetidos a privação proteica pré e pós-natal e realimentação pós-natal e por Mizuno et al. (2014) em camundongos obesos.

No que diz respeito a densidade dos neurônios do plexo mioentérico reativos a NADH-d, nosso trabalho mostrou que o BPA levou a um aumento no número desses neurônios, onde parte exibiu uma coloração intensa. Foi descrito que os neurônios entéricos podem mudar suas propriedades morfológicas e químicas sob distúrbios funcionais no trato gastrointestinal afim de manter a homeostase (MAKOWSKA et al., 2017; OPONOWICZ et al., 2018; SZYMANSKA et al., 2018). Com base em nossos achados, sugere-se que esse aumento na densidade neuronal representaria uma alteração no código químico dos neurônios mioentéricos, onde estes passaram a exibir características inibitórias. Foi descrito por Szymanska et al. (2018) que o BPA tem uma influência inibitória no íleo de porcos, onde houve um aumento na porcentagem de neurônios nitrérgicos, bem como uma diminuição nos neurônios colinérgicos. Sarkar et al. (2016) observaram que houve uma redução na motilidade duodenal de ratos, corroborando com nossos achados.

Para concluir, este estudo mostrou que ratos expostos ao BPA durante as fases iniciais pós-desmame apresentaram distúrbios da homeostase intestinal causando uma perda na capacidade de absorção de nutrientes e processo inflamatório agudo. Em associação, esses distúrbios influenciaram na diminuição do trânsito gastrintestinal, medido pela progressão do azul de metileno nos animais vivos, resultando em uma alteração no peristaltismo, o que leva a sugerir alterações no código químico dos neurônios entéricos (neuroplasticidade). No presente estudo, a técnica do NADH foi limitante, não sendo possível determinar as diferentes classes neuronais, para isso se faz necessário um estudo mais aprofundado. Estes dados abrem novos campos de estudos para testar se os distúrbios precoces no sistema

digestório, neural, imune e na microbiota intestinal estão relacionados à exposição ao BPA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio inicial recebido da Universidade Federal do Piauí e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Airton Mendes Conde Júnior foi o pesquisador principal e, junto com Kelly Palombit, foram os responsáveis pelo desenho do estudo. Agradecemos à Universidade de São Paulo e a profa. Dra. Patricia Castelucci que gentilmente cedeu o nitro blue tetrazolium e o NADH para a marcação dos neurônios entéricos. O Prof. Dr. Moises Tolentino que sempre nos recebeu com gentileza em seu laboratório para preparação de substâncias e empréstimo de reagentes. O aluno João Victor Silva Araújo realizou os experimentos e analisou os resultados. Os alunos Geisyane de Castro Paz Oliveira e Marcos Paulo Carvalho auxiliaram na aplicação do BPA, coleta do material e processamento histológico. O técnico Sérgio Paulo Lima Guerra ajudou diariamente no laboratório. A Profa. Dra. Kelly Palombit analisou os resultados e editou o manuscrito. Todos os pesquisadores contribuíram com a preparação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. ABDEL-RAHMAN, H. G. et al. Lycopene: Hepatoprotective and Antioxidant Effects toward Bisphenol A-Induced Toxicity in Female Wistar Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 1-8. 2018.
2. ALEKSUNES, L. M., MANAUTOU, J. E. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol*; **35** (Suppl 4): 459-73. 2007
3. ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. - Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. V.7, pp 346-353, 2011.
4. ALVES, G.A. et al. Intestine of dystrophic mice presents enhanced contractile resistance to stretching despite morphological impairment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; **306** (Suppl 3): G191-9. 2014.
5. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC Nº 41, DE 16 DE SETEMBRO DE 2011.
6. BAE, S.; KIM, J.H.; LIM, Y.H.; PARK, H.Y.; HONG, Y.C. - Associations of bisphenol A exposure with heart rate variability and blood pressure. Hypertension. v. 60, pp. 786-793, 2012.
7. BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.*, v. 24, p. 99-143, 1899.
8. BENACHOUR, N.; ARIS, A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.241, p. 322–8, 2009.
9. BERNARDO, P.E.M. et al. Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade – Uma revisão. *Ver. Inst. Adolfo Lutz*. São Paulo, v. 74, n. 1, p. 1- 11, 2015.
10. BESERRA, M. R. et al O Bisfenol A: sua utilização e a atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde humana. *Revista Eletrônica TECCEN*, v. 5, n. 1 p. 37-46, 2012.
11. BETANCOURT, A.M. et al. Altered Carcinogenesis and Proteome in Mammary Glands of Rats after Prepubertal Exposures to the Hormonally Active Chemicals Bisphenol A and Genistein - *J Nutr*. Jul; v.142, n.7,1382S-8S. doi: 10.3945/jn.111.152058. 2012.
12. BRANISTE, V. et al. Bisphenol A in the Gut: Another Break in the Wall? *Research and Perspectives in Endocrine Interactions*, 2011.
13. BRANISTE, V. et al. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 107, p. 448–453, 2010.

14. BUSHRA, M. et al. Negative effects of bisphenol A on testicular functions in albino rats and their abolitions with *Tribulus terrestris* L. *Braz. J. Pharm. Sci.*;53(3): 2017.
15. CAMARCA, A. et al. Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Function and Dendritic Cell Differentiation Are Affected by Bisphenol-A Exposure. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, 2016.
16. CAO, X.L. ; JIE ZHANGA,J; GOODYERB,C.G.; HAYWARDA, S.; COOKEA, G.M.; CURRANA,I.H.A - Perinatally Administered Bisphenol A as a Potential Mammary Gland Carcinogen in Rats. **Chemosphere** . V. 89, Issue 5, October, PP 505–511, 2012.
17. CARNEVALI, O. et al. Dietary administration of EDC mixtures: A focus on fish lipid metabolism. *Aquat Toxicol* 2017; **185**: 95-104.
18. CASTELUCCI, P. et al. Effects of pre-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res.*, v. 310, p. 1-7, 2002.
19. CHRISTIANSEN, S. et al. Low-dose effects of bisphenol A on oxidative medicine and cellular longevity early sexual development in male and female rats. *Reproduction*; **147** (Suppl 4): 477-87. 2014.
20. COOPER, J. E., KENDIG, E. L., BELCHER, S. M. Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*, v. 85, p. 943-947, 2011.
21. DYCE, K. M., SACK, W. O., WENSING, C. J. G. Trato digestório em: **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp 99- 145, 2004.
22. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J* 2015; **13** (Suppl 1): 3978.
23. FDA. Final Rule 77 FR 41899. Food and Drug Administration; Washington, D.C: 2012. Indirect food additives: polymers. (July 17, 2012).
24. FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; **9**: 286-29.
25. FURNESS, J. B. et al. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: Integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol*; **817**: 39-71. 2014.
26. GATTI, J. B. A presença de Bisfenol A proveniente de vernizes em alimentos e sua implicação na saúde, Informativo CETEA/ITAL. Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens, v. 1, n. 3, 2009.
27. GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. – Cap 17 Sistema Digestivo: Tubo digestivo. *Tratado de histologia em cores* 2 ed., pp. 3877 a 418b; Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

28. GABELLA G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J Anat*, **109** (Suppl 1): 81-95. 1971.
29. GHISELLI, G., JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.
30. GOMES, O.A. et al. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. *Auton Neurosci*; **126-127**: 277-84. 2006.
31. GEENS, T. et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol A. *Food Chem Toxicol*. v. 50, n. 10, p. 3725-40, 2012.
32. GENESER, F – Cap 18: Aparelho digestivo - Histologia. 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 394- 402. 2000.
33. GREGGIO, F. M. et al. Effects of perinatal protein deprivation and recovery on esophageal myenteric plexus. *World J Gastroenterol* 2010; **16** (Suppl 5): 563-570.
34. GUERREIRO T. M. et al. Migration from plastic packaging into meat. *Food Res Int*, **109**: 320-324. 2018.
35. HAMMER, G. D.; MCPHEE, S. J. Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine. McGraw Hill Education. USA, 2014.
36. HASSANI, V. F. et al. Protective effect of crocin on BPA-induced liver toxicity in rats through inhibition of oxidative stress and downregulation of MAPK and MAPKAP signaling pathway and miRNA-122 expression. *Food Chem Toxicol* ; **107** (Pt A): 395-405. 2017.
37. JARDIM, N. S. et al. Bisphenol A impairs the memory function and glutamatergic homeostasis in a sex-dependent manner in mice: Beneficial effects of diphenyl diselenide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017; **329**: 75-84.
38. JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
39. KANG JH.; KATAYAMA Y.; KONDO F. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals. *Toxicology*. v .217, p. 81-90, 2006.
40. KAZEMI, S. et al. Induction effect of bisphenol a on gene expression involving hepatic oxidative stress in rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.
41. KUNZE, W. A. A.; CLERC, N.; BERTRAND, P. P.; FURNESS, J. B. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, v. 517, p. 547-561, 1999.
42. LAPCHI, V. B. V. et al. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

43. LE, H. et al. Bisphenol A is released from polycarbonated drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.* 2, 149–156. 2008.
44. LIND, P.M.; LIND, L. Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly. *Atherosclerosis*. v. 218, p. 207-213, 2011.
45. MAFFINI, M. V.; RUBIN, B.S.; SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A.M. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol A *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 254-255, p. 179-186, 2006.
46. MAKOWSKA, K. et al. T2 toxin-induced changes in cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-like immunoreactivity in the enteric nervous system within selected fragments of the porcine digestive tract. *Neurotox Res*; 31 (Suppl 1): 136-147. 2016.
47. MANIKKAM, M. et al. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One* v. 8, n. 1, 2013.
48. MAROSTI, A. R.; DA SILVA, M. V.; PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; TAVARES-DE-LIMA, W.; CASTELUCCI, P. Differential effects of intestinal ischemia and reperfusion in rat enteric neurons and glial cells expressing P2X₂ receptors. *Histol. Histopathol.*, v. 30, p. 489-501, 2015.
49. MATINI, P.; MAYER, B.; PELLEGRINI, M. S. F. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res.*, v. 288, p. 11- 23, 1997.
50. MENDES, C. E.; PALOMBIT, K.; VIEIRA, C.; SILVA, I.; CORREIA-DE-AS, P.; CASTELUCCI, P. The Effect of Ischemia and Reperfusion on Enteric Glial Cells and Contractile Activity in the Ileum. *Dig. Dis. Sci.*, v. 60, p. 2677–2689, 2015.
51. MICHALOWICZ, J. Bisphenol A - sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 37, n. 2, p. 738-58, 2014.
52. MCKEOWN, S. J.; CHOW, C. W.; YOUNG, H. M. Development of the SP in the large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res.*, v. 303, p. 301-305, 2001.
53. MIZUNO, M. S. et al. Expression of the P2X₂ receptor in different classes of ileum myenteric neurons in the female obese ob/ob mouse. *World J Gastroenterol*; **18** (Suppl 34): 4693-703. 2012.
54. MIZUNO, M. S. et al. Distribution of the P2X₂ receptor and chemical coding in ileal enteric neurons of obese male mice (ob/ob). *World J Gastroenterol*; 20 (Suppl 38): 13911-9. 2014.
55. MÜLLER, S. G. et al. Diphenyl diselenide regulates Nrf2/Keap-1 signaling pathway and counteracts hepatic oxidative stress induced by bisphenol A in male mice. *Environ Res*; **164**: 280-287. 2018.

56. NIEHS. National Institute of Environmental Health Sciences. 2010.
57. OPONOWICZ, A. et al. Changes in the distribution of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-containing neural structures in the human colon affected by the neoplastic process. *Int J Mol Sci*; **19** (Suppl 2): E414. 2018.
58. PALOMBIT, K. et al. Effects of ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the P2X7 receptor. *Dig. Dis. Sci.*, v. 58, p. 3429-3439, 2013.
59. PAULINO, A. S.; PALOMBIT, K.; CAVRIANI, G.; TAVARES-DE-LIMA, W.; MIZUNO, M. S.; MAROSTI, A. R.; DA SILVA, M. V.; GIROTTI, P. A.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on P2X2 receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system. *Dig. Dis. Sci.*, v. 56, n. 8, p. 2262-2275, 2011.
60. POMPOLO, S.; FURNESS, J. B. Quantitative analysis of inputs to somatostatin-immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.*, v. 294, n. 2, 219-26, 1998.
61. QU, Z. D. et al. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res.*, v. 334, p. 147-161, 2008.
62. RUBIN, B. S., SOTO, A. M. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **304** (Suppl 1-2): 55-62.
63. RUSSELL, S. L. et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep*; **13** (Suppl 5): 440-447. 2012.
64. SAFFREY, M. J. Ageing of the enteric nervous system. *Mech Ageing Dev*; **25** (Suppl 12): 899-906. 2004.
65. SARKAR, K.; TARAFDER, P.; PAUL, G. Bisphenol A inhibits duodenal movement ex vivo of rat through nitric oxide-mediated soluble guanylyl cyclase and α -adrenergic signaling pathways. *J. Appl. Toxicol.*, v. 1, p. 131-9, 2016.
66. SAVIDGE, T. C. et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology*, v. 132, p. 1344–1358, 2007.
67. SEACHRIST, D.D.; BONK, K.W.; HO, S.M.; PRINS, G.S. ; SOTO, A.M.; KERI, R.A.- A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod Toxicol.* Jan; v.59, pp. 167-82, 2016.
68. SERRANO, S. E. et al. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ Health*; **13** (Suppl 1): 43. 2014.
69. SHANKAR, A.; TEPPALA, S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 96, p. 3822-3826, 2011.

70. SIROIS, M. *Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e procedimentos*. São Paulo: Editora Roca; 2007.
71. SOMM, E. et al. Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives*; 117 (Suppl 10): 1549-1555. 2009.
72. STUMP, D. G. et al. Developmental Neurotoxicity Study of Dietary Bisphenol A in Sprague-Dawley Rats. *Toxicol. Sci.* V 115, N 1, pp167-182. 2010.
73. SZYMANSKA, K. et al. The Influence of High and Low Doses of Bisphenol A (BPA) on the Enteric Nervous System of the Porcine Ileum. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 917, 2018.
74. THARP, A.P., MAFFINI, M.V., HUNT, P.A., VANDEVOORT, C.A., SONNENSCHNEIN, C., SOTO, A.M. - Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 22; v. 109, n. 21, pp. 8190–8195, 2012.
75. TOUMI, F. et al. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil.*, v. 15, p. 239–242, 2003.
76. TYL, R. W. et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* ; **68** (Suppl 1): 121-146. 2002.
77. USMAN, A., AHMAD, M. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Send to Chemosphere.*; **158**: 131-42. 2016.
78. VANDENBERG, L. N. et al. Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, v. 30, n. 1, p. 75–95, 2009.
79. VÖLKEL, W.; KIRANOGLU, M.; ROMME, H. - Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett.* V. 179, pp.155 a 162, 2008.
80. WILLHITE, C.C.; BALL, G.; MCLELLAN, C.J. - Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *Journal of Toxicology and Environmental Health B Critical Reviews*; v 11, pp. 69-146, 2008.
81. WHO. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. Joint FAO/WHO expert meeting to review toxicological and health aspects of bisphenol A: final report, including report of stakeholder meeting on bisphenol A, Ottawa, Canada, Nov. 2010. ISBN 978 92 14 156427 4 acessado em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/bisphenol-a/en/>; em 14.03.2017.
82. ZOELLER, R.T.; BANSAL, R.; PARRIS, C.; Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology.* V.146, pp. 607–612, 2005.

ANEXOS

CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE
ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



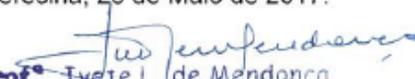
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Efeitos da administração gestacional do bisfenol A sobre o sistema nervoso entérico de ratos wistar*", registrada nº 291/17, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. KELLY PALOMBIT do Departamento de Morfologia/CCS/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **26/05/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Junho/ 2017 à Agosto/ 2019
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	166
Peso/ Idade	200g/ Adulto
Sexo	117 Machos e 49 Fêmeas
Origem	Biotério Central-Universidade Federal do Piauí-Teresina/PI.

Teresina, 26 de Maio de 2017.


Prof.ª Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

