



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS
DE INTERESSE REGIONAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí,
CEP: 64049-550 Telefones: 3215-5856
E-mail: ppgtair@ufpi.edu.br**

JOÃO VICTOR SILVA ARAÚJO

**PLACAS DE PEYER, INGESTÃO DE BISFENOL A E SUPLEMENTAÇÃO COM
SELÊNIO EM MODELOS MURINOS.**

**Teresina
2023**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS
DE INTERESSE REGIONAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí,
CEP: 64049-550 Telefones: 3215-5856
E-mail: ppgtair@ufpi.edu.br**

JOÃO VICTOR SILVA ARAÚJO

**PLACAS DE PEYER, INGESTÃO DE BISFENOL A E SUPLEMENTAÇÃO COM
SELÊNIO EM MODELOS MURINOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional-PPGTAIR da Universidade Federal do Piauí, na área de concentração Diagnósticos avançados em Medicina Veterinária e linha de pesquisa Biotecnologia celular e aplicabilidades como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior
Co-orientador(a): Profa. Dra. Kelly Palombit

**Teresina
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

A663p

Araújo, João Victor Silva.

Placas de peyer, ingestão de bisfenol a e suplementação com selênio em modelos murinos. / João Victor Silva Araújo. -- 2023.
56 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional - Teresina, 2023.

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

1. Trato gastrintestinal. 2. Sistema imunológico. 3. Mucosa Intestinal. 4. Bisfenol A. I. Conde Junior, Airton Mendes. II. Título.

CDD 599.323

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

Placas de Peyer, ingestão de Bisfenol A e suplementação com Selênio em modelos murinos

João Victor Silva Araújo

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior
(Presidente / Orientador) / DMOR/ CCS / UFPI



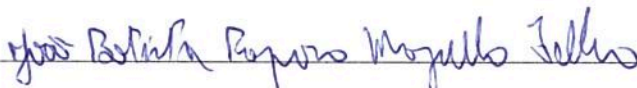
Prof. Dr. José Miguel Luz Parente
(Examinador interno) / DCG/ CCS / UFPI



Profa. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite
(Examinadora externa / DMOR/ CCS / UFPI)



Profa. Dra. Maria Ivone Mendes Benigno Guerra
(Examinadora externa) / DMOR/ CCS / UFPI



Prof. Dr. João Batista Raposo Mazullo Filho
(Examinador externo) ULBRA

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.

À 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.

À minha irmã, Maria Rita Silva Araújo, por nunca ter deixado de discutir comigo sobre a vida, o universo e por sempre torcer por mim. Pelo incentivo aos meus ideais, encorajamento nas horas de dúvidas, pela compreensão e constante participação em minha luta.

Ao Pablo Sávio Costa do Nascimento, meu parceiro de todos os momentos que nunca permitiu que o desalento se instalasse, pela paciência demonstrada mesmo quando as coisas não corriam conforme planejado, pelo permanente incentivo e preocupação com que sempre acompanhou o desenrolar deste meu trabalho.

Ao Professor Dr. Airton Mendes Conde Júnior, meu orientador por contribuir inigualavelmente para minha formação acadêmica, profissional e pessoal; por ter deixado fazer parte do seu grupo de trabalho e, ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho. Agradeço-lhe ainda o tema do trabalho, que sempre me aliciou, o que fez, a maioria das vezes, conseguir ultrapassar dificuldades surgidas.

À minha Coorientadora Professora Dra Kelly Palombit, seu apoio, orientação e idéias fizeram desta uma experiência inspiradora para mim. Você foi mais que uma amiga para mim. Muito obrigado por ter aceitado o desafio de me orientar deste o mestrado até agora, 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!

Ao Sérgio 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

Tecnologias a Animais de Interesse Regional, pela oportunidade de realização do meu tão sonhado Doutorado. Ao Departamento de Morfologia e ao Laboratório de Pesquisa em Ciências Morfológicas (LABCIM) por abrir as portas para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o meu doutorado. Ao Laboratório Citolab pela disponibilidade em contribuir com a Pesquisa.

Aos meus colegas do Departamento de Morfologia e de pesquisa, agradeço por essa amizade que construímos, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Tese 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!

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse, disponibilidade e pela grande contribuição para com meu trabalho. Mas também a 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. E por fim, a todos cujos nomes não foram citados, mas que, cada qual as suas maneiras contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

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

RESUMO

Bisfenol A [2,2-bis (4hidroxifenil) propano, BPA], um dos desreguladores endócrinos, é objeto de grande preocupação devido ao uso generalizado em todo o mundo. Diversos estudos têm demonstrado que o BPA apresenta efeitos tóxicos quando ingerido, tornando o contato dessa substância um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios em diversos órgãos, dentre eles, o intestino e o tecido linfóide associado ao mesmo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia das placas de Peyer de ratos jovens suplementados com selênio expostos ao BPA. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPI, com o protocolo número 583/19. 28 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) filhotes machos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Controle (CT), BPA, Se e BPA+Se. O desmame dos filhotes foi realizado no 21º dia e, a partir do dia 22 pós-natal, os animais do grupo BPA receberam doses diárias de 5 mg/kg de BPA diluído em 0,3 ml de óleo de milho, administradas por via oral. O grupo Se recebeu 10 µg/kg de Se, o grupo BPA+Se recebeu 5 mg/kg de BPA e 10 µg/kg de Se e o grupo CT não recebeu nenhuma substância, porém passaram pelo processo de gavagem oral. Após 4 semanas de exposição, os filhotes foram anestesiados e eutanasiados para coleta do intestino e posterior análise histológica, imunohistoquímica e morfometria. Nossos resultados mostraram que o BPA causou danos na camada epitelial das placas de Peyer, houve um desarranjo estrutural na arquitetura da região folicular dos grupos BPA e BPA+Se, zonas de inflamação com presença de vacúolos no tecido. Também foi observado uma redução da expressão por Ki-67 das placas de Peyer no grupo BPA, bem como uma redução significativa nos números de células de defesa no mesmo. Os animais que foram expostos ao BPA e que receberam suplementação com Se não mostraram danos na camada epitelial e não houve redução da expressão por Ki-67. O BPA, quando ingerido acima do nível de segurança, alterou tecido das PP e reduziu a proliferação celular. Além disso, o BPA reduziu a população de células imunes nas placas de Peyer. O Se foi capaz de reverter os danos observados, sugerindo um potencial agente antioxidante.

Palavras-Chave: Trato gastrointestinal, Sistema imunológico, Mucosa Intestinal, Bisfenol A.

ABSTRACT

Bisphenol A [2,2-bis(4hydroxyphenyl)propane, BPA], one of the endocrine disruptors, is of great concern due to its widespread use throughout the world. Several studies have shown that BPA has toxic effects when ingested, making contact with this substance a risk factor for the development of diseases in various organs, including the intestine and associated lymphoid tissue. Therefore, the objective of this work was to study the morphology of Peyer's patches in young rats supplemented with selenium and exposed to BPA. The study was approved by the UFPI Animal Use Ethics Committee, with protocol number 583/19. 28 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were randomly divided into 4 groups: Control (CT), BPA, Se and BPA+Se. The pups were weaned on the 21st day and, from the 22nd postnatal day, the animals in the BPA group received daily doses of 5 mg/kg of BPA diluted in 0.3 ml of corn oil, administered orally. The Se group received 10 µg/kg of Se, the BPA+Se group received 5 mg/kg of BPA and 10 µg/kg of Se and the CT group did not receive any substance, but was subjected to the oral gavage process. After 4 weeks of exposure, the puppies were anesthetized and euthanized for intestinal collection and subsequent histological, immunohistochemical and morphometric analysis. Our results showed that BPA caused damage to the epithelial layer of Peyer's patches, there was a structural disarray in the architecture of the follicular region of the BPA and BPA+Se groups, zones of inflammation with the presence of vacuoles in the tissue. A reduction in Ki-67 expression in Peyer's patches was also observed in the BPA group, as well as a significant reduction in the number of defense cells in the group. Animals exposed to BPA, but supplemented with Se, showed no damage to the epithelial layer and there was no reduction in Ki-67 expression. BPA, when ingested above the safe level, altered PP tissue and reduced cell proliferation. Additionally, BPA reduced the immune cell population in Peyer's patches. Se was able to reverse the observed damage, suggesting antioxidant potential.

Keywords: Gastrointestinal tract, Immune system, Intestinal mucosa, Bisphenol A.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenho experimental do estudo.	26
Figura 2. Aplicação de BPA e Se via gavagem oral.	27
Figura 3. Incisão na região abdominal de rato expondo as alças intestinais.	28
Figura 4. Técnica de microtomia e protocolo padrão de coloração por Hematoxilina e Eosina.	29
Figura 5. Técnica de microtomia e protocolo de coloração especial por Tricrômico de Masson.	31
Figura 6. Aspecto geral das placas de Peyer no intestino delgado de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se coradas pela técnica de HE.	32
Figura 7. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se coradas pela técnica HE.	34
Figura 8. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se marcadas com ki-67.	35
Figura 9. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se marcadas com BCL-2.	36
Figura 10. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se coradas pelo método de Tricrômico de Masson.	37
Figura 11. Número de leucócitos das Placas de Peyer.	38

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µm – Micrômetros

AhR - Receptores De Hidrocarboneto Aril

ANOVA – Análise de Variância

APC's - Células Apresentadoras De Antígenos

AR - Receptores De Andrógenos

BPA – Bisfenol A

BPA + Se – Bisfenol A + Selênio

CCA – Centro de Ciências Agrárias

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CEUA – Comitê de Ética no uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CT – Controle

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

ER - Receptores de estrogênio

G.A.L.T - Gut-associated lymphoid tissue

GPX - Glutathione redutase

h – Hora(s)

H.E – Hematoxilina – Eosina

IHQ - Imunohistoquímica

IgA – Imunoglobulina A

IgM – Imunoglobulina M

Kg – Quilograma

M.A.L.T - Mucosa-associated lymphoid tissue

mg – Miligrama

MHC - Major Histocompatibility Complex

min – Minutos

mL – Mililitro

Na-Se - Selenito de Sódio

°C – Graus Celsius

OVA – Ovalbumina

pH – Potencial Hidrogeniônico

PP – Placas de Peyer

PPAR - Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo

Se – Selênio

SeNPs - Nanopartículas Biogênicas De Selênio

T.D.I. – Ingestão Diária Tolerável

TRxR - Tiorredoxina retudase

UFPI – Universidade Federal do Piauí

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Sistema Digestório e Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal.....	15
2.2 Bisfenol A.....	17
2.3 Bisfenol A e Células do Sistema Imunológico.....	18
2.4 Selênio e Células do Sistema Imunológico.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo Geral.....	25
4.2 Objetivos Específicos.....	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1 Aspectos éticos.....	26
5.2 Animais e Aplicação do Bisfenol A.....	26
5.3 Coloração por Hematoxilina e Eosina.....	28
5.4 Imunohistoquímica.....	29
5.5 Coloração por Tricrômico de Masson.....	30
5.6 Análise Morfométrica.....	31
5.7 Análise Estatística.....	31
6. RESULTADOS.....	32
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO I.....	56

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal é composto por vários tipos celulares, como células epiteliais, células caliciformes e células do sistema imunológico que desempenham um papel significativo na homeostase intestinal. Uma vez que o trato gastrointestinal está exposto a um número significativo de patógenos, estruturas como as placas de Peyer atuam na identificação dos antígenos e na produção de anticorpos (OKUMURA; TAKEDA, 2017; ZHANG; WU, 2020; REBOLDI; CYSTER, 2016; PANNEERSELVAM; BUDH, 2020).

As placas de Peyer (PP's) são um grupo de folículos linfoides bem-organizados localizados na lâmina própria e na submucosa da porção distal do intestino delgado - íleo. Nessa estrutura, os linfócitos B residem nos centros germinativos desses folículos onde ocorre sua maturação, e os linfócitos T estão na zona parafolicular. Em seus ápices, as PP's contêm células M (microdobras), enterócitos que expressam MHC de classe II. Eles endocitam a forma particulada de antígenos e os levam para as células apresentadoras de antígenos (APCs) (BIAGIO SOLARINO et al., 2009; PANNEERSELVAM; BUDH, 2020; MÖRBE et al., 2021).

Sabe-se que uma disfunção da homeostase intestinal contribui para a patogênese da doença inflamatória intestinal (DII). Compostos químicos como desreguladores endócrinos são substâncias capazes de interferir na síntese, na secreção e no metabolismo de hormônios. Além disso, essas substâncias químicas são capazes de modular a resposta imunológica do organismo. Dentre elas, destaca-se o Bisfenol A (BPA) conhecido por ligar-se aos receptores de estrógenos e assim interferir nas suas ações (MALOY; POWRIE, 2011; VANDENBERG et al., 2012; Ratajczak-Wrona et al., 2020; MILANO et al., 2022).

Estudos mostraram que o BPA pode penetrar nos alimentos durante o armazenamento em latas, recipientes de plástico ou papel. Lavar ou aquecer embalagens, assim como outros manuseios, podem estimular a liberação de BPA, e consequentemente, causar aumento da concentração dessa substância nos alimentos (ELHAM et al., 2023). Várias vias de exposição ao BPA foram descritas, incluindo o sistema digestório (ingestão), a transmissão vertical (materno fetal), o sistema respiratório (inalação) e o sistema tegumentar (contato com a pele) (ALMEIDA et al., 2018; LÓPEZ-RODRÍGUEZ et al., 2021; FAHEEM et al., 2021; JANG et al., 2022).

Lai et al. (2016) revelaram em seu estudo que exposição ao BPA alterou a composição da microbiota intestinal de forma semelhante à ingestão de uma dieta rica em gordura e sacarose. Além disso, um estudo realizado por Mao et al. (2023) mostrou que a exposição ao BPA perturbou as comunidades da microbiota intestinal dos ratos, o que por sua vez alterou o metabolismo do BPA. Özaydın et al. (2018) mostraram que essa substância causou acúmulo de células de defesa nas PP's e no baço.

O selênio (Se) se tornou um elemento de grande interesse tendo em vista seu efeito antioxidante. Neste sentido, a suplementação de Se pode provocar redução do risco de danos em vários órgãos, como intestino, coração, pulmão e rins, assim como determinar efeito protetor contra toxicidade por substâncias como o BPA, já demonstrado em alguns estudos (WETHERILL et al., 2007; WANG et al., 2015; AL-AMOUDI, 2018).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema Digestório e Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal

O trato gastrointestinal é composto por órgãos cavitários e parenquimatosos, que se estende desde a boca até o esôfago, estômago e intestino, bem como órgãos acessórios, notadamente o pâncreas, fígado e vesícula biliar e tem como função degradar e absorver nutrientes, além de eliminar os resíduos (DANIEL et al., 2014; MASS et al., 2020).

Os intestinos iniciam-se a partir do piloro e se estendem até o reto. O intestino delgado é composto pelo 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).

O epitélio intestinal tem função bimodal de maximizar a absorção de nutrientes digeridos, pois é composto primariamente por enterócitos, as células epiteliais intestinais são colunares e estão envolvidas na absorção de nutrientes e funções metabólicas. Além disso, essas células formam uma barreira com permeabilidade seletiva entre a bainha epitelial e o conteúdo luminal e liberam imunoglobulina A (IgA) secretória para o lúmen, como também participam ativamente da imunidade por produzirem peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias em resposta à ativação de seus receptores de reconhecimento de patógenos (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 intestino é considerado importante local de interação antigênica, uma vez que está em constante contato com microrganismos comensais, patogênicos, bem como moléculas derivadas de alimentos ingeridos. Assim, o desenvolvimento e progressão das respostas imunológicas nesse local devem ser regulados, evitando

por um lado uma reação exacerbada e prejudicial ao organismo frente a antígenos que devem ser incorporados, e ao mesmo tempo promovendo uma resposta efetiva contra patógenos, quando necessária (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; DE VOS WM et al., 2022, DILLON et al., 2021, NOBS et al., 2020, CAMILLERI, 2019, DOMINGUEZ-BELLO MG et al., 2019).

O tecido linfoide não envelopado, composto por células do sistema imunológico, está associado às superfícies mucosas do trato gastrointestinal e sistemas respiratório e urinário e referidos coletivamente como M.A.L.T. Especificamente na mucosa intestinal está o sistema G.A.L.T (*gut-associated lymphoid tissue*), constituído de tecido linfoide denso, representado por folículos linfoides isolados no intestino grosso ou formando agregados como nas PP's no íleo (ABBAS, 2014; CAMILLERI, 2012 SUZUKI, K. et al 2007).

As PP's são estruturas semelhantes a linfonodos, não encapsuladas, cuja superfície são livres de vilosidades e glândulas de Lieberkühn, formadas por agregados de folículos linfoides com centros germinativos. Vistas a olho nu, morfologicamente as PP são áreas alongadas e espessadas. Em humanos, as PP's localizam-se particularmente na porção final do intestino delgado, e em outros animais como a alpaca, essa estrutura está localizada nas três porções do intestino (MASS et al., 2020; FLORES, J.; NAVARRETE, M.; SATO, 2020)

As células M (*microfold cells*) compreendem um grupo celular muito importante no transporte dos antígenos do lúmen para as PP's e folículos linfoides isolados. Essas são células epiteliais achatadas, caracterizadas por numerosas invaginações basais e estão localizadas em regiões do epitélio que recobrem a parte superior das PP's e folículos isolados (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008; SUZUKI et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2019; MASS et al., 2020).

As células M são responsáveis pela captação de antígenos por endocitose, transporte para macrófagos e células linfoides adjacentes, as quais migram então para outros compartimentos do sistema linfoide. Isso permite que células dendríticas e macrófagos teciduais capturem esses antígenos para serem transportados até os folículos linfoides. Há também linfócitos T e B efetores (linfócitos T CD4 auxiliares, linfócitos T CD8 citotóxicos e plasmócitos secretores de IgA) previamente ativados/diferenciados nos G.A.L.T ou linfonodos drenantes (VOLMAN; RAMAKERS; PLAT, 2008; SUZUKI et al., 2007; CHEN, et al., 2020; SUN; NGUYEN; GOMMERMAN, 2020).

2.2 Bisfenol A

Bisfenol é um nome genérico dado a um grupo de difenilalcanos comumente empregados, principalmente, na indústria de fabricação de produtos plásticos. Desse grupo, o bisfenol A (BPA) é o que mais se destaca, sendo componente de processos industriais na produção de policarbonatos, resinas epóxi e resinas de poliéster-estireno insaturadas e agentes retardantes de chama, garrafas de água e leite devido a sua dureza (VANDENBERG et al., 2009; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2010; OMEROGLU; ZDAL; BULUT, 2017; VOGEL, 2009; BIEDERMANN et al., 2010; ERICKSON, 2008; JIMENEZ-DIAZ et al., 2010; BERNARDO et al., 2015).

A produção comercial de BPA iniciou aproximadamente em 1950, quando as primeiras resinas epóxi foram desenvolvidas. Essas resinas eram geralmente utilizadas no revestimento interno de embalagens de alimentos e bebidas, para protegê-los do contato direto com os metais (RUBIN, 2011). Outras aplicações incluem seu uso como estabilizante na produção de plásticos (inclusive embalagens de alimentos), como revestimento interno nas latas de alumínio usadas em bebidas, como selante dentário, como antioxidante, dentre outras (EFSA 2023; FLINT et al., 2012).

O BPA [2,2-bis (4hidroxifenil) propano, BPA] é um composto orgânico sintético, no qual suas moléculas estão unidas por ligações ésteres. Estas estão sujeitas à hidrólise quando expostas a altas temperaturas ou à ação de substâncias ácidas ou básicas, resultando na contaminação de alimentos e bebidas (RUBIN, 2011; GIULIVO et al., 2016). Esse fato é evidente já que uma das maiores vias de exposição ao BPA é a ingestão, seguida da inalação e administração intravenosa (CALAFAT et al., 2008; ELHAM et al., 2023; MANZOOR, 2022; CHOWDHURY et al., 2016).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, 2023) realizou uma reavaliação dos riscos para a saúde pública relacionados com a presença de BPA nos gêneros alimentícios. Esta organização estabeleceu uma redução da ingestão diária tolerável (TDI) de BPA de 4 µg/kg de peso corporal por dia para 0,2 ng/kg de peso corporal por dia.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) demonstrou que 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. Šimková et al. (2020) demonstraram em sua pesquisa que

materiais compósitos dentários contendo Bis-GMA Charisma Classic, Filtek Ultimate Universal Restorative, Charisma Diamond "livre de BPA" e Admira Fusion liberam 9,1 ng/g, 15,4 ng/g, 1,6 ng/g e 2,1 ng/g respectivamente.

O BPA sofre conjugação metabólica no tecido hepático através da enzima Uridina-difosfoglucuronosil-transferase (UGT), processo denominado de glucuronidação e no intestino pelas sulfotransferases (SULT), sendo uma reação de sulfatação. Esta representa cerca de 20% das reações em humanos e 5% em roedores (EFSA, 2023).

O BPA tem uma estrutura semelhante ao estrogênio, sendo classificada como um disruptor químico endócrino (EDC), podendo se ligar a receptores de estrogênio (ER), receptores de andrógenos (AR), receptores de hidrocarboneto aril (AhR) e receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR) (ALMEIDA et al., 2018; VOM SAAL; WELSHONS, 2014; FAN et al., 2015; WETHERILL et al., 2005; ISO et al., 2006; ZIV-GAL et al., 2013).

Estudos mostraram que o BPA pode levar a distúrbios como diabetes, obesidade, puberdade precoce, e hipertireoidismo. Também têm efeitos adversos sobre a fertilidade, o sistema nervoso e o comportamento (VANDEMBERG et al., 2009; THARP et al 2012; STUMP et al 2010; MANNIKKAM et al., 2013; BAE et al., 2012).

2.3 Bisfenol A e Células do Sistema Imunológico

Humanos e animais estão expostos a esse poluente sintético nos alimentos, na água potável e no ar. Estudos afirmam que esse composto atua como desregulador endócrino no organismo, mas sua atividade danifica diretamente o sistema imunológico (KHARRAZIAN; VOJDANI, 2016; BANSAL et al., 2017; ÖZAYDIN et al., 2018; ZBUCKA-KRETOWSKA et al., 2017; MA et al., 2019; LIU et al., 2020).

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo causado pelo BPA promove reações inflamatórias em vários tecidos do corpo, distúrbios na resposta imune, progredindo para uma série de efeitos adversos (GU et al., 2019). Estudos de Malaisé et al. (2018) e Malaisé et al. (2020) mostraram que o BPA aumentou a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 17 (IL-17) no intestino e desencadeou um perfil de células T helper 17 no baço de camundongos. Além disso o BPA aumentou a secreção de IL-17 por essas células T em esplenócitos, assim como em células imunes intestinais isoladas de camundongos fêmeas expostas a baixas doses.

Kuo et al. (2012) e Hirahara; Nakayama (2016) descreveram em seus trabalhos que o BPA pode reduzir a sobrevivência das células imunes, levando a uma alteração do equilíbrio imunológico, modulando as respostas imunes e contribuindo, por exemplo, para doenças autoimunes e doenças alérgicas.

Gao et al. (2020), constataram que a exposição perinatal ao BPA resultou em um desequilíbrio de células T reguladoras (Th17) na prole masculina pela ativação da via PI3K/Akt/mTOR. Liu et al., 2020 demonstraram que a exposição ao BPA alterou a expressão de miR-27b-3p e CYP1B1 em linfócitos de carpa, induzindo estresse oxidativo que causou o processo de apoptose pela via mitocondrial.

Segundo Park et al. (2020) a exposição ao BPA no epidídimo pode induzir a infertilidade masculina por meio de dois mecanismos desequilibrados da homeostase imunológica, interrompendo a capacidade das células basais de perceber mudanças ambientais ou levando a uma quebra da fagocitose dos macrófagos através da redução negativa de projeção intraepitelial e citocinas relacionadas à inflamação. Além disso, altas concentrações de exposição a longo prazo ao BPA podem deprimir significativamente as atividades das enzimas ACP e AKP que representam a capacidade imune inata do corpo (ZHANG et al., 2020).

Estudos sobre o efeito nocivo do BPA nas células de defesa fizeram grandes avanços. Tais estudos mostraram que o BPA pode interferir diretamente na função dessas células, alterando o fenótipo celular e reduzindo a capacidade de movimentação e eliminação de patógenos (RATAJCZAK-WRONA et al., 2020). Balistrer et al. (2017) relatou que o BPA alterou a função *in vitro* dos neutrófilos, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), quimiotaxia e morte bacteriana. Além disso, observaram alterações na imunidade inata *in vivo*, principalmente naqueles com função imune comprometida.

Ratajczak-Wrona et al. (2021) que demonstraram que o BPA influencia as funções dos neutrófilos associados à locomoção e eliminação de patógenos, o que pode perturbar a resposta imune dessas células em mulheres e homens. No entanto, Hernández Avila et al. (2019) encontraram em seus resultados que o BPA administrado durante o período neonatal não teve impacto em nenhuma porcentagem da população de células B, mas afetou sua capacidade de gerar IgM de alta afinidade, medida por sua reatividade em antígenos tumorais.

Como mencionado anteriormente, o BPA afeta muitos sistemas do corpo, incluindo o sistema respiratório. Evidências mostram que o BPA promove

sensibilização e inflamação das vias aéreas, comprometendo a função imunológica, intensificando processos alérgicos e asma. Como prova disso, podemos citar a pesquisa de Koike et al. (2018) na qual foi observado que a exposição a baixas doses de BPA durante o período de desenvolvimento juvenil afetou a inflamação pulmonar induzida pela ovalbumina com aumento alérgico, inflamação das vias aéreas e imunidade função celular, bem como a resposta Th2 em ratos.

Yang et al. (2020) demonstraram que a exposição ao BPA reduziu a metilação da MAPK1 5'CGI, sugerindo que esses fatores podem estar relacionados ao desenvolvimento de asma em crianças. Os resultados da pesquisa realizada por Wang et al. (2020) indicaram que o BPA piorou a inflamação pulmonar induzida por OVA e induziu função imune anormal em camundongos, e seu mecanismo foi relacionado à ativação da via de autofagia pela regulação negativa da expressão de mTOR. Isso porque após a supressão da autofagia realizada em seu estudo, a resposta inflamatória enfraqueceu, sugerindo tratamentos alternativos relacionados às doenças inflamatórias.

Vários estudos foram publicados relatando seus efeitos sobre a atividade carcinogênica deste composto no organismo. Estudos recentes mostraram que, mesmo em baixas doses, o estresse oxidativo causado pelo acúmulo de BPA no organismo proporciona efeitos genotóxicos, causando disfunção celular, apoptose e resposta inflamatória. Wang et al. (2019) mostraram que a absorção de BPA na dieta induziu estresse oxidativo e reduziu a capacidade antioxidante, causando uma resposta inflamatória local mediada pela expressão do gene da citocina pró-inflamatória, gerando apoptose pelo aumento da expressão gênica e atividade enzimática entre os membros da família das caspases.

Nava-Castro et al. (2019) demonstram que a exposição ao BPA favoreceu o crescimento de tumores derivados do escroto de camundongos e modulava as porcentagens de diferentes células imunes no baço e linfonodos periféricos. Além disso, descobriram que a expressão de citocinas relacionadas à inflamação (IL-10 e TNF- α) em tumores estava significativamente aumentada em comparação com os grupos controle e veículo.

Danos mutagênicos relacionados à atividade cromossômica em células mononucleares também são mencionados. Os resultados de um estudo de Pietro et al. (2020) mostraram que o BPA poderia induzir um efeito bifásico na proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), sendo pró-proliferativo em

baixas concentrações e antiproliferativo em altas doses, induzindo aberrações cromossômicas e causando a aparecimento de células fragmentadas caracterizadas por um elevado número de cromossomos fragmentados e pulverizados.

Tran; Herz; Lamy, (2020) descobriram que a exposição a longo prazo a baixas doses de BPA reduziu a atividade da telomerase em células T CD8 + ativadas, nas quais os telômeros mostraram um encurtamento significativo de seu comprimento. Também relataram redução no número de cópias de DNA mitocondrial, proliferação celular e IFN- γ , bem como supressão da proteína hTERT, em linfócitos CD8+.

2.4 Selênio e Células do Sistema Imunológico

Como um importante oligoelemento, o selênio (Se) desempenha um papel importante no funcionamento do corpo humano, pois é utilizado para a biossíntese de selenoproteínas (proteínas que contêm um ou mais resíduos de selenocisteína). *In vivo*, as funções das selenoproteínas humanas são muito diversas, como a atividade antioxidante (MINICH et al., 2022; AVERY; HOFFMANN, 2018).

As funções críticas das selenoenzimas incluem participação na regulação da síntese dos hormônios tireoidianos, aumento da fertilidade masculina e efeitos anti-inflamatórios. Entre as 25 selenoproteínas identificadas em humanos, GPxs e TrxRs são enzimas antioxidantes bem reconhecidas (HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020; MINICH et al., 2022; LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014).

GPX atuam indiretamente no mecanismo de cicatrização de feridas. Outras selenoproteínas incluem a selenoproteína-S que regula as citocinas inflamatórias e a selenoproteína-P que serve como indutor da homeostase. A importância do Trx para muitos aspectos da função celular torna provável que essas desempenhem um papel na proteção contra danos oxidativos, crescimento e transformação celular e na reciclagem do ascorbato de sua forma oxidada (HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020; BJØRKLUND et al., 2021; MUSTACICH, 2000).

O sistema imunológico depende da ingestão adequada de selênio na dieta e esse nutriente exerce seus efeitos biológicos principalmente por meio de sua incorporação às selenoproteínas. Estudos relatam que o selênio é um micronutriente essencial que desempenha um papel crucial no efeito das respostas imunes (SHAKOOR et al., 2021; GOMBART; PIERRE; MAGGINI, 2020; CALDER et al., 2020).

Yao et al. (2021) verificaram em seu estudo que a suplementação de selênio

aumentou a expressão de GPX4 em células T, aumentou o número de células T_{FH} e promoveu respostas de anticorpos em camundongos imunizados e adultos jovens após a vacinação contra influenza. Espaladori et al. (2020) concluíram que a incorporação de Se, seja como medicação intracanal isoladamente ou em conjunto com outras medicações, pode potencializar o reparo tecidual periapical após procedimentos de limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares.

Hu et al. (2021) concluíram que a suplementação de Se está associada a reduções nos níveis de autoanticorpos tireoidiano (TPOAb, TGAb e TSH) em pacientes com tireoidite linfocítica crônica e ao aumento de hormônios tireoidianos (GPx3 e SePP1). Esses resultados podem ser explicados assumindo que o Se pode ter o potencial de aumentar a capacidade antioxidante e aumentar as células T reguladoras ativadas *in vivo* de pacientes com tireoidite de Hashimoto.

O BPA pode prejudicar o funcionamento de órgãos e sistemas internos, incluindo os sistemas nervoso, gastrointestinal, cardiovascular, reprodutor e excretor (WAZIR; MOKBEL, 2019). Estudos demonstraram que a deficiência de selênio pode levar a múltiplos danos nos tecidos e órgãos do corpo e pode coexistir com exposições tóxicas crônicas ao BPA (CHEN et al., 2022; LIU et al., 2022a; LIU et al 2022b).

Yin et al. (2023) concluíram que a deficiência de selênio e a exposição ao BPA induziram a piroptose do tecido traqueal em galinhas através da via NF- κ B/NLRP3/Caspase-1, e a exposição ao BPA exacerbou a piroptose traqueal induzida por deficiência de selênio. Chen et al. (2022) descobriram que a deficiência de Se promoveu significativamente a expressão de apoptose renal e necrose em rins de frango expostos ao BPA. Além disso, seus resultados mostraram que o BPA agravou a apoptose e a necrose em rins de frango com deficiência de Se por meio da regulação do estresse oxidativo e da via de sinalização PI3K/AKT.

Por outro lado, estudos anteriores mostraram que o uso apenas de selênio amenizou a toxicidade do BPA no fígado, testículos e pulmões (ABEDELHAFFEZ et al. 2017; AMRAOUI et al., 2018; KHALAF et al., 2019; AHMED ZAKI et al., 2021; BASHIR et al. 2022). Kaur et al. (2021) verificaram que a suplementação de Se restaurou consideravelmente as atividades das enzimas antioxidantes e reduziu as expressões de quinases ativadas pelo estresse, que diminuíram ainda mais a apoptose. Assim, a suplementação de Se demonstrou ser eficaz contra o dano testicular provocado pelo BPA. Güzel et al. (2020) verificaram que efeitos oxidativos e proliferativos celulares do BPA foram aumentados pela ativação do potencial receptor

transitório vanilóide 1 (TRPV1), mas sua ação sobre os valores foi diminuída pelo tratamento com selenito de sódio (Na-Se).

3. JUSTIFICATIVA

Por ser um composto químico importante na indústria para a fabricação de produtos plásticos, quantidades alarmantes de BPA são produzidas todos os anos, tornando a exposição crônica a essa substância um fator a ser considerado dentro da miríade de outros agentes tóxicos as quais os seres humanos estão sujeitos.

Muitos são os estudos demonstrando os efeitos do BPA sobre diversos órgãos e vias metabólicas, dentre eles, o fígado, órgão que desempenha diversas funções no corpo. O BPA sofre conjugação metabólica por glucoronidação no tecido hepático, o que torna o fígado um órgão vulnerável à essa substância, mesmo em baixas doses, fato que já foi evidenciado por estudos que avaliaram a hepatotoxicidade induzida pela exposição ao BPA.

O Se, um dos principais agentes do sistema de defesa contra danos oxidativos, exerce efeitos benéficos já comprovados sobre os danos promovidos pela exposição ao BPA em órgãos como pulmão e testículo. No entanto, estudos que possam avaliar a influência desse micronutriente sobre o tecido linfóide associado ao sistema digestório, afetado pelo BPA, ainda são escassos, visto que esse sistema é o primeiro ao entrar em contato a essa substância quando ingerida.

Dessa forma, este estudo se propôs a demonstrar os efeitos da suplementação de Se sobre o sistema imunológico associado ao trato gastrintestinal, contribuindo para estudos futuros sobre possíveis tratamentos das alterações induzidas pelo BPA.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar a morfologia das placas de Peyer de ratos jovens suplementados com selênio expostos ao BPA.

4.2 Objetivos Específicos

- Observar os efeitos do BPA na morfologia das placas de Peyer através de técnicas histoquímicas;
- Avaliar os parâmetros histopatológicos e histomorfométricos após exposição ao BPA e suplementação com selênio;
- Quantificar a expressão dos marcadores Ki-67 e BCL-2 através de técnica imunohistoquímica para potencial de agressão biológica;
- Descrever os efeitos da suplementação de selênio na lesão intestinal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

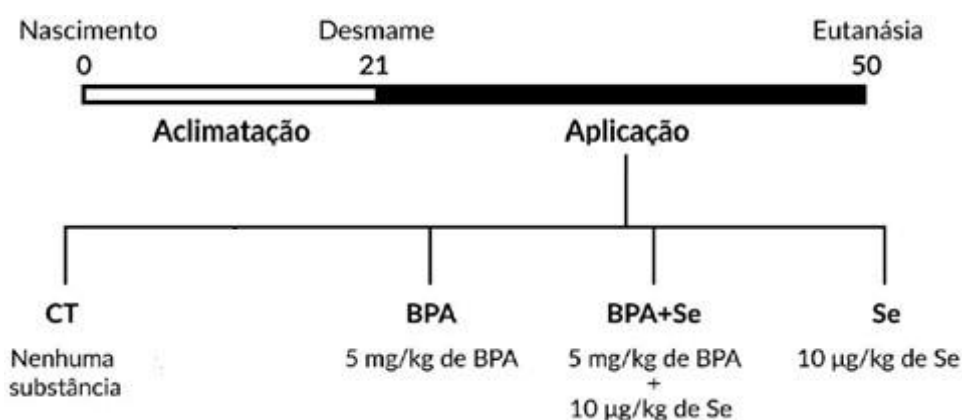
O delineamento da pesquisa é do tipo experimental. Todos os procedimentos descritos relacionados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Piauí, com o protocolo número 583/19 (Anexo A). Os procedimentos realizados neste estudo estão em conformidade com as diretrizes éticas para experimentação animal preconizadas no “*European Communities Council Directive*” de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC) sobre as recomendações dos cuidados e uso de animais de laboratório.

5.2 Animais e Aplicação do Bisfenol A

Foram utilizados 28 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) jovens (n=7/grupo estudado), obtidos do Biotério do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Foi fornecido aos animais ração e água à vontade.

Os animais foram mantidos com suas matrizes até o 21º dia pós-natal no Biotério do Departamento de Biofísica e Fisiologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) e divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle (CT); Grupo BPA, Grupo BPA+Se e Grupo Se. O desenho experimental do estudo está representado na Figura 1.

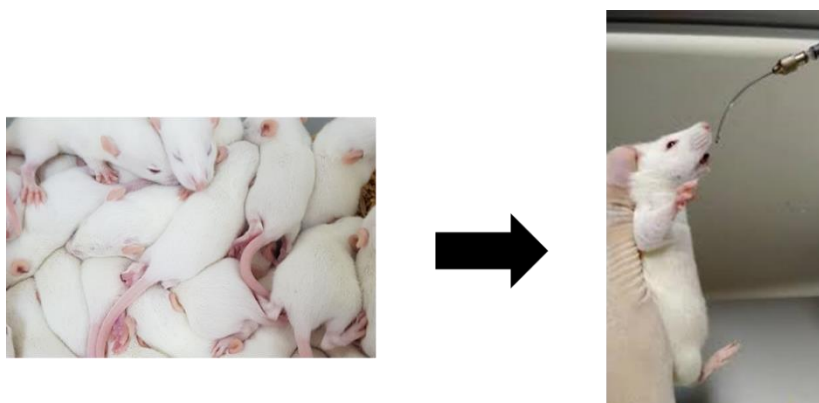
Figura 1. Desenho experimental do estudo.



Fonte: Dados do estudo, 2023. Os números representam os dias desde o nascimento até a eutanásia.

A partir do 22º dia pós-natal, os filhotes machos do grupo BPA (n=7) receberam doses diárias de 5 mg/kg de BPA (dose já utilizada pelo grupo de pesquisa, Chem Service Inc.®, West Chester, PA) diluído em 0,3 ml de óleo de milho administradas por via oral com gavagem. O grupo BPA+Se (n=7) recebeu doses diárias de 5 mg/kg de BPA + 10 µg/kg de Se dissolvido em água (utilizado na forma de selenito de sódio - Na₂SeO₃ - Dinâmica®). O grupo Se (n=7) recebeu 10 µg/kg de Se dissolvido em água (utilizado na forma de selenito de sódio - Na₂SeO₃ - Dinâmica®) e o grupo CT (n=7) não recebeu nenhuma substância, porém passaram pelo processo de gavagem oral (Figura 2) (AL-AMOUDI, 2018).

Figura 2. Aplicação de BPA e Se via gavagem oral.

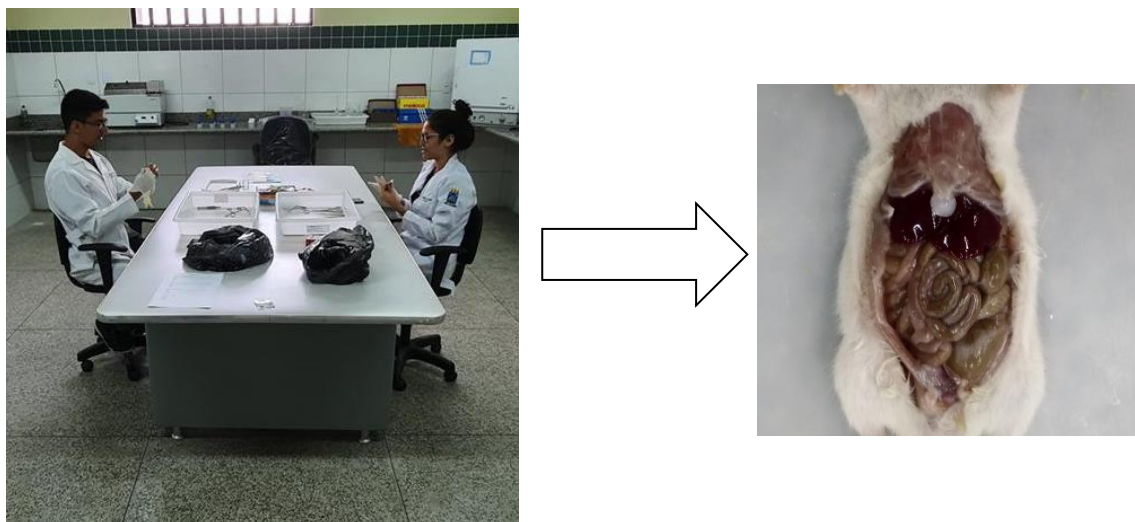


Fonte: Dados do estudo, 2023. Representação dos grupos animais e técnica de gavagem via oral.

Após 4 semanas de exposição e suplementação, os animais foram levados ao Laboratório de Pesquisa em Ciências Morfológicas (LABCIM-UFPI), onde foi realizado o protocolo de eutanásia no qual estes receberam uma dose de analgésico (Tramadol 4mg/kg - via intraperitoneal) e após 5 minutos foram anestesiados com uma associação anestésica de xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (80 mg/kg) administrados por via intramuscular profunda.

Em seguida, os animais foram eutanasiados utilizando uma superdose anestésica, e então foi realizada uma incisão na região abdominal do animais, expondo as alças intestinais para retirada do material a ser estudado. Os tecidos foram armazenados em solução de formalina tamponada a 10% (Figura 3).

Figura 3. Incisão na região abdominal de rato expondo as alças intestinais.



Fonte: Dados do estudo, 2023. Protocolo de eutanásia dos animais e exposição das alças intestinais.

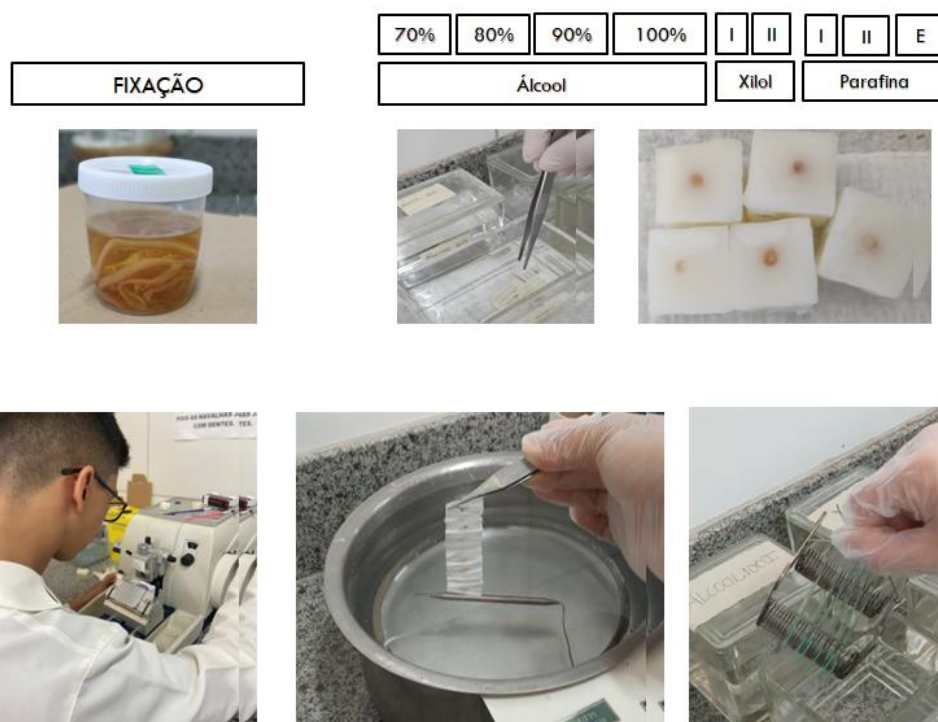
5.3 Coloração por Hematoxilina e Eosina

O processamento iniciou com desidratação do tecido com subseqüentes imersões de 60 min com álcool etílico (Synth, Brasil) 70%, 80%, 90% e 100%. Posteriormente começou a diafanização ou clarificação em Xilol PA (Anidrol, Brasil) em dois banhos de 60 min cada. Na seqüência a impregnação e inclusão em parafina histológica (Easy Path, Brasil) liquefeita sendo submetido a duas imersões de 30 min com temperatura controlada máxima de 60 °C (Figura 4).

Após a secagem e enrijecimento dos blocos de parafina foi realizado os cortes do tecido no micrótomo rotativo RM2235 (Leica Biosystem, Brasil) para obtenção de cortes na espessura de 5,0 µm despejados em lâmina fosca de vidro para iniciar a coloração. As lâminas foram desparafinizadas permanecendo 10 min em estufa a 60 °C e completada em três banhos de xilol, por 5 min cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 5 min cada e lavados em água corrente por 10 min (Figura 4).

Em seguida, os cortes foram contracolorados pela Hematoxilina de Harris por 45 seg e lavados em água corrente durante 5 min, sendo, em seguida corados pela Eosina por 25 seg. Por fim, as lâminas foram banhadas em concentrações crescentes de álcool etílico (Synth, Brasil) 100% e 70 % durante 5 min seguidos de 2 banhos em Xilol PA (Anidrol, Brasil) por 5 min cada para montagem da lâmina (Figura 4).

Figura 4. Técnica de microtomia e protocolo padrão de coloração por Hematoxilina e Eosina.



Fonte: Dados do estudo, 2023. Fixação do intestino, processamento histológico, microtomia e protocolo padrão de coloração por Hematoxilina e Eosina.

As fotos dos tecidos foram obtidas utilizando microscópio de luz e a câmera de celular Xiaomi 11, versão Mi 11 Lite 5G, (9216x6912). As pranchas histológicas foram confeccionadas utilizando o software GIMP versão 2.10.34.

5.4 Imunohistoquímica

A reação de imunohistoquímica (IHQ) aconteceu no laboratório privado Citolab, localizado na cidade de Teresina-Piauí. A imunomarcagem foi realizada com anticorpo anti-Bcl-2 (CONFIRM anti-bcl-2 (124) - Mouse Monoclonal Primary Antibody, Ventana, Roche®, Estados Unidos) e anti-Ki-67 (CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) - Rabbit Monoclonal Primary Antibody, Ventana, Roche®, Estados Unidos) expresso no citoplasma e no núcleo, respectivamente.

Os tecidos foram fixados, embutidos em parafina e cortados em aproximadamente 4 μm de espessura com auxílio do micrótomo rotativo de parafina LUPETEC Modelo MRP2015. Sequencialmente, os fragmentos, após o corte, formaram fitas que foram transferidas para um banho histológico contendo água destilada a uma temperatura de no máximo 50 $^{\circ}\text{C}$ e mantidos até sua distensão. Em

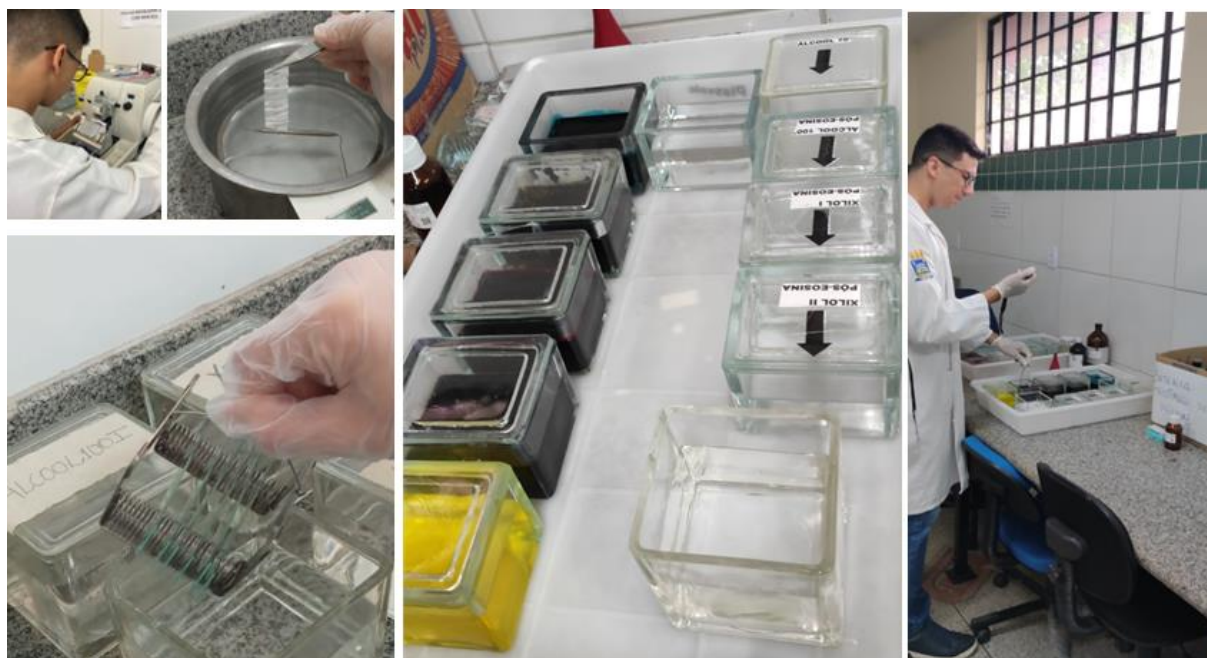
seguida, foram colocadas em lâminas TOMMO (VWR®) carregadas positivamente para análise de IHQ.

As lâminas contendo as amostras de interesse foram desparafinizadas em um banho em xilol, hidratadas em três banhos de álcool etílico 99%, em seguida, submetidas à reação automatizada no equipamento BENCHMARK IHC/ISH (Ventana, Roche®, Estados Unidos). O processo mecanizado utilizou o kit de detecção ultraView DAB Detection Kit, os anticorpos avaliados, os reagentes, os contrastantes e pós contrastantes (Hematoxilin II e Bluing Reagent), conforme fornecido pelo fabricante. Em seguida, as lâminas foram preparadas para montagem com lamínula (24x50mm) e resina acrílica e por fim analisadas descritivamente. As fotos dos tecidos foram obtidas utilizando microscópio de luz e a câmera de celular Xiaomi 11, versão Mi 11 Lite 5G, (9216x6912). As pranchas foram confeccionadas utilizando o software GIMP versão 2.10.34.

5.5 Coloração por Tricrômico de Masson

As lâminas foram desparafinizadas permanecendo 10 min em estufa a 60 °C e completada em três banhos de xilol, por 5 min cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 5 min cada e lavados em água corrente por 10 min. Em seguida, as lâminas passaram por um processo de mordentação em solução de Bouin por uma noite em temperatura ambiente. Após esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin e, em seguida, lavadas em água destilada. Os tecidos então foram corados em solução de Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 min e lavados em água corrente por 10 min. Depois de lavadas em água destilada, os tecidos foram corados em solução de Escarlata de Biebrich por 5 min e após lavagem em água destiladas, houve o processo de diferenciação em solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolíbídico por 15 min. Após lavagem em água destilada, o material foi corado em solução de Fast Green durante 10 min. Após esse processo, os tecidos foram levados a solução de Ácido Acético Glacial 1% por 5 min e seguidamente desidratados e diafanizados para montagem das lâminas (Figura 5).

Figura 5. Técnica de microtomia e protocolo de coloração especial por Tricrômico de Masson.



Fonte: Dados do estudo, 2023. Microtomia e protocolo de coloração especial por Tricrômico de Masson.

As fotos dos tecidos foram obtidas utilizando microscópio de luz e a câmera de celular Xiaomi 11, versão Mi 11 Lite 5G, (9216x6912). As pranchas histológicas foram confeccionadas utilizando o software GIMP versão 2.10.34.

5.6 Análise Morfométrica

O número de leucócitos foi contado em todas as preparações de montagem através de uma câmera de vídeo digital de alta resolução acoplada ao microscópio óptico (Leica Mycosystems DM 400, Alemanha). As imagens foram transmitidas a um computador (Pentium Dual Core Duo), utilizando o software Leica X (LASX) com uma ampliação de 1000 ×. Todas as células bem delimitadas em cada fragmento foram contadas. Para a quantificação foram feitas contagens em cinco campos microscópicos alternados para cada animal na região do centro germinativo das PP's.

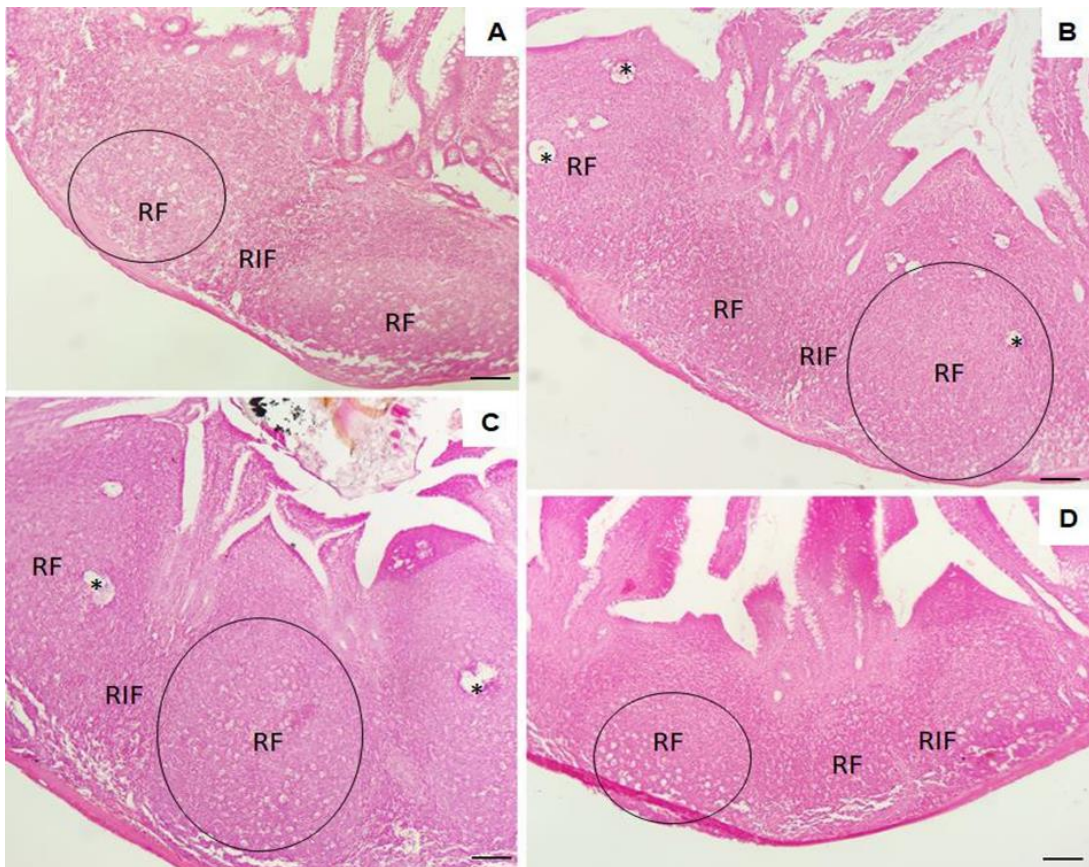
5.7 Análise Estatística

Os grupos estudados tiveram seus dados comparados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey, com um nível de significância de $p < 0,05$. A análise foi feita utilizando o GraphPad Software, San Diego, CA, EUA.

6. RESULTADOS

As PP's estão localizadas na camada mucosa do intestino delgado. Macroscopicamente, não foi evidenciada diferença morfológica qualitativa entre os grupos. Em relação ao número de folículos por placa observou-se que era variável em todos os grupos, sendo mais frequente a presença de dois a três em cada uma delas (Figura 6).

Figura 6. Aspecto geral das placas de Peyer no intestino delgado de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se coradas pela técnica de HE.



Seções histológicas das placas de Peyer de ratos Wistar machos dos grupos. Controle - CT (A), Bisfenol A - BPA (B), Bisfenol A + Selênio - BPA +Se (C) e Selênio - SE (D). RF: Região Folicular; RIF: Região Interfolicular; (*) vacúolos inflamatórios. Barras de escala: aumento de 40x.

No grupo CT, observou-se que a estrutura histológica da camada epitelial das PP's é do tipo cilíndrico simples (Figura 7 A-B), com presença de células produtoras de muco (células caliciformes), enterócitos com borda em escova indicando certa função absorptiva, presença de linfócitos intraepiteliais e células achatadas em sua superfície (células de microfold). Também foi possível observar presença de linfócitos na região folicular com parênquima íntegro, e com ausência de vacúolos na sua

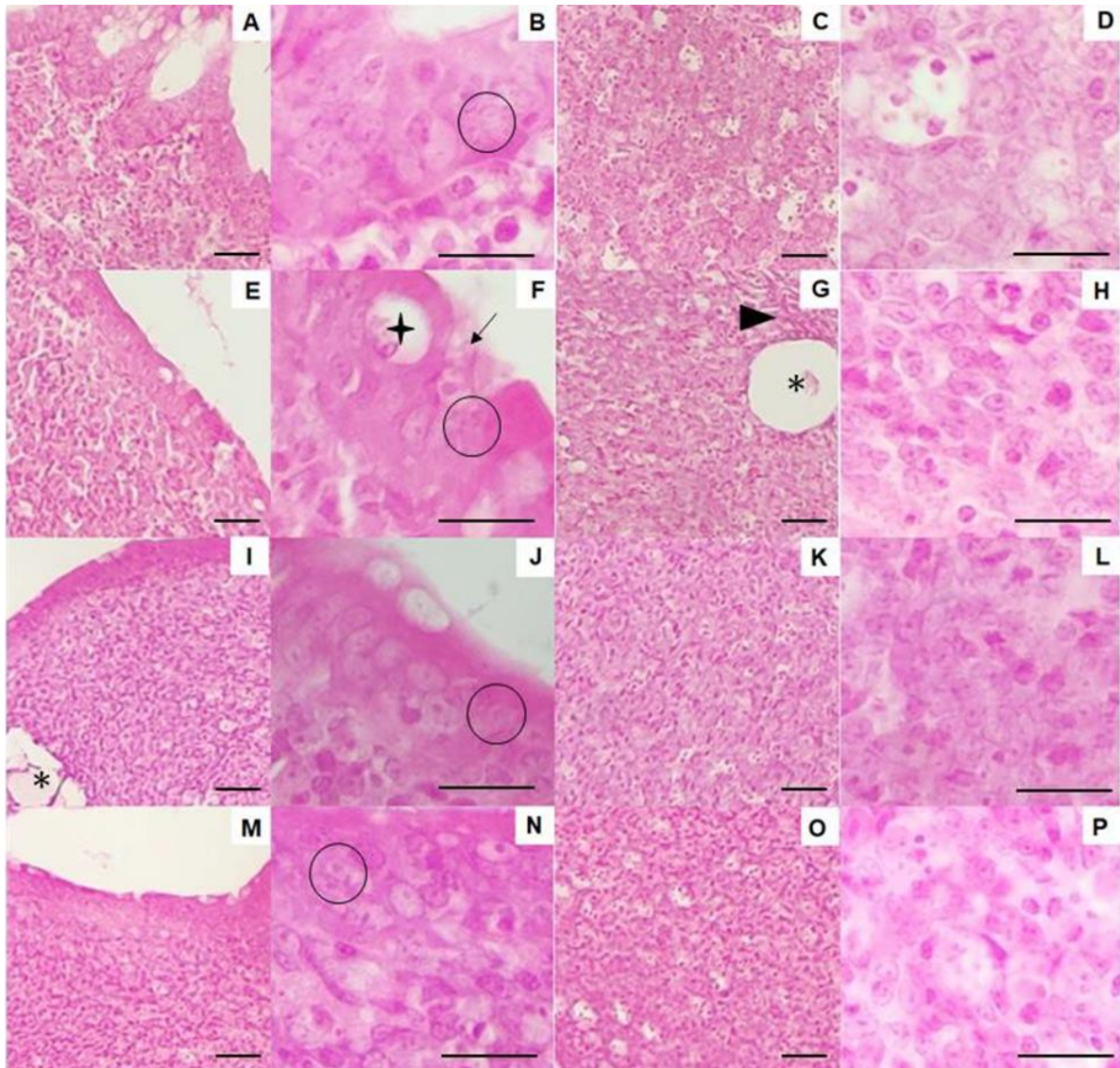
estrutura.

Entretanto, observou-se uma desorganização da camada epitelial do grupo BPA (Figura 7E), apresentando uma descontinuidade da mesma, e alterações morfológicas nas células calciformes sugerindo que esse contaminante levou a processos apoptóticos na camada epitelial prejudicando reparos na mesma (Figura 7F). Nos grupos BPA+Se e Se (Figura 7 I-M), a camada epitelial foi preservada quando comparado ao grupo CT (Figura 7 A-B).

Verificou-se que houve um desarranjo estrutural na arquitetura da região folicular dos grupos BPA e BPA+Se, onde foram notadas zonas de inflamação, principalmente a região basal das PP's com presença de vacúolos na sua estrutura (Figura 7G). Nota-se que a inflamação foi menos acentuada no grupo BPA+Se quando comparado ao grupo BPA, o que mostra uma atividade antioxidante e anti-inflamatória do Se sob tecido o exposto ao BPA.

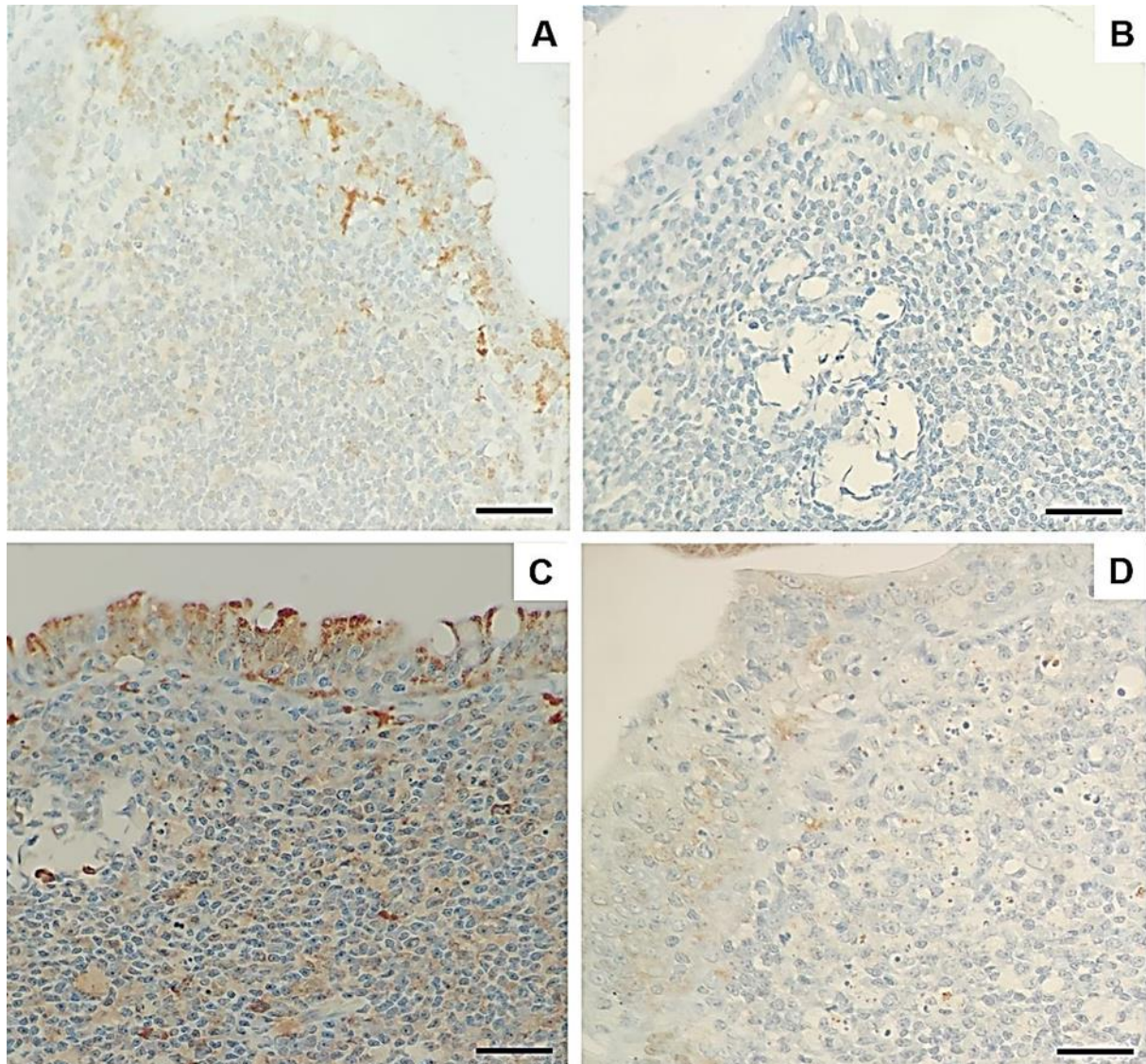
A avaliação imunohistoquímica dos marcadores celulares revelou que houve redução no processo de proliferação celular no grupo BPA quando comparado aos outros grupos. Além disso, houve uma intensa marcação Ki-67 no grupo BPA+Se, quando comparado aos outros grupos (Figura 8). Todavia, não houve marcação nos grupos submetidos a reação com BCL-2 (Figura 9).

Figura 7. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se coradas pela técnica HE.



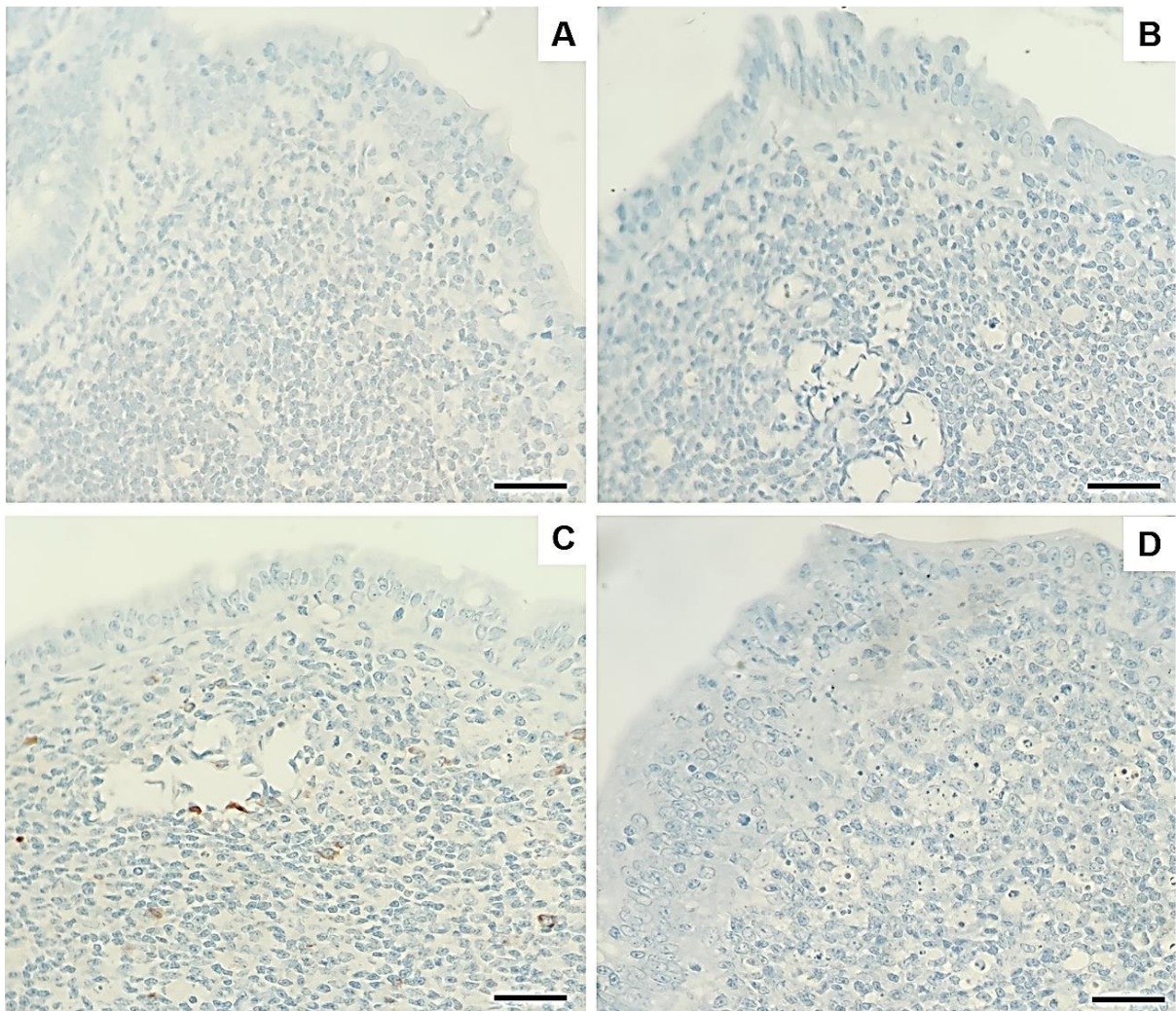
Secções histopatológicas das placas de Peyer de ratos Wistar machos dos grupos Controle - CT (A, B, C e D), Bisfenol A - BPA (E, F, G e H), Bisfenol A + Selênio - BPA +Se (I, J, K, L) e Selênio - SE (M, N, O, P). O grupo CT mostrando estrutura normal, com epitélio cilíndrico simples, com presença de linfócitos intraepiteliais (círculo) e linfócitos na região folicular (C e D). O grupo BPA apresentou alterações teciduais na camada epitelial onde observa-se processos apoptóticos (seta), presença de vacúolos (*) e células imunológicas (cabeça de seta) (G - H). O grupo BPA + Se não apresentou alterações na camada epitelial, porém na região folicular observou-se presença de vacúolos (*) e grande atividade celular. O grupo Se apresentou uma arquitetura semelhante ao grupo CT. Barras de escala: A - C, E - G, I -K, M e O - aumento de 100x; B - D, F - H, J - L, N e P - aumento de 400x.

Figura 8. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se marcadas com ki-67.



Secções histológicas das placas de Peyer de ratos Wistar machos dos grupos Controle - CT (A), Bisfenol A - BPA (B), Bisfenol A + Selênio - BPA +Se (C) e Selênio - SE (D) submetidas a técnica de imunohistoquímica para expressão dos antígenos. Observa-se que a proliferação celular foi reduzida no grupo BPA quando comparada aos outros grupos. A marcação de Ki-67 foi intensa principalmente na camada epitelial das placas de Peyer. Barras de escala: aumento 200x.

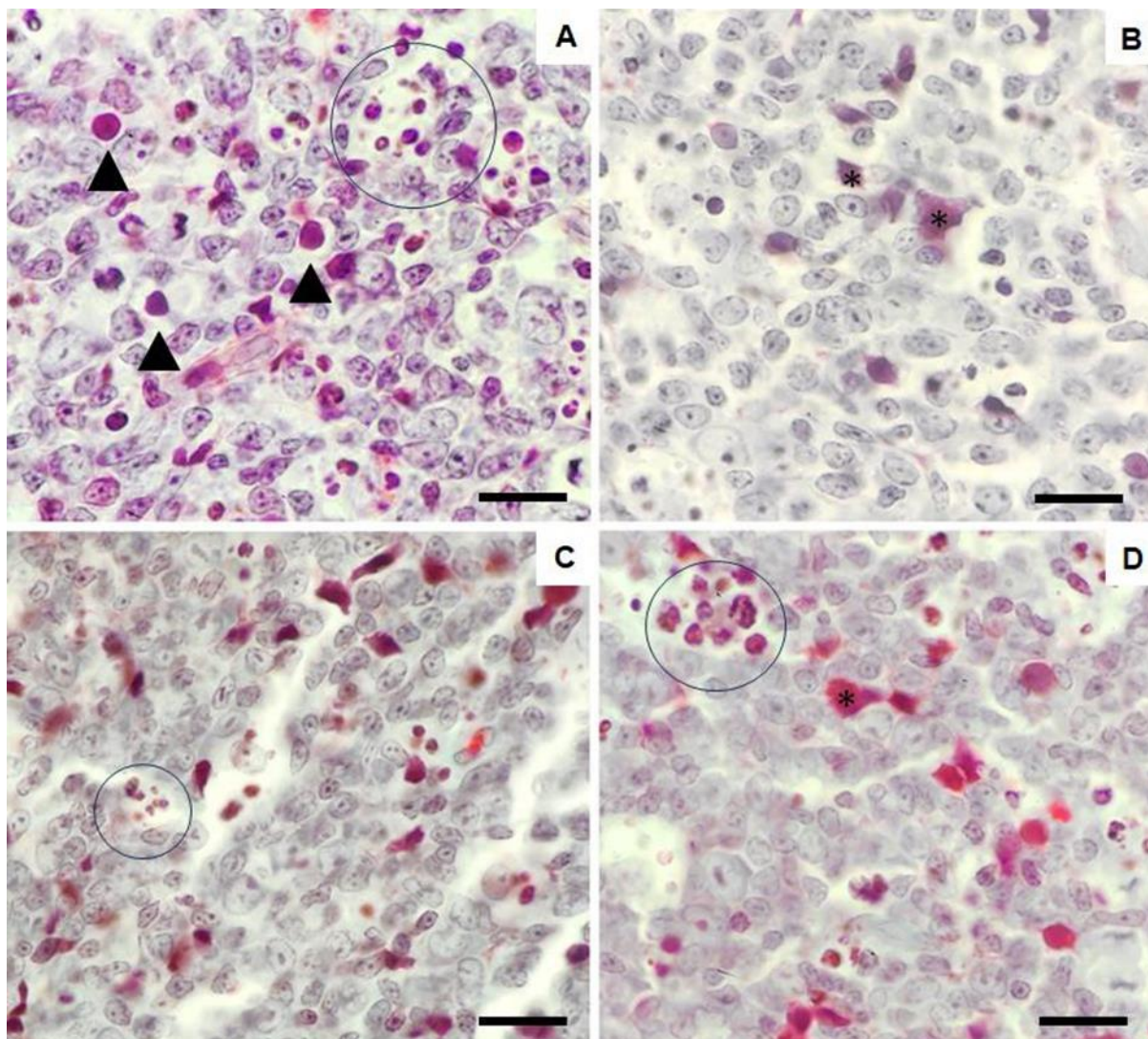
Figura 9. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se marcadas com BCL-2.



Secções histológicas das placas de Peyer de ratos Wistar machos dos grupos Controle - CT (A), Bisfenol A - BPA (B), Bisfenol A + Selênio - BPA +Se (C) e Selênio - SE (D). Não foi observado marcações de BCL-2 nas placas de Peyer dos grupos estudados, exceto no grupo BPA + Se. Barras de escala: aumento 200x.

A técnica de coloração especial por Tricrômico de Masson revelou uma diferenciação entre as células imunológicas que compõem as placas de Peyer e o tecido conjuntivo pertencente da mesma (Figura 10).

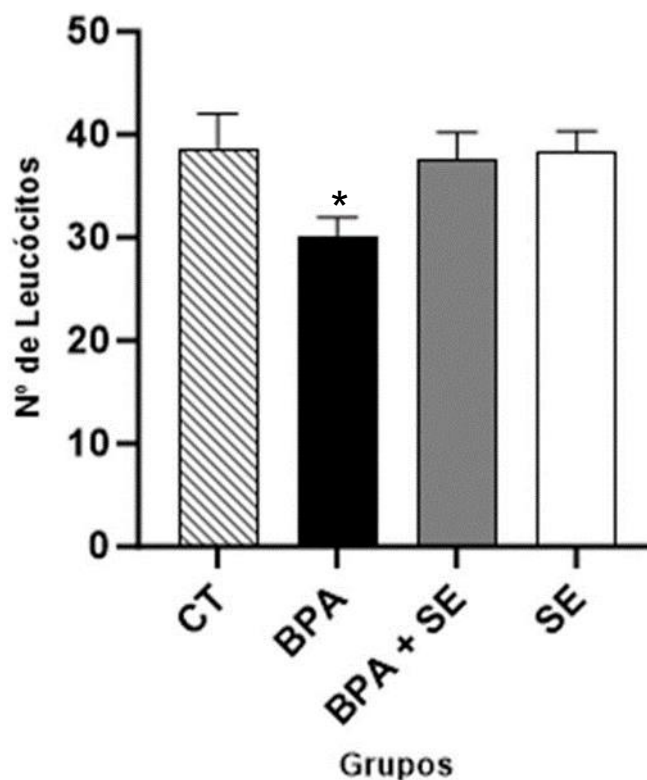
Figura 10. Fotomicrografia das placas de Peyer de ratos Wistar dos grupos CT, BPA, BPA+Se e Se coradas pelo método de Tricrômico de Masson.



Seções histológicas das placas de Peyer de ratos Wistar machos dos grupos Controle - CT (A), Bisfenol A - BPA (B), Bisfenol A + Selênio - BPA +Se (C) e Selênio - SE (D) coradas pelo método de tricrômico de Masson. Observou-se a presença de linfócitos (cabeça de seta), grupos de leucócitos (círculo) e macrófagos (*) em todos dos grupos estudados. Barras de escala: aumento 1000x.

Em maior aumento (1000x), foram observados leucócitos de variados tamanhos e intensidades de coloração. Após mensuração, foi observado que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de células de defesa nas PP's no grupo BPA ($30,08 \pm 1,87$) quando comparado aos outros grupos (CT: $38,72 \pm 3,30$; BPA+Se: $37,56 \pm 2,61$; Se: $38,36 \pm 1,98$) (Figura 11). Entretanto, foi observado uma presença maior de macrófagos no grupo BPA e BPA+Se. Não foram observadas diferenças significativas no número de células imunológicas nos outros grupos.

Figura 11. Número de leucócitos das Placas de Peyer.



Fonte: Dados da pesquisa, 2023. Número de células nas placas de Peyer na região do centro germinativo dos grupos. Controle - CT, Bisfenol A - BPA, Bisfenol A + Selênio - BPA+Se e Selênio - SE, ($p < 0,05$). (* versus grupos CT; BPA+Se; Se).

7. DISCUSSÃO

Esse trabalho mostrou que o tratamento com BPA promoveu uma alteração na camada epitelial das PP's, induzindo a possíveis processos apoptóticos e alterações morfológicas nas células caliciformes. Esses resultados também foram observados no trabalho de Feng et al. (2019), onde descobriram que além de levar a processos apoptóticos, o BPA ainda reduziu o número de células caliciformes, inibiu a expressão de proteínas de junção apertada e alterou a diversidade e a composição estrutural da microbiota, eventualmente reduzindo a permeabilidade intestinal em camundongos.

Esses resultados não corroboram com os achados de Özaydin et al. (2018) onde em seus grupos experimentais não foram observadas alterações. As diferenças de resultados devem-se ao tempo de exposição a substância e a dose administrada nos grupos estudados.

Por outro lado, publicações na Romênia revelam que a toxicidade acarretada pelo BPA conseguiu provocar alterações teciduais em outros órgãos. Os efeitos do

BPA dependem de vários mecanismos moleculares e epigenéticos que determinam se o sistema endócrino ou reprodutor é afetado, em que lesões benignas preexistentes podem se tornar cancerosas (DUMITRASCU, et al., 2020).

Ambreen et al. (2019) realizaram uma avaliação *in vivo* em ratos intoxicados com BPA e demonstraram semelhanças com o presente trabalho, no qual a análise histológica revelou alterações no tecido intestinal de grupos de ratos tratados com BPA em comparação com o controle. Além disso, o grupo tratado com baixas doses de BPA apresentou lesão no intestino delgado. Já o grupo que recebeu altas doses obteve fissura significativa no intestino, com hiperplasia das células na lâmina própria juntamente com encolhimento e ruptura das vilosidades. Portanto, a gravidade do trauma depende tanto do tempo de exposição quanto da quantidade de dose recebida.

A capacidade protetora do Se também já foi documentada frente ao estresse oxidativo induzido pelo BPA. Rafiee et al. (2021) verificaram que, no geral, o Se reduziu o estresse oxidativo mitocondrial e melhorou efetivamente a sobrevivência e a motilidade dos espermatozoides de camundongos, sugerindo que o Se pode melhorar o dano mitocondrial causado pelo BPA e o comprometimento da qualidade do esperma de camundongos, prevenindo o estresse oxidativo.

Khalaf et al. (2018) concluíram que a coadministração de Se e nano – Se (NSe) atenuou a toxicidade reprodutiva induzida pelo BPA via melhora da atividade antioxidante, alterações genéticas e restauração do tecido testicular quase como seu grupo controle. Esses resultados indicaram que ambas as formas de Se e NSe podem ser usadas como agentes protetores reprodutivos contra o efeito prejudicial induzido pelo BPA. Nosso estudo corrobora com esses trabalhos onde é possível perceber um possível efeito protetor do Se contra a lesão induzida pela exposição ao BPA. Além disso, percebemos uma redução da inflamação causado pela administração do BPA na região folicular das PP's.

Nossos resultados apontam que houve uma redução no processo de proliferação celular na camada epitelial das PP's no grupo BPA. Estudos anteriores demonstraram que o BPA foi capaz de inibir a proliferação celular nas células epiteliais e calciformes colônicas humanas (QU et al., 2018; ZHAO et al., 2019). Esses achados indicam a potencialidade do BPA em interromper a função da barreira intestinal. Entretanto, nosso estudo não correlaciona os efeitos do BPA e a indução de apoptose devido à ausência de marcadores nas PP's. Qu et al. (2018) demonstraram que essa substância promoveu a apoptose celular, debilitando as funções da barreira epitelial

intestinal, alterando a permeabilidade intestinal.

Nossos resultados também corroboram no trabalho de Wang et al. (2021) onde concluíram que o BPA exerce efeitos deletérios na camada epitelial, no qual, ativa uma resposta imune inata que interrompe imediatamente o equilíbrio entre o dano e o reparo celular. Consequentemente, a barreira e a permeabilidade epiteliais intestinais são rompidas, levando a danos intestinais.

Os dados desse estudo mostraram que o Se tem um efeito protetor em relação a disfunção da barreira epitelial causado pelo BPA. Esse estudo mostra que os níveis de expressão de Ki-67 foram aumentados em animais que receberam BPA. O efeito protetor do Se em condições de estresse oxidativo já foi relatado por Dou et al. (2023), onde demonstraram que o efeito protetor dos SeNPs na lesão da barreira epitelial intestinal está intimamente associado à via de sinalização de crosstalk mitocôndria-lisossoma mediada por TBC1D15/Rab7.

Canter et al. (2021) apontaram que o selênio teve papel potencial na integridade da barreira intestinal e alterações estruturais nas células caliciformes glandulares e produtoras de mucina na mucosa e submucosa do cólon. Liu et al. (2020) mostraram que o Se atenuou a ruptura da mucosa intestinal induzida pelo estresse oxidativo, que foi associada à capacidade antioxidante elevada da mucosa e melhorou as funções da barreira intestinal. Xu et al. (2018) também relataram que partículas de selênio promoveram o crescimento e a proliferação de células epiteliais intestinais suínas, células epiteliais colônicas humanas e macrófagos derivados de células de leucemia monocítica aguda humana.

Esses resultados corroboram com os achados de Afzal et al. (2022) onde em seu estudo foi observado uma redução significativa na hemoglobina (Hb), linfócitos, volume globular (PCV), glóbulos vermelhos (RBC) e monócitos de maneira dependente da dose em comparação com seu grupo controle. Eles sugerem que devido ao acúmulo tóxico de BPA houve uma diminuição do pH, do volume plasmático no sangue além de um baixo suprimento de oxigênio para as hemácias. Tran et al. (2020) verificaram que o BPA teve efeitos negativos potenciais na resposta de células T, pois diminuiu a atividade da telomerase por meio de uma via de sinalização ER/GPR30-ERK.

Nossos achados não corroboram com os de Ye et al. (2023) que verificaram um aumento das células imunes infiltradas no cólon e aumento da expressão de GHSR (receptor secretagogo do hormônio) e citocinas e quimiocinas pró-

inflamatórias, como Il6e Ccl2, na mucosa do colon. Entretanto, nossos resultados se assemelham ao deste estudo, pois a exposição ao BPA elevou o número de macrófagos nos grupos expostos ao BPA. Os autores sugeriram que a sinalização de GHSR do receptor de grelina sensível a nutrientes está envolvida na modulação do efeito do BPA em macrófagos e quando a expressão de GHSR aumenta, ativa a imunidade inata sistemicamente.

Özaydeun et al. (2018), perceberam que os linfócitos CD8 + e CD4 + nas PP's ileais, expostas ao BPA, estavam localizados principalmente na região interfolicular (IFR). Não obstante, houve aumento significativo na contagem de linfócitos CD8 + e diminuição nos linfócitos CD4 + em comparação com os grupos controle e veículo. Sendo válido ressaltar, que em situações fisiológicas se encontra o predomínio de CD4+ nas PP's. Nosso trabalho não corrobora com esses achados, sugerindo que essa alteração na quantidade de leucócitos pode estar relacionada ao tempo de exposição e na dosagem de BPA, alterando significativamente a resposta imunológica desempenhada pelas PP' s.

Observamos que nos animais suplementados com o Se, as células de defesa permaneceram em quantidade similar ao grupo controle. A literatura mostra que o selênio pode atuar como antioxidante, protegendo contra o estresse oxidativo, auxiliando na sobrevivência e crescimento celular, assim, desempenhando um papel quimiopreventivo (SELENIUS, et al., 2010; RAZAGHI, et al., 2021).

Köse; Naziroğlu (2014) mostraram em seu trabalho que a suplementação com Se também protegeu os neutrófilos do estresse oxidativo endógeno. Huang; Rose; Hoffmann (2012) sugerem que a suplementação de selênio, em sua maior parte, é imunestimulante, que é medida por uma ampla gama de parâmetros, incluindo proliferação de células T, atividade de células NK, funções de células imunes inatas e muitos outros dependendo da dose.

Nosso trabalho corrobora com esses achados, pois foi notada intensa proliferação celular nas PP's e sugerimos que o Se é necessário para uma função imunológica ideal, além de minimizar os danos oxidativos causados pelo BPA. Porém, o selênio na dose administrada, não mostrou diferença significativa no número de células de defesa quando comparado ao grupo controle, sugerindo a necessidade de uma avaliação mais refinada de como o selênio afeta diferentes tipos de respostas imunes.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, observou-se que a ingestão do Bisfenol A acima dos níveis considerados seguros resultou em alterações nos tecidos das placas de Peyer, provocando uma redução na proliferação celular. Além disso, o BPA diminuiu a população de células imunes nessas estruturas. É fundamental ressaltar que o selênio demonstrou ter um possível efeito protetor contra a toxicidade induzida pela exposição ao BPA. Os resultados obtidos sugerem que o Se desempenha um papel crucial nas funções imunológicas das placas de Peyer. Os achados deste estudo não apenas contribuem para a compreensão atual da função imunológica dessas estruturas, mas também fornecem uma base sólida para pesquisas futuras. Acredita-se que este trabalho possa ampliar nossa compreensão dos impactos do BPA e servir como ponto de partida para investigações adicionais.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, Abul K. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Elsevier, 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. • *Imunobiologia de Janeway*. por Kenneth M. Murphy (Autor), Denise Cantarelli Machado (Tradutor), Gaby Renard (Tradutor), Lucien Peroni Gualdi (Tradutor). 2014.
2. ABDEL SAMIE, H. A.; NASSAR, S. A.; HUSSEIN, Y. Ameliorative Potential of Selenium against Bisphenol A-Induced Hepatotoxicity in Rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, v. 67, n. 1, p. 444–454, 2017.
3. ABEDELHAFFEZ, A. S. et al. Lung injury induced by Bisphenol A: A food contaminant, is ameliorated by selenium supplementation. *Pathophysiology*, v. 24, n. 2, p. 81–89, jun. 2017.
4. AFZAL, G. et al. Bisphenol A Induces Histopathological, Hematobiochemical Alterations, Oxidative Stress, and Genotoxicity in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2022, p. 1–14, 28 jan. 2022.
5. AL-AMOUDI, M. W. Antioxidant activity of selenium on bisphenol-induced apoptosis and testicular toxicity of rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 12, n. 21, p. 278–289, 8 jul. 2018.
6. AHMED ZAKI, M. S. et al. Role of dietary selenium in alleviating bisphenol A toxicity of liver albino rats: Histological, ultrastructural, and biomarker assessments. *Journal of Food Biochemistry*, v. 45, n. 5, p. e13725, 1 maio 2021.
7. ALKALBY, J. M. A. Effect of Bisphenol a on Thyroid, Liver and Testicular Functions in Adult Male Rats. *Basrah Journal of Veterinary Research*, v. 14, n. 1, p. 187–206, 2015.
8. ALMEIDA S. et al. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 17, n. 6, p. 1503– 1517, 5 set. 2018.
9. AMBREEN, S. et al. In Vivo Evaluation of Histopathological Alterations and Trace Metals Estimation of the Small Intestine in Bisphenol A-Intoxicated Rats. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 2019, p. 1–7, 9 dez. 2019.
10. AMRAOUI, W. et al. Modulatory Role of Selenium and Vitamin E, Natural Antioxidants, against Bisphenol A-Induced Oxidative Stress in Wistar Albinos Rats. *Toxicological Research*, v. 34, n. 3, p. 231–239, 15 jul. 2018.
11. AVERY, J.; HOFFMANN, P. Selenium, Selenoproteins, and Immunity.

Nutrients, v. 10, n. 9, p. 1203, 1 set. 2018.

12. BANSAL, A. et al. Sex- and Dose-Specific Effects of Maternal Bisphenol A Exposure on Pancreatic Islets of First- and Second-Generation Adult Mice Offspring. *Environmental Health Perspectives*, v. 125, n. 9, p. 097022, 22 set. 2017.

13. BASHIR, D. W.; AHMED, Y. H.; EL-SAKHAWY, M. A. Ameliorative effect of vitamin E and selenium against bisphenol A-induced toxicity in spinal cord and submandibular salivary glands of adult male albino rats. *International Journal of Environmental Health Research*, p. 1–17, 22 abr. 2022.

14. BIAGIO SOLARINO et al. Postmortem morphology and viability of human Peyer's Patches in distal ileum: A technical note. v. 31, n. 4, p. 563–569, 30 out. 2009.

15. BJØRKLUND, G. et al. Thioredoxin reductase as a pharmacological target. *Pharmacological Research*, v. 174, p. 105854, dez. 2021.

16. BOUCHER, J. G. et al. In Vitro Effects of Bisphenol A β -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environmental Health Perspectives*, v. 123, n. 12, p. 1287–1293, dez. 2015.

17. BOUDALIA, S. et al. A multi-generational study on low-dose BPA exposure in Wistar rats: Effects on maternal behavior, flavor intake and development. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 41, p. 16–26, 2014.

18. BOURET, S.; LEVIN, B. E.; OZANNE, S. E. Gene-Environment Interactions Controlling Energy and Glucose Homeostasis and the Developmental Origins of Obesity. *Physiol Rev*, v. 95, p. 47–82, 2015.

19. CALDER, P. C. et al. Optimal Nutritional Status for a Well-Functioning Immune System Is an Important Factor to Protect against Viral Infections. *Nutrients*, v. 12, n. 4, 23 abr. 2020.

20. CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 24, n. 6, p. 503–512, 14 maio 2012.

21. CAMILLERI, M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*, v. 68, n. 8, p. 1516–1526, 10 maio 2019.

22. CANTER, J. A. et al. Selenium and the 15kDa Selenoprotein Impact Colorectal Tumorigenesis by Modulating Intestinal Barrier Integrity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, p. 10651, 30 set. 2021.

23. CAVEDON, E. et al. Selenium Supplementation, Body Mass Composition, and Leptin Levels in Patients with Obesity on a Balanced Mildly Hypocaloric Diet: A Pilot Study. *International Journal of Endocrinology*, v. 2020, p. 1–7, 28 maio 2020.

24. CHAILURKIT, L.; AEKPLAKORN, W.; ONGPHIPHADHANAKUL, B. The Association of Serum Bisphenol A with Thyroid Autoimmunity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, n. 11, p. 1153, 17 nov. 2016.
25. CHEN, H. et al. Bisphenol A aggravates renal apoptosis and necroptosis in selenium-deficient chickens via oxidative stress and PI3K/AKT pathway. *Journal of Cellular Physiology*, v. 237, n. 8, p. 3292–3304, 1 ago. 2022.
26. CHEN, H. et al. Selenium deficiency aggravates bisphenol A-induced autophagy in chicken kidney through regulation of nitric oxide and adenosine monophosphate activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Environmental Toxicology*, v. 37, n. 10, p. 2503–2514, 1 out. 2022.
27. CHEN, K. et al. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 7, p. 427–441, 3 fev. 2020.
28. CHOWDHURY, S. R. et al. Exploring the relationship between bisphenol A, iodine and papillary thyroid carcinoma. *Journal of Chittagong Medical College Teachers' Association*, v. 27, n. 2, p. 50–59, 2016.
29. D'ANGELO, S.; SCAFURO, M.; MECCARIELLO, R. BPA and Nutraceuticals,
30. Simultaneous Effects on Endocrine Functions. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, v. 19, n. 5, p. 594–604, 2019.
31. DANIEL, E. et al. Anatomia e Fisiologia do Sistema Digestório de Suínos. In: SAKOMURA, Nilva Kazue et al. *Nutrição de Não Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2014. Cap. 2. p. 19-32.
32. DE VOS, W. M. et al. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, v. 71, n. 5, p. 1020–1032, 1 fev. 2022.
33. DI PIETRO, P. et al. Bisphenol A induces DNA damage in cells exerting immune surveillance functions at peripheral and central level. *Chemosphere*, v. 254, p. 126819, 1 set. 2020.
34. DIAMANTE, G. et al. Systems toxicogenomics of prenatal low-dose BPA exposure on liver metabolic pathways, gut microbiota, and metabolic health in mice. *Environment International*, v. 146, p. 106260, jan. 2021.
35. DILLON, S. M.; WILSON, C. C. Gut Innate Immunity and HIV Pathogenesis. *Current HIV/AIDS Reports*, 9 mar. 2021.
36. DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Role of the microbiome in human development. *Gut*, v. 68, n. 6, p. 1108–1114, 22 jan. 2019.

37. DOU, X. et al. Biogenic selenium nanoparticles alleviate intestinal epithelial barrier injury by regulating mitochondria-lysosome crosstalk. *Food & Function*, v. 14, n. 10, p. 4891–4904, 22 maio 2023.
38. DUMITRASCU, et al. Carcinogenic effects of bisphenol A in breast and ovarian cancers (Review). *Oncology Letters*, v. 20, p. 282, 2020.
39. EFSA CEP Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids), 2023. Scientific opinion on the re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal* 2023;21(4):6857, doi: 10.2903/j.efsa.2023.6857.
40. EHIGIATOR, B. E.; ADIKWU, E.; IGWEZE, Z. N. Glutamine Supplementation Attenuates Bisphenol A-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Journal of Human Reproductive Sciences*, v. 15, n. 4, p. 337–342, 2022.
41. ELHAM KHALILI SADRABAD et al. Bisphenol A release from food and beverage containers – A review. 7 maio 2023.
42. ESPALADORI, M. C. et al. Selenium intracanal dressing: effects on the periapical immune response. *Clinical Oral Investigations*, v. 25, n. 5, p. 2951–2958, 7 out.2020.
43. EU-EUROPEAN UNION (Commission Recommendation No. 794/2019 of 15 May 2019) on a coordinated control plan to determine the prevalence of species that migrate from basic materials and objects to come into contact with food [notified under number C (2019) 3519] (Text with EEA relevance.). oj: JOL_2019_129_R - Official Journal of the European Union, L 129.
44. FAHEEM, N. M.; EL ASKARY, A.; GHARIB, A. F. Lycopene attenuates bisphenol A-induced lung injury in adult albino rats: a histological and biochemical study. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 28, n. 35, p. 49139–49152, 1 set. 2021.
45. FAN, R. et al. Levels of bisphenol-A in different paper products in Guangzhou, China, and assessment of human exposure via dermal contact. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 17, n. 3, p. 667–673, 2015.
46. FENG, L. et al. Bisphenol A increases intestinal permeability through disrupting intestinal barrier function in mice. *Environmental Pollution*, v. 254, p. 112960, nov. 2019.
47. GAO, L. et al. The imbalance of Treg/Th17 cells induced by perinatal bisphenol A exposure is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in

- male offspring mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 137, p. 111177, mar. 2020.
48. GOMBART, A. F.; PIERRE, A.; MAGGINI, S. A Review of Micronutrients and the Immune System—Working in Harmony to Reduce the Risk of Infection. *Nutrients*, v. 12, n. 1, 16 jan. 2020.
49. GONÇALVES, J. L. et al. Bases do Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal. *Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica*, p. 369–388, nov. 2016.
50. GU, Z. et al. Oxidative stress, ion concentration change and immune response in gills of common carp (*Cyprinus carpio*) under long-term exposure to bisphenol A. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, v. 230, p. 108711, 1 abr. 2020.
51. GÜZEL, K. G. U.; NAZIROĞLU, M.; CEYHAN, D. Bisphenol A-Induced Cell Proliferation and Mitochondrial Oxidative Stress Are Diminished via Modulation of TRPV1 Channel in Estrogen Positive Breast Cancer Cell by Selenium Treatment. *Biological Trace Element Research*, v. 198, n. 1, p. 118–130, 10 fev. 2020.
52. HARIHARAN, S.; DHARMARAJ, S. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacology*, p. 1–29, 6 mar. 2020.
53. HEINSBERG, L. W. et al. Estimated Dietary Bisphenol-A Exposure and Adiposity in Samoan Mothers and Children. *Toxics*, v. 8, n. 3, p. 67, 2020.
54. HERNÁNDEZ AVILA, R. et al. Neonatal Bisphenol A Exposure Affects the IgM Humoral Immune Response to 4T1 Breast Carcinoma Cells in Mice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 10, p. 1784, 20 maio 2019.
55. HIRAHARA, K.; NAKAYAMA, T. CD4+T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International Immunology*, v. 28, n. 4, p. 163–171, 12 fev. 2016.
56. HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 6 jun. 2012.
57. HU, Y. et al. Effect of selenium on thyroid autoimmunity and regulatory T cells in patients with Hashimoto's thyroiditis: A prospective randomized-controlled trial. *Clinical and Translational Science*, v. 14, n. 4, p. 1390–1402, 9 abr. 2021.
58. HUANG, R. et al. Bisphenol A concentrations in human urine, human intakes across six continents, and annual trends of average intakes in adult and child populations worldwide: A thorough literature review. *Science of The Total*

Environment, v. 626, p. 971–981, jun. 2018.

59. HUANG, Z.; ROSE, A. H.; HOFFMANN, P. R. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 16, n. 7, p. 705–743, 1 abr. 2012.

60. JANG, M. et al. A sensitive environmental forensic method that determines bisphenol S and A exposure within receipt-handling through fingerprint analysis. *Journal of Hazardous Materials*, v. 424, n. Pt B, p. 127410, 15 fev. 2022.

61. KAUR, S. et al. Selenium attenuates bisphenol A incurred damage and apoptosis in mice testes by regulating mitogen-activated protein kinase signalling. *Andrologia*, v. 53, n. 3, p. e13975, 1 abr. 2021.

62. KHALAF, A. et al. Protective effects of selenium and nano-selenium on bisphenol- induced reproductive toxicity in male rats. *Human & Experimental Toxicology*, v. 38, n. 4, p. 398–408, 9 dez. 2018.

63. KHARRAZIAN, D.; VOJDANI, A. Correlation between antibodies to bisphenol A, its target enzyme protein disulfide isomerase and antibodies to neuron-specific antigens. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 4, p. 479–484, 9 set. 2016.

64. KIM, C. Y. et al. Selenate inhibits adipogenesis through induction of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 426, n. 4, p. 551–557, 2012.

65. KO, A. et al. Association between urinary bisphenol a and waist circumference in korean adults. *Toxicological Research*, v. 30, n. 1, p. 39–44, 2014.

66. KOBAYASHI, N. et al. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 9 out. 2019.

67. KOIKE, E. et al. Exposure to low-dose bisphenol A during the juvenile period of development disrupts the immune system and aggravates allergic airway inflammation in mice. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 32, p. 205873841877489, 1 jan. 2018.

68. KÖSE, S. A.; NAZIROĞLU, M. Selenium Reduces Oxidative Stress and Calcium Entry Through TRPV1 Channels in the Neutrophils of Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Biological Trace Element Research*, v. 158, n. 2, p. 136–142, 18 mar. 2014.

69. KUO, C.-H. et al. Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, v. 28, n. 7, p. S37–

S42, jul. 2012.

70. LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 3, p. 739–777, 1 jul. 2014.

71. LEGEAY, S.; FAURE, S. Is bisphenol A an environmental obesogen? *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 31, n. 6, p. 594–609, 2017.

72. LI, J. et al. CLARITY-BPA: Effects of chronic Bisphenol A exposure on the immune system: Part 1 – Quantification of the relative number and proportion of leukocyte populations in the spleen and thymus. *Toxicology*, v. 396-397, p. 46–53, mar. 2018.

73. LI, J. et al. CLARITY-BPA: Effects of chronic bisphenol A exposure on the immune system: Part 2 – Characterization of lymphoproliferative and immune effector responses by splenic leukocytes. *Toxicology*, v. 396-397, p. 54–67, mar. 2018.

74. LI, L. et al. Bisphenol A exposure and risk of thyroid nodules in Chinese women: A case-control study. *Environment International*, v. 126, n. January, p. 321–328, 2019.

75. LI, L. et al. The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with Nuclear Receptors: Insights from Molecular Dynamics (MD) Simulations. *PLOS ONE*, v. 10, n. 3, p. e0120330, 23 mar. 2015.

76. LI, Y. et al. Peyer's patch-involved gut microbiota facilitates anti-HBV immunity in mice. *Virus Research*, v. 331, p. 199129, 2 jul. 2023.

77. LIU, J. et al. BPA exposure aggravates necroptosis of myocardial tissue in selenium deficient broilers through NO-dependent endoplasmic reticulum stress. *Toxicology*, v. 472, p. 153190, 30 abr. 2022.

78. LIU, L. et al. Selenium-Enriched Yeast Alleviates Oxidative Stress-Induced Intestinal Mucosa Disruption in Weaned Pigs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, p. 1–11, 19 mar. 2020.

79. LIU, Q. et al. Bisphenol A regulates cytochrome P450 1B1 through miR-27b-3p and induces carp lymphocyte oxidative stress leading to apoptosis. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 102, p. 489–498, jul. 2020.

80. LIU, R. et al. Induction of reproductive injury by bisphenol A and the protective effects of cyanidin-3-O-glucoside and protocatechuic acid in rats. *The Science of the Total Environment*, v. 883, p. 163615, 25 abr. 2023.

81. LIVOVSKY, D. M.; PRIBIC, T.; AZPIROZ, F. Food, Eating, and the Gastrointestinal Tract. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 986, 2 abr. 2020.

82. LÓPEZ-RODRÍGUEZ, D. et al. Multi- and Transgenerational Outcomes of an Exposure to a Mixture of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) on Puberty and Maternal Behavior in the Female Rat. *Environmental Health Perspectives*, v. 129, n. 8, p. 087003, ago. 2021.
83. MA, Y. et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental Research*, v. 176, p. 108575, set. 2019.
84. MACKAY, H.; PATTERSON, Z. R.; ABIZAID, A. Perinatal exposure to low-dose bisphenol-a disrupts the structural and functional development of the hypothalamic feeding circuitry. *Endocrinology*, v. 158, n. 4, p. 768–777, 2017.
85. MALAISÉ, Y. et al. Consequences of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice. *Archives of Toxicology*, v. 92, n. 1, p. 347–358, 21 jul. 2017.
86. MALAISÉ, Y. et al. Differential influences of the BPA, BPS and BPF on in vitro IL- 17 secretion by mouse and human T cells. *Toxicology in Vitro*, v. 69, p. 104993, dez. 2020.
87. MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, v. 474, n. 7351, p. 298–306, 1 jun. 2011.
88. MANZOOR, M. F. et al. An insight into bisphenol A, food exposure and its adverse effects on health: A review. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, 3 nov. 2022.
89. MAO, W. et al. Influence of Gut Microbiota on Metabolism of Bisphenol A, a Major Component of Polycarbonate Plastics. v. 11, n. 4, p. 340–340, 31 mar. 2023.
90. MASS, A. P. H. et al. Óleos essenciais e funcionais para leitões lactentes e em creche: saúde intestinal e desempenho. *Zootecnia: Nutrição e Produção Animal*, p. 205–221, 2020.
91. MELI, R. et al. Oxidative stress and BPA toxicity: An antioxidant approach for male and female reproductive dysfunction. *Antioxidants*, v. 9, n. 5, 2020.
92. MILANO, W. et al. Obesity and Its Multiple Clinical Implications between Inflammatory States and Gut Microbiotic Alterations. *Diseases*, v. 11, n. 1, p. 7, 29 dez. 2022.
93. MINICH, W. B. Selenium Metabolism and Biosynthesis of Selenoproteins in the Human Body. *Biochemistry (Moscow)*, v. 87, n. S1, p. S168–S177, jan. 2022.
94. MÖRBE, U. M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, v. 14, n. 4, p. 793–802, 22 mar. 2021.
95. MUSTACICH, D.; POWIS, G. Thioredoxin reductase. *The Biochemical Journal*,

v. 346 Pt 1, n. Pt 1, p. 1–8, 15 fev. 2000.

96. NAVA-CASTRO, K. E. et al. Environmental Pollution as a Risk Factor in Testicular Tumour Development: Focus on the Interaction between Bisphenol A and the Associated Immune Response. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 21, p. 4113, 25 out. 2019.

97. NOBS, S. P.; ZMORA, N.; ELINAV, E. Nutrition Regulates Innate Immunity in Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, v. 40, n. 1, p. 189–219, 23 set. 2020.

98. NUÑEZ, P.; ARGUELLES, J.; PERILLAN, C. Short-term exposure to bisphenol A affects water and salt intakes differently in male and ovariectomised female rats. *Appetite*, v. 120, p. 709–715, 2018.

99. OKUMURA, R.; TAKEDA, K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 49, n. 5, p. e338–e338, maio 2017.

100. ÖZAYDIN, T. et al. The effects of bisphenol A on some plasma cytokine levels and distribution of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in spleen, ileal Peyer's patch and bronchus associated lymphoid tissue in rats. *Acta Histochemica*, v. 120, n. 8, p. 728–733, 1 nov. 2018.

101. PANNEERSELVAM, D.; BUDH, D. P. Peyer Patches. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557457/>>.

102. PARK, Y.-J. et al. Bisphenol A exposure increases epididymal susceptibility to infection in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 208, p. 111476, 15 jan. 2021.

103. PEIRETTI, F. et al. A Novel N-Substituted Valine Derivative with Unique Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Binding Properties and Biological Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, n. 21, p. 13124–13139, 12 nov. 2020.

104. POLAT, S. et al. The relationships of bisphenol A levels with leptin and adiponectin in premenopausal women. *Endocrine Abstracts*, v. 37, n. 219, 1 maio 2015.

105. QU, W. et al. Bisphenol A suppresses proliferation and induces apoptosis in colonic epithelial cells through mitochondrial and MAPK/AKT pathways. *Life Sciences*, v. 208, p. 167–174, set. 2018.

106. RAFIEE, Z. et al. Protective effects of selenium on Bisphenol A-induced oxidative stress in mouse testicular mitochondria and sperm motility. *JBRA Assisted Reproduction*, 2021.

107. RATAJCZAK-WRONA, W. et al. Effect of bisphenol A on human neutrophils immunophenotype. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 20 fev. 2020.
108. RATAJCZAK-WRONA, W. et al. Sex-dependent dysregulation of human neutrophil responses by bisphenol A. *Environmental Health*, v. 20, n. 1, 7 jan. 2021.
109. RAZAGHI, A. et al. Selenium stimulates the antitumour immunity: Insights to future research. *European Journal of Cancer*, v. 155, p. 256–267, 1 set. 2021.
110. REBOLDI, A.; CYSTER, J. G. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunological Reviews*, v. 271, n. 1, p. 230–245, 18 abr. 2016.
111. RÖNN, M. et al. Bisphenol A is related to circulating levels of adiponectin, leptin and ghrelin, but not to fat mass or fat distribution in humans. *Chemosphere*, v. 112, p. 42–48, 2014.
112. RUBIN, B. S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, n. 1–2, p. 27–34, out. 2011.
113. SELENIUS, M. et al. Selenium and the Selenoprotein Thioredoxin Reductase in the Prevention, Treatment and Diagnostics of Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 12, n. 7, p. 867–880, abr. 2010.
114. SHAIBI, T. et al. Exposure to low-dose bisphenol A induces spleen damage in a murine model: Potentially through oxidative stress? *Open Veterinary Journal*, v. 12, n. 1, p. 23, 2022.
115. SHAKOOR, H. et al. Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19? *Maturitas*, v. 143, p. 1–9, jan. 2021.
116. ŠIMKOVÁ, M. et al. Dental Composites – a Low-Dose Source of Bisphenol A? *Physiological Research*, p. S295–S304, 30 set. 2020.
117. STOKER, C. et al. Perinatal exposure to bisphenol A (BPA) impairs neuroendocrine mechanisms regulating food intake and kisspeptin system in adult male rats. Evidences of metabolic disruptor hypothesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 499, n. September 2019, p. 110614, 2020.
118. SUN, T.; NGUYEN, A.; GOMMERMAN, J. L. Dendritic Cell Subsets in Intestinal Immunity and Inflammation. *The Journal of Immunology*, v. 204, n. 5, p. 1075– 1083, 18 fev. 2020.
119. SUZUKI, K. et al. Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Seminars in Immunology*, v. 19, n. 2,

p. 127–135, abr. 2007.

120. ISO, T. et al. DNA Damage Caused by Bisphenol A and Estradiol through Estrogenic Activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 2, p. 206–210, 2006.

121. TRAN, H. T. T.; HERZ, C.; LAMY, E. Long-term exposure to “low-dose” bisphenol A decreases mitochondrial DNA copy number, and accelerates telomere shortening in human CD8 + T cells. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 25 set. 2020.

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

123. VENTER, C. et al. Nutrition and the Immune System: A Complicated Tango. *Nutrients*, v. 12, n. 3, p. 818, 19 mar. 2020.

124. VENTURA, M.; MELO, M.; CARRILHO, F. Selenium and Thyroid Disease: From Pathophysiology to Treatment. *International Journal of Endocrinology*, v. 2017, p. 1–9, 2017.

125. VOLMAN, J.J.; RAMAKERS, J.D.; PLAT, J. Dietary modulation of immune system by β -glucans. *Physiology & Behavior*; 94: 276-284, 2008.

126. VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V. Evidence that bisphenol A (BPA) can be accurately measured without contamination in human serum and urine, and that BPA causes numerous hazards from multiple routes of exposure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 398, n. 1-2, p. 101–113, dez. 2014.

127. WANG, G. et al. Maternal vitamin D supplementation inhibits bisphenol A-induced proliferation of Th17 cells in adult offspring. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 144, p. 111604, 1 out. 2020.

128. WANG, K. et al. Environmental contaminant BPA causes intestinal damage by disrupting cellular repair and injury homeostasis in vivo and in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 137, p. 111270, maio 2021.

129. WANG, K.; ZHAO, Z.; JI, W. Bisphenol A induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 117, p. 109182, 1 set. 2019.

130. WANG, N. et al. Influence of bisphenol a on thyroid volume and structure independent of iodine in school children. *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, p. 1–12, 2015.

131.

132. WANG, S. et al. Lung inflammation induced by exposure to Bisphenol-A is associated with mTOR-mediated autophagy in adolescent mice. *Chemosphere*, v. 248, p. 126035, 1 jun. 2020.
133. WANG, T. et al. Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 97, n. 2, p. 223–227, 2012.
134. WASSENAAR, P. N. H.; TRASANDE, L.; LEGLER, J. Systematic Review and Meta-Analysis of Early-Life Exposure to Bisphenol A and Obesity-Related Outcomes in Rodents. *Environmental Health Perspectives*, v. 125, n. 10, 2017.
135. World Health organization – WHO. toxicological and Health Aspects of Bisphenol A Report of Joint fAo/WHO Expert Meeting. 2010. [acesso 2023 Sep 27]. disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/97892141564274_eng.pdf].
136. XU, C. et al. Biogenic Synthesis of Novel Functionalized Selenium Nanoparticles by *Lactobacillus casei* ATCC 393 and Its Protective Effects on Intestinal Barrier Dysfunction Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 18 jun. 2018.
137. Y.B. Wetherill, N.L. Fisher, A. Staubach, M. Danielsen, R.W. de Vere White, K.E. Knudsen, Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status, *Canc. Res.* 65 (1) (2005) 54–65.
138. YANG, C.-F. et al. Bisphenol a Exposure, DNA Methylation, and Asthma in Children. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 1, p. 298, 1 jan. 2020.
139. YAO, Y. et al. Selenium–GPX4 axis protects follicular helper T cells from ferroptosis. *Nature Immunology*, v. 22, n. 9, p. 1127–1139, 19 ago. 2021.
140. YE, X. et al. Nutrient-Sensing Ghrelin Receptor in Macrophages Modulates Bisphenol A-Induced Intestinal Inflammation in Mice. *Genes*, v. 14, n. 7, p. 1455, 16 jul. 2023.
141. YIN, K. et al. Bisphenol A exacerbates selenium deficiency-induced pyroptosis via the NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 pathway in chicken trachea. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, v. 263, p. 109488, 1 jan. 2023.
142. ZANDONÁ, L. et al. The use of Bisphenol A in food packaging and their relationship with the breast cancer: a systematic review. *J Health Sci Inst*, v. 36, n. 1,

p. 216–223, 2018.

143. ZBUCKA-KRETOWSKA, M. et al. Short-term in vitro effects of bisphenol A activity on phenotype and function of peripheral blood immune system cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 110, p. 262–273, dez. 2017.

144. ZHANG, M.; WU, C. The relationship between intestinal goblet cells and the immune response. *Bioscience Reports*, v. 40, n. 10, out. 2020.

145. ZHANG, Y. et al. Acute BPA exposure-induced oxidative stress, depressed immune genes expression and damage of hepatopancreas in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 103, p.

146. ZHANG, Y. et al. BPA disrupts 17-estradiol-mediated hepatic protection against ischemia/reperfusion injury in rat liver by upregulating the Ang II/AT1R signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 16 abr. 2020.

147. ZHAO, H. Y. et al. The effects of bisphenol A (BPA) exposure on fat mass and serum leptin concentrations have no impact on bone mineral densities in non-obese premenopausal women. *Clinical Biochemistry*, v. 45, n. 18, p. 1602–1606, 2012.

148. ZHAO, Z. et al. Bisphenol A inhibits mucin 2 secretion in intestinal goblet cells through mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 111, p. 901–908, 1 mar. 2019.

149. ZIV-GAL, A. et al. Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Reproductive Toxicology*, v. 42, p. 58–67, dez. 2013.

ANEXO I

Carta de aprovação do CEUA/UFPI da referida pesquisa



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: 64149-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: cecap@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 6.896, 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