



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Efeito do nonilfenol sobre a homeostase da glicose em camundongos  
fêmeas C57BL/6**

**Ana Carolina Rocha Oliveira Morais**

Brasília- DF

2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Efeito do nonilfenol sobre a homeostase da glicose em camundongos  
fêmeas C57BL/6**

**Ana Carolina Rocha Oliveira Morais**

“Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso”.

**Orientadora: Angélica Amorim Amato**

**Coorientadores: Michella Soares Coelho, Carolina Martins Ribeiro**

Brasília-DF

2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Efeito do nonilfenol sobre a homeostase da glicose em camundongos  
fêmeas C57BL/6**

**Ana Carolina Rocha Oliveira Morais**

“Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso”.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Angélica Amorim Amato

---

Dra. Mariella Guimarães Lacerda

Brasília-DF

2018

## DEDICATÓRIAS

*Dedico esse trabalho primeiramente à Deus e a todos seres de luz que me guiaram durante esse caminho que às vezes parecia árduo demais, mas me fizeram sempre seguir em frente olhando para o futuro com amor, felicidade e esperança.*

*Dedico a toda minha família por todo o suporte e por sempre ter acreditado no meu potencial. Mas faço uma dedicatória especial para minha mãe e meu pai que fizeram todo esforço possível para nada me faltar e, assim me dedicar exclusivamente à vida acadêmica. Que abriram mão de muita coisa para me darem a oportunidade de lutar por uma vida melhor. Sem eles eu não conseguira chegar nem na metade dessa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Laboratório de Pesquisa de Farmacologia Molecular (Farmol) da Universidade de Brasília (UnB) pelas experiências e conhecimentos que consegui obter durante esses anos que frequentei esse tão pequeno e imenso lugar, que sempre consegue acolher mais um estudante.

Agradeço à professora Angélica por ser tão paciente, cuidadosa e acolhedora. Nunca me deixou desamparada e sempre se mostrou e esteve disposta a me ajudar. Sempre que estive aflita ou angustiada conseguia me transmitir calma e segurança em suas palavras.

Agradeço também à doutoranda Carolina que com toda sua delicadeza e paciência me acompanhou e ajudou durante todo esse projeto. Que sempre se mostrou positiva diante dos diversos acontecimentos e por sempre me tratar com a mais pura empatia.

Agradeço a todos meus amigos que sempre acreditaram em mim e por trazerem conforto quando estava passando por alguma crise de ansiedade e por tornarem essa jornada mais descontraída e feliz.

Agradeço a todos os servidores da Universidade de Brasília, que inclui professores, auxiliares de limpeza, técnicos de laboratório, etc. que fizeram minha estadia nessa universidade agradável e por me agregar conhecimentos que levarei para minha profissão de farmacêutica e conhecimentos que levarei para a vida.

## RESUMO

Introdução: O nonilfenol (NP) é um produto de síntese gerado durante a degradação dos etoxilatos de alquilfenol, sendo utilizado pelas indústrias como tensoativo, solubilizante e emulsificante para produção de produtos de uso doméstico, cosméticos e agrícolas. Os resíduos industriais são dispersados no sistema de esgoto e, por não haver tratamento adequado, o NP polui o solo, ar, água e alimentos. O NP é classificado como um desregulador endócrino e está relacionado com o desenvolvimento da obesidade. Em estudos prévios com animais foi observado que o NP promove a diferenciação de adipócitos e promove resistência à insulina, quando a exposição ocorre durante os períodos precoces da vida. O presente estudo visou avaliar o efeito da exposição de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ao NP sobre a homeostase da glicose, em um cenário de predisposição à obesidade e diabetes. Métodos: O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal do IB/UnB. Foram utilizados 30 camundongos C57BL/6 fêmeas, com 4 semanas de idade. Os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica e foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de 6 animais cada, de acordo com os tratamentos. Um grupo recebeu apenas água (controle) e os outros quatro receberam, respectivamente, NP 0,5 mg/kg/d da 6<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semanas, NP 2,5 mg/kg/d da 6<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semanas, NP 0,5 mg/kg/d da 14<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semanas ou NP 2,5 mg/kg/d da 14<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semanas. O NP foi administrado na água de beber. A glicemia de jejum foi aferida na 14<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semanas, o teste de tolerância à glicose foi realizado na 14<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semanas e o teste de tolerância à insulina foi realizado na 18<sup>a</sup> semana. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA), teste Neuman-Keuls, e a significância considerada se  $p < 0,05$ . Resultados e conclusão: Foi observado que a exposição de camundongos fêmeas, alimentadas com dieta hiperlipídica, ao NP desde o início da vida adulta (6<sup>a</sup> semana) até a 20<sup>a</sup> semana de vida, ou somente durante a vida adulta (14<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> semanas) não alterou de forma significativa a glicemia de jejum, tolerância à

glicose ou sensibilidade à insulina. Desta forma, à exposição crônica ao NP, nas concentrações testadas, não influenciou negativamente a homeostase da glicose. Embora estudos em cultura de células e estudos *in vivo* em que a exposição ao NP ocorreu durante o período fetal tenham sugerido o efeito obesogênico e diabetogênico do NP, o presente estudo indicou que a exposição fora do período crítico de desenvolvimento não apresentou este efeito. Estudos adicionais são necessários para investigar o mecanismo de ação do NP em diferentes períodos da vida.

Palavras-chaves: Nonilfenol, desregulador endócrino, homeostase da glicose.

## ABSTRACT

**Introduction:** Nonylphenol (NP) is a synthetic product generated during the degradation of alkylphenol ethoxylates, being used by the industries as a surfactant, solubilizer and emulsifier to produce household, cosmetic and agricultural products. Industrial waste is dispersed in the sewage system and, because of inadequate treatment, NP contaminates soil, air, water and food. NP is classified as an endocrine disrupter and is related to the development of obesity. In previous animal studies it was observed that NP promotes the differentiation of adipocytes and promotes insulin resistance when exposure occurs during the early stages of life. The present study aimed to evaluate the effect of exposure high fat diet-fed mice to NP on glucose homeostasis, in a scenario of predisposition to obesity and diabetes. **Methods:** The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use from IB / UnB. Thirty female C57BL/6 mice, at 4 weeks of age, were used. The animals were fed a high fat diet and randomly divided into 5 groups of 6 animals each, according to the treatments. One group received only water (control) and the other four received, respectively, NP 0.5 mg / kg / d from the 6<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> weeks, NP 2.5 mg / kg / d from the 6<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> weeks, NP 0.5 mg / kg / d from the 14<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> week or NP 2.5 mg / kg / d from the 14<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> week. NP was given in drinking water. Fasting glucose was measured at the 14<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> weeks, the glucose tolerance test was performed at the 14<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> weeks, and the insulin tolerance test was performed at the 18<sup>th</sup> week. The results were compared by analysis of variance (ANOVA), Neuman-Keuls test, and significance considered if  $p < 0.05$ . **Results and conclusion:** exposure of female mice fed a high fat diet to NP from early adulthood (6<sup>th</sup> week) to the 20<sup>th</sup> week of life, or only during adulthood (14<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> weeks) did not significantly change fasting blood glucose levels, glucose tolerance or insulin sensitivity. Thus, chronic exposure to NP, at the concentrations tested, did not affect negatively glucose homeostasis. Although studies in cell culture and *in vivo* studies in which

NP exposure occurred during the fetal period have suggested the obese and diabetogenic effect of NP, the present study indicated that exposure outside the critical developmental period did not exhibit this effect. Further studies are needed to investigate the mechanism of action of NP at different periods of life.

**Keywords:** Nonylphenol, endocrine disruptor, glucose homeostasis.

## SUMÁRIO

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1.	Sistema endócrino .....	11
1.2.	Homeostase da glicose .....	13
1.3.	Diabetes .....	16
1.4.	Desregulador endócrino .....	17
1.5.	Nonilfenol.....	18
<b>II.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>22</b>
2.1.	Materiais e métodos .....	22
2.2.	Resultados .....	25
2.3.	Discussão .....	28
2.4.	Conclusão .....	30
<b>III.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>
<b>IV.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>37</b>

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sistema Endócrino

O sistema endócrino é um conjunto de órgãos que permitem o fluxo de informações entre diferentes células, tendo como principais funções: garantir a reprodução, promover o crescimento, desenvolvimento e homeostasia do organismo. Em uma resposta endócrina, participam dessa transmissão de informações a célula secretora, sendo esta responsável pela síntese e secreção de hormônios, e a célula alvo que é a responsável pelo reconhecimento do hormônio e por desempenhar funções em resposta a esse estímulo hormonal. Desta forma, hormônios são mensageiros químicos produzidos e secretados pelas glândulas endócrinas e que ao serem liberados na corrente sanguínea, exercem funções para atender às necessidades do organismo (CURI e FILHO, 2009; GHISELLI, 2007).

A secreção de hormônios é influenciada por fatores hormonais, neurais, ambientais e nutricionais. A secreção regulada dos hormônios é de suma importância para o funcionamento celular. As principais glândulas endócrinas são a glândula pineal, glândula hipófise, glândula tireoide, glândulas paratireoides, timo, glândulas suprarrenais, ilhotas pancreáticas, ovários e testículos (DANGELO e FATTINI, 2013; MOLINA, 2014).

O hipotálamo é uma pequena área situada abaixo do tálamo e uma de suas funções é o controle do sistema endócrino. Ele está intimamente associado à hipófise, sendo esta uma glândula localizada na fossa hipofisial do osso esfenoide e é anatomicamente dividida em duas partes: adenohipófise e neurohipófise. O hipotálamo possui corpos neuronais dispostos em núcleos, que permite a conexão dos neurônios hipotalâmicos com as demais regiões do cérebro. Dentre esses núcleos hipotalâmicos encontram-se neurônios do tipo neuro-

hormonal, sendo estes capazes de sintetizar neuropeptídios que funcionam como hormônios (DANGELO e FATTINI, 2013; MOLINA, 2014).

Os neurônios mais importantes para intermediação das funções endócrina do hipotálamo são os magnocelulares e parvicelulares. Os neurônios magnocelulares são responsáveis por produzir os hormônios ocitocina e vasopressina que são armazenados e secretado pela neurohipófise. Enquanto que os neurônios parvicelulares liberam neuro-hormônios hipotalâmicos que atuam emitindo sinais inibitórios ou estimulantes para a adenohipófise para produção e liberação de hormônios adrenocorticotrófico (ACTH), tireoestimulante (TSH), folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), hormônio do crescimento (GH) e prolactina. Com isso a adenohipófise é regulada por mecanismo de retroalimentação, envolvendo a concentração de hormônio no sangue e dos sinais que chegam no hipotálamo (DANGELO e FATTINI, 2013; MOLINA, 2014).

Os hormônios diferem entre si quanto à sua estrutura química, podendo ser hidrossolúveis ou lipossolúveis. Os hormônios hidrossolúveis são os mais prevalentes, constituídos majoritariamente de hormônios proteicos. Por possuírem características polares, esses hormônios não interagem com a membrana da célula, sendo necessário que os receptores fiquem localizados na membrana da célula para que a ligação hormônio-receptor ocorra no meio extracelular e os mesmos deslocam-se facilmente no sangue e interstício. Os hormônios lipossolúveis são constituídos por moléculas precursoras com estrutura lipídica, grande parte a partir do éster de colesterol. Devido a essa propriedade lipossolúvel esses hormônios movimentam-se com dificuldade no sangue, fazendo-se necessário o auxílio de proteínas carreadoras que são responsáveis em ajudar o deslocamento desses hormônios pelo sangue. Os receptores das células alvo desses hormônios são do tipo intracelulares, pois os mesmos interagem com facilidade com a membrana da célula tornando-se rapidamente

disponível no meio intracelular para realizar ligação hormônio-receptor (CURI e FILHO, 2009).

Dentre os diversos tipos de hormônios que atuam para controlar e manter as funções fisiológicas do organismo, temos hormônios estrógeno e progesterona que possuem importantes funções para manutenção do ciclo menstrual e na gravidez da mulher, visto que a desregulação na síntese ou liberação desses hormônios geram problemas para a saúde, como perda de massa óssea e aumenta a probabilidade de câncer de colo de útero (HANG, et al. 2011; PARDINI, 2013). Outro exemplo são os hormônios tireoidianos, tiroxina ( $T_4$ ) e tri-iodotironina ( $T_3$ ) que atuam no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas e na regulação do crescimento. A deficiência da função hormonal tireoidiana pode levar ao comprometimento mental e diminuição do metabolismo (HANG, et al. 2011).

Além dos hormônios anteriormente citados, temos a insulina, glucagon, epinefrina, glicocorticoide e hormônio do crescimento (somatotrofina) que possuem importantes funções endócrinas, sendo uma delas a manutenção da homeostase da glicose. O glucagon é um hormônio secretado pelo pâncreas em situações de baixa concentração de glicose no sangue que atua promovendo a glicogenólise e gliconeogênese. A epinefrina, quando liberada pelo sistema nervoso simpático, atua em conjunto com o glucagon retirando a glicose das reservas energéticas para promover a elevação da glicemia. A somatotrofina e glicocorticoides também atuam promovendo a redução da captação e utilização da glicose e promovendo aumento da gliconeogênese. Desta forma, a insulina é o principal hormônio regulador da glicose quando os níveis glicêmicos estão elevados, enquanto que o glucagon, em conjunto com outros hormônios, atua em situações de glicemia baixa, sendo este um sistema dinâmico com o objetivo de manter a homeostasia da glicose (HANG, et al. 2011).

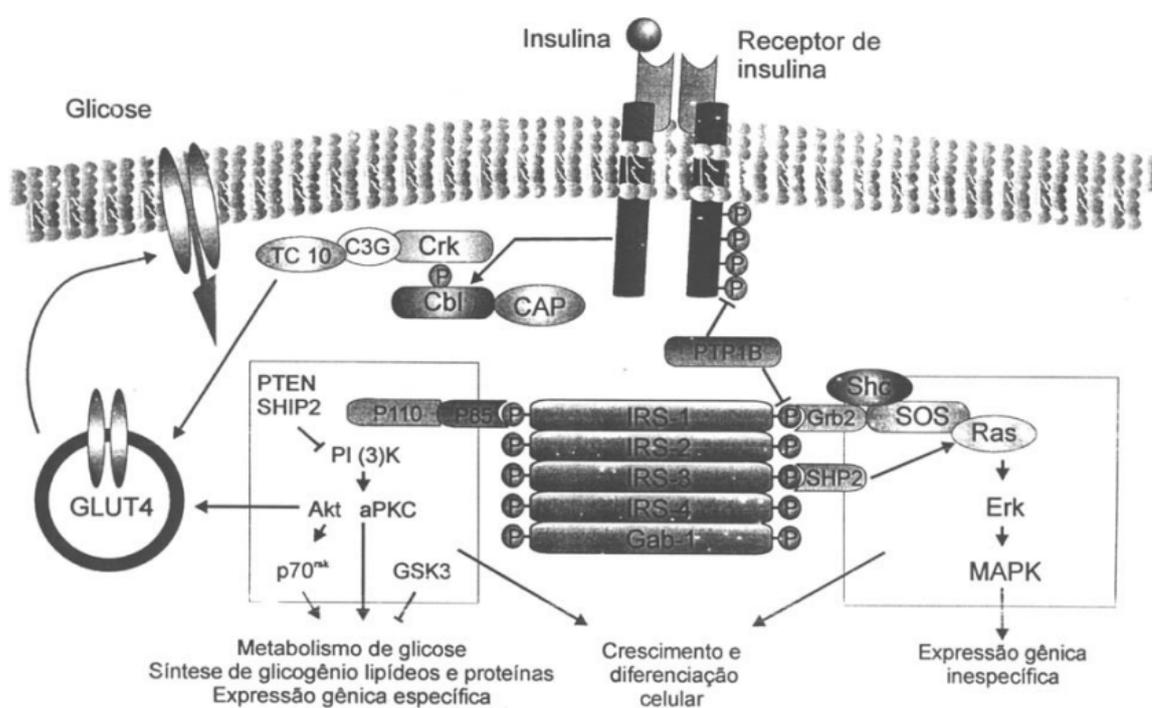
## 1.2.Homeostase da Glicose

O pâncreas é um órgão que possui função exócrina (suco pancreático) e função endócrina (insulina e glucagon). Em sua estrutura há presença de aglomerados celulares denominado de ilhotas pancreáticas. Dentre os tipos celulares que formam as ilhotas pancreáticas, encontram-se as células do tipo  $\alpha$ , que são responsáveis pela produção e secreção de glucagon e as células do tipo  $\beta$  responsáveis pela produção e secreção de insulina (DANGELO e FATTINI, 2013; CURI e FILHO, 2009).

A insulina é um hormônio anabólico e sua secreção é regulada pela quantidade de glicose transportada para dentro das células  $\beta$ . A glicose entra na célula  $\beta$  através de um transportador facilitador de glicose (GLUT2). Após sua entrada, a glicose é fosforilada pela glicocinase, produzindo glicose-6-fosfato que entra no ciclo de Krebs liberando ATP. O ATP liberado atua bloqueando os canais de  $K_{ATP}$ , fazendo com que ocorra o aumento da concentração de  $K^+$  do meio intracelular, levando a uma despolarização da membrana da célula que leva a abertura dos canais de  $Ca^{2+}$ . A entrada de  $Ca^{2+}$  faz com que a insulina seja liberada das vesículas de armazenamento para fora da célula (CURI e FILHO, 2009; GOODMAN e GILMAN, 2012).

O receptor da insulina é uma proteína de estrutura heterotetramérica composta de duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ ; as subunidades  $\alpha$  inibem a atividade de tirosina quinase das subunidades  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  leva a uma mudança conformacional do receptor, permitindo que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase e levando à autofosforilação do receptor, tornando-o receptor ativo. A partir da ativação do receptor de insulina ocorre uma cascata de fosforilação de proteínas intracelulares, como os substratos dos receptores de insulina (IRS) e proteínas contendo o domínio SH2 (Src Homology 2) (Shc). Essas proteínas interagem com efetores através de seus domínios SH2 ativando vias intracelulares, como GTPase, MAPK e ERK, amplificando e estendendo a

casca de sinalização. A fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) é ativada através da interação com proteínas IRS, gerando o fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato (PIP3) que, por sua vez, acaba ativando a quinase Akt (proteína quinase B). Com ativação da Akt há a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática, permitindo a entrada de glicose na célula. Ao entrar na célula a glicose é fosforilada por uma família de hexoquinases em glicose-6-fosfato (CARVALHEIRA, et al. 2002; GOODMAN e GILMAN, 2012).



**Figura 1** Vias de sinalização da insulina. (CARVALHEIRA, et al. 2002)

A homeostase da glicose é um processo que envolve diversos órgãos e está relacionada com a tolerância que o organismo tem à glicose. Desta forma, as células  $\beta$  são de extrema importância para manter esse processo funcionando, visto que regulam a quantidade de insulina que será secretada para realizar a captação de glicose nos órgãos alvos (fígado, tecido adiposo e músculo esquelético) no estado pós-prandial e para regular a quantidade de glicose produzida pelo fígado durante o período de jejum (CURI e FILHO,

2009; GOODMAN e GILMAN, 2012). Assim, se ocorrer alteração em algum desses processos responsáveis por manter homeostase, haverá um desequilíbrio, e conseqüentemente, o indivíduo poderá apresentar distúrbios fisiopatológicos como o Diabetes.

### 1.3.Diabetes

O diabetes é um grupo de doenças metabólicas onde há desregulação na secreção da insulina, ação da insulina ou ambos. Esses distúrbios metabólicos levam à hiperglicemia, que em condições crônicas pode causar danos, disfunção e falha de diferentes órgãos, principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Os principais tipos de diabetes são os diabetes tipo 1 e tipo 2. O diabetes tipo 1 caracteriza-se por uma resposta autoimune que leva a perda progressiva de células  $\beta$  nas ilhotas pancreática. O diabetes tipo 2 é uma doença multifatorial que resulta, predominantemente, de resistência e secreção deficiente da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; ZIMMET, et al. 2001).

Estima-se que atualmente, a população mundial com diabetes seja da ordem de 415 milhões de pessoas e deva atingir 642 milhões em 2040. O diabetes tipo 2 é o que possui maior incidência correspondendo a 90 – 95% de todos os casos de diabetes, porém a incidência do diabetes tipo 1 vem aumentando, principalmente na população infantil com menos de cinco anos de idade. No Brasil estima-se que 14,3 milhões de pessoas possui o diabetes e até 2040 esse número deve aumentar para 23,3 milhões de pessoas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018).

O tecido adiposo é um órgão que possui importante função para o armazenamento de energia e na secreção de fatores proteicos e não proteicos que atuam no próprio tecido

adiposo ou em outros órgãos, sendo esses fatores denominados adipocinas. As adipocinas estão relacionadas com o desenvolvimento de doenças como aterosclerose, hipertensão arterial, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (HERMSDORFF, et al. 2004).

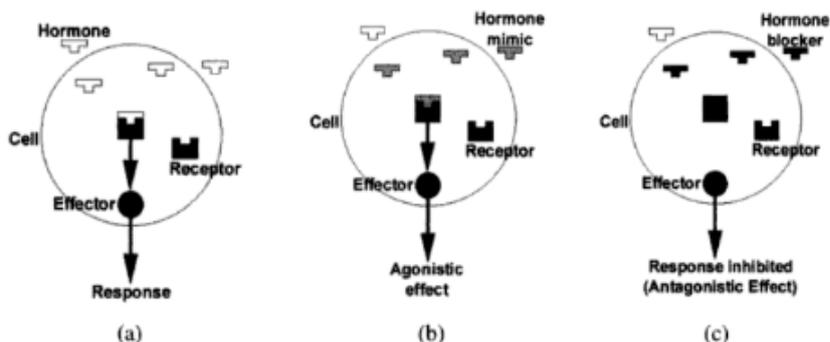
A obesidade é definida como ganho em excesso de gordura corporal relacionado à massa magra (OLIVEIRA, et al. 2003), sendo uma doença complexa que afeta todas as idades, raças, sexo e grupos socioeconômicos, com repercussão psicológica e social. Na obesidade, os níveis de gordura armazenado estão elevados o que leva ao aumento de expressão de adipocinas. Desta forma, a obesidade e o sobrepeso contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas como o diabetes tipo 2, doenças coronariana, hipertensão arterial, problemas respiratórios e até com surgimento de algumas formas de câncer (HERMSDORFF, et al. 2004; NEWBOLS, 2010).

#### 1.4 Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos (DE) são substâncias exógenas que conseguem interferir com a atividade do sistema endócrino, por exemplo por interação com receptores endócrinos, causando alterações na função endócrina, tendo como consequência efeitos adversos sobre a reprodução, desenvolvimento, sistema neurológico e imunológico, em um organismo, sua descendência ou mesmo uma subpopulação de organismos. Essas substâncias são encontradas em concentrações baixas no meio ambiente (ordem de  $\mu\text{g. L}^{-1}$  e  $\text{ng. L}^{-1}$ ), mas mesmo em pequenas concentrações conseguem causar efeitos adversos à saúde humana e animal (BILA et al. 2007; QUEIROS, et al. 2006). Os mecanismos de ação pelo quais os DE atuam ainda não foram totalmente elucidados, mas tem-se teorias a respeito deles (Figura 1) (QUEIROS, et al. 2006):

- Mimetismo/ agonista: em que os DE atuam produzindo atividade hormonal semelhante à do hormônio produzido endogenamente;

- Bloqueio/ antagonista: em que o composto atua interferindo com o funcionamento normal do hormônio endógeno, através do bloqueio de seu receptor;
- *Trigger* ou desencadeador: compostos se ligam ao receptor desencadeando uma resposta normal, mas em um tempo inadequado.



**Figura 2** Representação de possíveis mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos. (a) ação hormonal fisiológica; (b) desregulador endócrino com ação agonista; (c) desregulador endócrino com ação antagonista. (BIRKETT, J.W. LESTER, J. N. 2003)

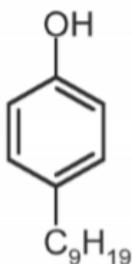
#### 1.4. Nonilfenol

No meio ambiente encontram-se diversos tipos de desreguladores endócrino, entre eles tem-se o grupo de substâncias alquilfenóis (AP). Desta forma, os AP são um grupo de substâncias que, em sua estrutura, têm um grupamento fenólico ligado a uma cadeia carbônica, sendo amplamente utilizados para produção de alquilfenóis etoxilados (APE). Os APE, por possuírem estrutura anfifílica, são classificados como substâncias surfactantes (SILVA, et al. 2007). A partir do processo de alquilação dos APE são formados o nonilfenol (NP) (Figura 2) e a adição de grupos etóxi ao NP gera o nonilfenol etoxilado (NPE) que representa, dentre os compostos da classe dos APE, o composto mais produzido e utilizado pelas indústrias (CARLISLE, et al. 2009; MAO, et al. 2012).

Após seu uso, os resíduos industriais contendo APE são descartados no sistema de tratamento de esgoto, onde sofrem degradação microbiana. Durante o processo de biotransformação, os APE formam intermediários de degradação, entre esses intermediários

encontra-se o Nonilfenol (NP) (WARHURST, 1994). O NPE, quando nas estações de tratamento de esgoto, também sofre metabolização microbiana, sendo degradado em NP (MAO, et al. 2012). Devido à falta de tratamento dos resíduos industriais, o NP contamina o solo, ar, alimentos e água, sendo que o mesmo se acumula nos sedimentos dos rios e, devido à sua estrutura lipofílica, fica retido no tecido adiposo de animais expostos (GUENTHER, et al. 2002; MAO, et al. 2012; AZEVEDO 2001).

O NPE possui ampla aplicabilidade industrial, sendo utilizado como detergente, dispersante, emulsificante e solubilizante. Também é utilizado na produção de produtos agrícolas, produtos domésticos e produtos de uso cosmético (KNEZ, 2014; SILVA, et al. 2007; WARHURST, 1994). A principal via pela qual os humanos são expostos ao NP é pela via oral, mas também pode-se sofrer contaminação pela via transdérmica e inalatória (WILSON, et al. 2001).



**Figura 3** Estrutura molecular do Nonilfenol (NP) (WHO. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch3.pdf?ua=1>. Acesso em: 2017)

O estrógeno produzido endogenamente está relacionado com desenvolvimento e funcionamento dos órgãos do trato genital feminino, dos tecidos neuroendócrinos e da glândula mamária, sendo que seu papel na reprodução abrange desde a puberdade e

manutenção do ciclo menstrual até a gravidez e lactação. Todos esses efeitos são mediados pela ligação ao seu receptor, receptor de estrógeno (ER) (SONNENSCHNEIN, et al. 1998).

O NP é considerado um desregulador endócrino com atividade estrogênica (SHELBY, et al. 1996; SONNENSCHNEIN, et al. 1998; ZOELLER, et al. 2012). Os principais efeitos sobre o organismo incluem diminuição da produção de esperma, aumento da incidência de câncer no testículo e câncer de próstata no sexo masculino e aumento da incidência de câncer de mama e endometriose no sexo feminino. Além disso, pode levar a infertilidade e alterações da função da tireoide, em ambos os sexos (MENDES, 2002; QUEIRÓS, et al. 2006).

Estudo com experimento *in vitro* usando células murinas mostrou que o NP, mesmo em dose baixa promove a diferenciação de adipócitos e expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gamma (PPAR $\gamma$ ), sendo este um receptor nuclear responsável pela regulação da homeostase da glicose e metabolismo lipídico. (HAO, et al. 2012; TAVARES, et al. 2007). Nesse mesmo estudo, porém em experimentação *in vivo* utilizando camundongos prole de fêmeas que foram expostas desde o 12º dia de gestação até o 7º dia de lactação ao NP (camundongos de 8 semanas de idade), observou-se que o NP em diferentes concentrações promove aumento do ganho de peso, massa gorda, colesterol total e aumento nos níveis de glicose, além de induzir expressão de genes relacionados a adipogênese e lipogênese no tecido adiposo (HAO, et al. 2012).

JUBENDRADASS et al. (2010) ao estudar o efeito do NP administrado por 7 dias em ratos fêmeas adultos, observou que o NP atuava como um desregulador da homeostase da glicose provocando hiperinsulinemia e hipoglicemia nos ratos tratados. Mas ao realizar outro estudo utilizando ratos Wistar adultos verificou que o NP, quando administrado nas doses de 15, 150 e 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por 45 dias, ou seja, por um maior período, levou a um

aumento significativa da glicose e insulina plasmática (JUBENDRADASS, et al. 2011). ZHANG, et al. (2014) avaliou os efeitos do NP sobre ratos Wistar fêmeas prenhas, ratos machos Wistar e proles geradas pelas fêmeas. A partir dos estudos de ZHANG, et al. (2014), observou-se que houve aumento do peso corporal dos ratos tratados com NP e que o NP atuou na adipogênese dos ratos que foram diretamente expostos ao NP, sendo que essas alterações foram transmitidas para as gerações seguintes.

Recentemente, foi investigado o efeito da exposição ao NP, desde o desmame até a vida adulta, sobre a massa corporal, adiposidade e homeostase da glicose, em camundongos Swiss machos alimentados com dieta normolipídica. Não foram observadas mudanças significativas na massa corporal e glicemia de jejum (DIAS, 2015). Devido a abundância do NP no ambiente, estudos que melhor caracterizem seus efeitos no organismo fazem-se necessários. É visto que o NP possui atividade sobre o sistema endócrino, como sua ligação ao receptor de estrógeno, mas os efeitos da exposição prolongada à esse desregulador são pouco conhecidos.

A obesidade é uma das comorbidades mais prevalentes no Brasil e no mundo, sendo amplamente relacionada como fator de predisposição ao desenvolvimento de diversas outras doenças, como, por exemplo, o diabetes. Foi verificado em diversos estudos *in vivo* e *in vitro* que o NP promove aumento da diferenciação de adipócitos. E em alguns estudos pode-se notar que o NP altera a glicemia. Nenhum dos estudos publicados, para nosso conhecimento, mostrou os efeitos da exposição animal ao NP em um ambiente que favorece o desenvolvimento de comorbidades, como a obesidade. Desta forma, faz-se de interesse popular e científico a caracterização destes efeitos. Com isso, este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos da exposição ao nonilfenol, desde o desmame até a vida adulta, sobre a homeostase da glicose em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. Materiais e métodos

#### *Consideração Ética*

Os experimentos deste projeto estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UnB (ANEXO I).

#### *Animais, dietas e Nonilfenol*

Foram adquiridos 30 camundongos C57BL/6 fêmeas com 4 semanas de idade que, após a chegada ao biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, passaram por uma semana de adaptação ao novo ambiente antes de ser iniciado o protocolo experimental. Na 5ª semana de vida, os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de 6 animais cada, de acordo com o tratamento e controle, e foram mantidos em temperatura média de 25°C e ciclos claro-escuro fixos (12/12 horas). Os camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica (60% do conteúdo calórico representado por lipídeos) obtidos pela empresa Pragsoluções – SP, oferecida na forma de *pellet*. A dieta e a água potável (filtrada) foram oferecidas *ad libitum*. Os grupos de animais foram identificados de forma que os 5 grupos receberam (i) grupo 1: apenas água (controle negativo), (ii) grupo 2: NP 0,5 mg/kg/d da 6ª à 20ª semanas de vida, (iii) grupo 3: NP 2,5 mg/kg/d da 6ª à 20ª semanas de vida, (iv) grupo 4: NP 0,5 mg/kg/d da 14ª à 20ª semanas de vida e (v) grupo 5: NP 2,5 mg/kg/d da 14ª à 20ª semanas de vida (Tabela 1). A escolha para as doses administradas foi baseada em estudos prévios (AZEVEDO, et al. 2001; CARLISLE, et al. 2009; HAO, et al. 2012;

JUBENDRADASS, et al. 2012; JUBENDRADASS, et al. 2010; MAO, et al. 2012; NAYLOR, et al. 1992).

	TRATAMENTO	TEMPO DE TRATAMENTO
<b>GRUPO 1</b>	Controle negativo (apenas água)	-
<b>GRUPO 2</b>	NP 0,5 mg/kg/d	6 <sup>a</sup> – 20 <sup>a</sup> semanas de vida
<b>GRUPO 3</b>	NP 2,5 mg/kg/d	6 <sup>a</sup> – 20 <sup>a</sup> semanas de vida
<b>GRUPO 4</b>	Controle negativo (apenas água)	6 <sup>a</sup> – 13 <sup>a</sup> semanas de vida
	NP 0,5 mg/kg/d	14 <sup>a</sup> – 20 <sup>a</sup> semanas de vida
<b>GRUPO 5</b>	Controle negativo (apenas água)	6 <sup>a</sup> – 13 <sup>a</sup> semanas de vida
	NP 2,5 mg/kg/d	14 <sup>a</sup> – 20 <sup>a</sup> semanas de vida

**Tabela 1** Representação esquemática do tratamento com NP no delineamento experimental.

O NP foi obtido da empresa Sigma-Aldrich, na forma de solução, com densidade de 0,937 g/mL. Foi administrado na água potável dos animais, sendo que a determinação da concentração adicionada à água foi de acordo com o peso do animal (em g), no dia em que era realizada a troca da água, e de acordo com a ingestão hídrica média diária calculada com os resultados de ingestão hídrica dos 7 dias anteriores ao dia da troca (em mL).

#### *Glicemia de jejum*

Entre a 5<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana de vida, foram avaliados o consumo alimentar, ingestão hídrica e peso corpóreo três vezes por semana. A glicemia de jejum foi aferida na 14<sup>a</sup> e na 20<sup>a</sup> semana de vida, com a utilização do glicosímetro (Accucheck Performa, Roche), no período da manhã, após jejum noturno de 12 horas.

#### *Teste de tolerância à glicose*

Na 17<sup>a</sup> semana fez-se o teste de tolerância à glicose em todos os animais, após jejum de 6 horas, porém sem restrição de acesso a água. Foi coletada amostra de sangue para

determinação da glicemia basal (tempo zero). Em seguida, os animais receberam solução de glicose na dose de 1 g/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. As amostras de sangue da cauda foram coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos e analisadas no glicosímetro (Accucheck Performa, Roche).

#### *Teste de Tolerância à insulina*

Na 18ª semana realizou-se o teste de tolerância à insulina em todos os animais, após jejum de 4 horas, sem restrição de água. As amostras de sangue foram coletadas da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero). Em seguida, os animais receberam por via intraperitoneal uma dose única de solução de insulina regular (Lilly), de 1 UI/kg. As amostras de sangue da cauda foram coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos e analisadas no glicosímetro (Accucheck Performa, Roche).

Os animais foram eutanasiados ao final da 20ª semana de idade, seguindo as diretrizes sugeridas pela Associação Americana de Medicina Veterinária e pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2013; CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2013)

#### *Análise Estatística*

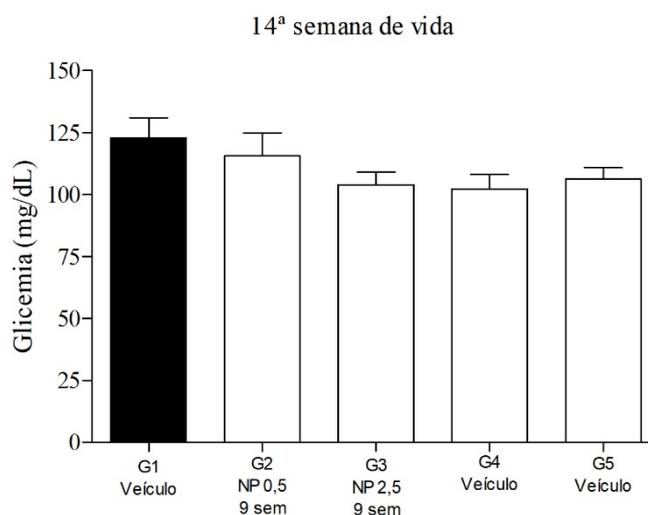
Os dados obtidos relativos a teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina foram expressos como média e erro padrão da média de cada grupo de tratamento. Para comparação das médias entre os grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA *two-way*), seguida da comparação múltipla de Bonferroni. Para dados não-paramétricos foi usado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste Dunn. Foi verificada a presença de outliers com a utilização do teste de Grubb. Todas as análises foram realizadas com a utilização do

programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows. O critério de significância para todas as análises foi o valor  $p < 0,05$ .

## 2.2. Resultados

### *Glicemia de Jejum*

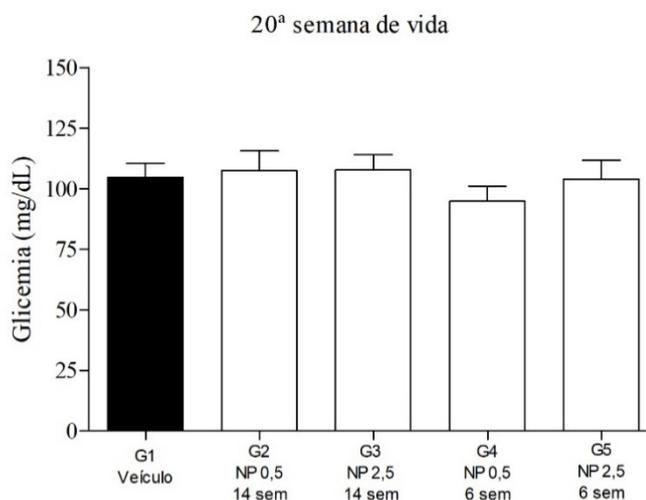
Na 14<sup>a</sup> semana de vida, foi aferida a glicemia de jejum, e foi possível observar que os grupos tratados com NP nas concentrações de 0,5 mg/kg/d ou 2,5 mg/kg/d por 9 semanas não apresentaram mudanças significativas na glicemia quando comparados com os grupos controles (veículo e os grupos que receberiam NP posteriormente, a partir da 14<sup>a</sup> semana de vida, nas concentrações de 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d) (Figura 4).



**Figura 4** Glicemia de jejum. A exposição ao NP 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d por 9 semanas não alterou significativamente a glicemia de jejum quando comparado com os demais grupos.

Quando avaliada a glicemia de jejum na 20<sup>a</sup> semana de vida dos camundongos, os grupos tratados com NP por 14 semanas, nas concentrações de 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d, ou por 6 semanas, nas concentrações de 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d, não apresentaram modificação significativa da glicemia, quando comparados ao grupo controle (Figura 5). Ou

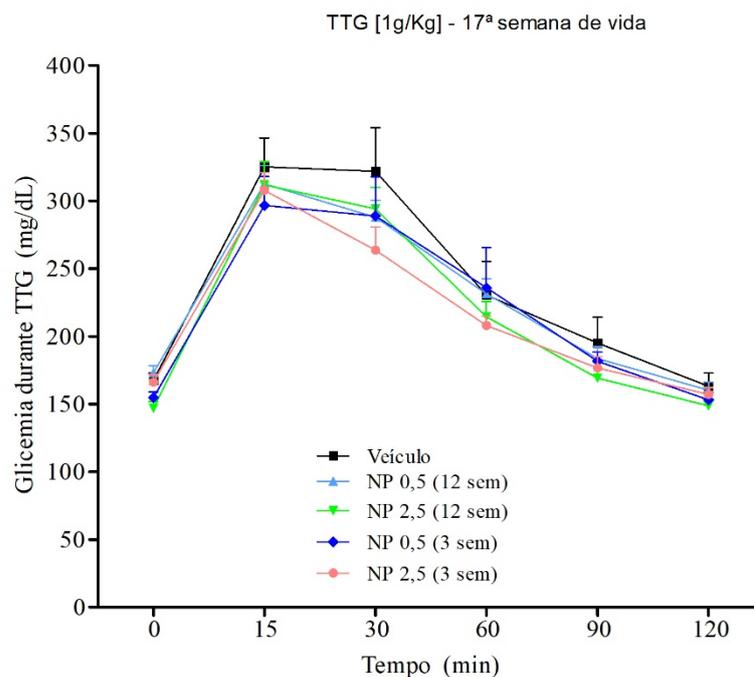
seja, o NP não modificou a glicemia de jejum após exposição iniciada em período precoce da vida até a vida adulta, ou somente durante a vida adulta.



**Figura 5** Glicemia de jejum. A exposição ao NP nas doses de 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d por 14 semanas, ou 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d por 6 semanas não alterou significativamente a glicemia de jejum quando comparado com o veículo.

### *Tolerância à glicose*

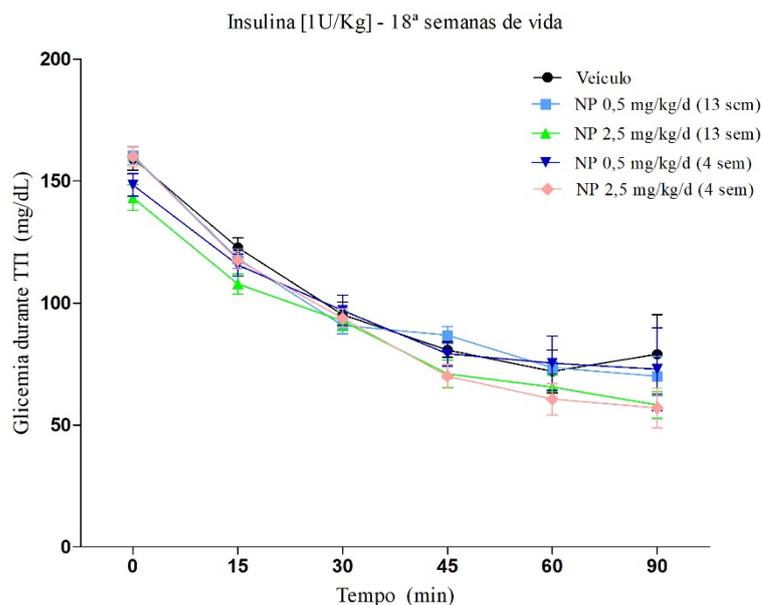
Na 17ª semana de vida os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose. Foi possível observar que os grupos tratados com NP nas doses de 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d, tanto no período precoce da vida até a vida adulta, quanto somente durante a vida adulta, apresentaram tendência de diminuição da glicemia no tempo de 30 minutos após submissão à uma sobrecarga de glicose (Figura 6), quando comparados ao grupo controle. Com isso, os animais expostos ao NP por um período de 12 ou 3 semanas, nas doses de 0,5 mg/kg/d e 2,5 mg/kg/d, apresentaram uma tendência de diminuição da glicose no tempo de 30 minutos, ou aumento de tolerância à glicose.



**Figura 6** Teste de tolerância à glicose. Os animais expostos ao NP desde período precoce da vida até a vida adulta ou somente na vida adulta, nas doses de 0,5 mg/kg/d ou 2,5 mg/kg/d apresentaram tendência de diminuição da glicemia no tempo de 30 minutos após exposição a sobrecarga intraperitoneal de glicose.

### *Tolerância à insulina*

Na 18ª semana de vida os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Foi observada tendência de diminuição da glicemia dos animais expostos à dose de 2,5 mg/kg/d, durante os dois períodos de tratamento, nos tempos de 45, 60 e 90 minutos, quando comparado com o grupo controle e com os demais grupos tratados. Também foi possível observar que o grupo exposto ao NP na dose de 0,5 mg/kg/d, por maior período de tempo, apresentou tendência de aumento na glicemia no tempo de 45 minutos, quando comparado com os outros grupos (Figura 7).



**Figura 7** Teste de tolerância à insulina. Animais expostos ao NP 2,5 mg/kg/d desde etapas precoces da vida até a vida adulta ou somente da vida adulta apresentaram tendência de diminuição da glicemia. Os animais expostos ao NP 0,5 mg/kg/d desde etapas precoces da vida até a vida adulta apresentam tendência de aumento da glicemia no tempo de 45 minutos.

### 2.3. Discussão

O NP é um desregulador endócrino que possui ação sobre receptores de estrógeno (KWACK, et al. 2002). O estrógeno está envolvido em diversas funções no organismo. Existem dois tipos de receptor nuclear de estrógeno: receptor de estrógeno alfa (ER- $\alpha$ ) e receptor de estrógeno beta (ER- $\beta$ ), sendo estes expressos em muitos tecidos e órgãos, inclusive nas ilhotas pancreáticas (PATERNI, et al. 2014). Dentre essas funções, o estrógeno apresenta atividade sobre a homeostase da glicose. Estudos mostram que o estrógeno aumenta a secreção de insulina pelas células  $\beta$ , regula o metabolismo lipídico e melhora o quadro diabético em ratos (AHMED, et al. 2012; HEINE, et al. 2000; STEVENSON, et al. 1994).

O mecanismo pelo qual o estrógeno atua na homeostase da glicose envolve os receptores de estrógeno presente na membrana das células  $\beta$ , sendo este distinto dos receptores de estrógenos nucleares, ou receptores de estrógeno nucleares. Desta forma, o estrógeno se liga ao receptor, que ao entrar na célula libera um mensageiro intracelular que acaba atuando em sinergia com a glicose inibindo os canais de  $K_{ATP}$ . Ao inibir os canais de  $K_{ATP}$ , a concentração de cálcio intracelular aumenta, levando a despolarização da membrana e consequentemente levando à secreção de insulina (NADAL, et al. 1998; NADAL, et al. 2000; NADAL, et al. 2004). Este mecanismo de secreção de insulina via receptores de estrógeno, não ocorre somente com estrógeno endógeno. ADACHI, et al. (2005) avaliaram o efeito da exposição prolongada de células pancreáticas ao NP, onde usaram antagonista de receptor de estrógeno nuclear e antagonista de enzima importante para transcrição gênica para analisar se a secreção de insulina era via receptor nuclear de estrógeno ou receptor de membrana. Os resultados mostraram que o NP induz a secreção de insulina via receptores nucleares de estrógeno (ADACHI, et al. 2005).

O principal objetivo deste estudo foi mostrar o efeito da exposição de camundongos ao NP, do desmame até a vida adulta, em um ambiente com predisposição para obesidade, sobre a homeostase da glicose. Os resultados mostraram que a exposição crônica ao NP, nas concentrações de 0,5 mg/kg/d ou 2,5 mg/kg/d, durante 14 semanas ou 6 semanas, não influenciam negativamente a homeostase da glicose (Figuras 5-7). Uma hipótese para que os resultados não tenham apresentado significância, foi possivelmente a ação estrogênica do NP que possa ter mascarado seus efeitos sobre a homeostase da glicose. Como descrito por ADACHI, et al. (2005), o NP pode atuar sobre receptores de estrógeno presente no pâncreas, onde promove a liberação de insulina e como consequência leva à melhora do quadro glicêmico dos camundongos. Ou seja, o NP ao mesmo tempo que atua como obesogênico e desregulador da glicose, ele também atua promovendo a melhora desse quadro devido sua

atividade estrogênica. É importante traçar esse paralelo, pois vários estudos relatam o efeito do NP como desregulador da homeostase da glicose. Com isso, os resultados apresentados contrastam com os dados dos estudos realizados em cultura de células e estudos *in vivo*, onde conseguem mostrar o efeito obesogênico e diabetogênico do NP durante os períodos mais precoces da vida e durante a vida adulta (HAO, et al. 2012; JUBENDRADASS, et al. 2010; JUBENDRADASS, et al. 2011; ZHANG, et al. 2014).

#### 2.4. Conclusão

Como conclusão pode-se dizer que o presente estudo indica que a exposição fora do período crítico de desenvolvimento não apresenta efeito significativo sobre a homeostase da glicose. Desta forma, estudos adicionais são necessários para investigar o efeito da exposição a diferentes doses de NP sobre a homeostase da glicose e o mecanismo pelo qual o NP atua sobre a homeostase da glicose em diferentes períodos da vida no organismo.

### III. REFERÊNCIAS

ADACHI, T. YASUDA, K. MORI, C. YOSHINAGA, M. AOKI, N. TSUJIOTO, G. TSUDA, K. Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, p. 713 – 719, jan. 2005.

AHMED, M. A. HASSANEIN, K. M. A. Effects of estrogen on hyperglycemia and liver dysfunction in diabetic male rats. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, p. 156-166, jul. 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, vol. 37, supl. 1, p.581-590, jan. 2014.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2013.

AZEVEDO, D. A. LACORTE, S. VIANA, P. BARCELO, D. Occurrence of Nonylphenol and Bisphenol-A in Surface Waters from Portugal. Sociedade Brasileira de Química, vol. 12, n° 4, p. 532-537, 2001.

BILA, D. M. DEZOTTI, M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Consequências. Química Nova, Rio de Janeiro; vol. 30, n° 3, p. 651-666, fev. 2007.

BIRKETT, J.W. LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process. Lewis Publish. CRC Press Company. 1ª edição. U.S.A. 2003.

CARLISLE, J. CHAN, D. PAINTER, P. WU, L. Toxicological profile for Nonylphenol. Office of Environmental Health Hazard Assessment. 2009.

CARVALHEIRA, J. B. C ZECCHIN, H. G. SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. Arquivo Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, São Paulo: vol. 46, n° 4, jul. 2002.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais – Conceitos e Procedimentos Recomendados. Brasília, 2013.

CURI, R.; FILHO, J. P. A. Fisiologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DANGELO, J. G. FATTINI, C. A. Anatomia Humana. 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

DIAS, J. C. Efeitos do nonilfenol sobre a massa corporal, adiposidade e homeostase da glicemia em camundongos. 2015, p. 1-56. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-

Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília. Brasília, 2015.

GOODMAN, L.S GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12ª edição. Porto Alegre, RS: AMGH editora LTDA, 2012.

GUENTHER, K. HEINKE, V. THIELE, B. KLEIST, E. PRAST, H. RAECKER, T. Endocrine Disrupting Nonylphenols are Ubiquitous in Food. *Environmental Science & Technology*, vol. 36, nº 8, p. 1676-1680, mar. 2002.

HAO, C. CHENG, X. XIA, H. MA, X. The Endocrine Disruptor 4-Nonylphenol Promotes Adipocyte Differentiation and Induces Obesity in Mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 30, p. 382-394, may. 2012.

HEINE, PA. TAYLOR, J. A. IWAMOTO, G. A. LUBAHN, D. B. COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, nº 23, nov. 2000.

HERMSDORFF, H. H. M. MONTEIRO, J. B. R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde está o problema? *Arquivos Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia*, vol. 48, nº 06. Minas Gerais, dez. 2004.

JUBENDRADASS, R. D'CRUZ, S. C. MATHUR, P. P. Long-term exposure to nonylphenol affects insulin signaling in the liver of adult male rats. *Human and Experimental Toxicology*, vol. 31, nov. 2011.

JUBENDRADASS, R. D'CRUZ, S. C. MATHUR, P. P. Short-term Exposure to Nonylphenol Induces Pancreatic Oxidative Stress and Alters Liver Glucose Metabolism in

Adult Female Rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 25, nº 02, p. 77-83, 2010.

KNEZ, J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive Biomedicine Online*, vol. 26. nº 5, p. 440-448, mai. 2014.

KWACK, S. J. KWON, O. KIM, H. S. KIM. S. S. KIM, S. H. SOHN, K. H. LEE, R. D. PARK, C. H. JEUNG, E. B. AN, S. B. PARK, K. L. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A*, nº 65 p. 419-431, 2002.

MAO, Z. ZHENG, X. ZHANG, Y. TAO, X. LI, Y. WANG, W. Occurrence and Biodegradation of Nonylphenol in the Environment. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, nº1, p. 491-505, jan. 2012.

MENDES, J.J.A The endocrine disrupters: major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 40, p. 782-788. 2002.

MOLINA, P. E. *Fisiologia Endócrina*. 4ª edição. Porto Alegre RS: AMGH Editora, 2014.

NADAL, A. ROPERO, A. B. FUENTES, E. SORIA, B. RIPOLL, C. Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids Journal*, vol. 69, p. 531 – 536. 2004.

NADAL, A. ROPERO, A. B. LARIBI, O. MAILLET, M. FUENTES, E. SORIA, B. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 10, nº 21, p. 11603-11608, oct. 2000.

NADAL, A. ROVIRA, J. M. LARIBI, O. LEON-QUINTO, T. ANDREU, E. RIPOLL, C. SORIA, B. Rapid insulinotropic effect of 17 $\beta$ -estradiol via plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 12, n $^{\circ}$  13, oct. 1998.

NAYLOR, C. G. MIEURE, J. P. ADAMS, W. J. WEEKS, J. A. CASTALDI, F. J. OGLE, L. D. ROMANO, R. R. Alkylphenol Ethoxylates in the Environment. *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 69, n $^{\circ}$  07, jul. 1992.

NEWBOLS, R. R. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Environmental Endocrine Disruptors and Obesity*, vol. 9, n $^{\circ}$  3, p. 206-217, mai. 2010.

OLIVEIRA, A. M. A. CERQUEIRA, E. M. M. SOUZA, J. S. OLIVEIRA, A. C. Sobrepeso e obesidade infantil: influência de fatores biológicos e ambientais em Feira de Santana, BA. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 47, n $^{\circ}$  2, abr. 2003.

PARDINI, D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 48, n $^{\circ}$  02, nov. 2013.

PATERNI, I. GRANCHI, C. KATZENELLENBOGEN, J. A. MINUTOLO, F. Estrogen Receptors Alpha (ER $\alpha$ ) and Beta (ER $\beta$ ): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *National Institute of Health*, nov. 2014.

QUEIRÓS, J. MAGALHÃES, A. MEDINA, J. L. Disruptores endócrinos: sinais do tempo. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, n $^{\circ}$  1, jan/jun. 2006.

RANG, H. P. DALE, M. M. RITTER, J. M. FLOWER, R. J. HENDERSON, G. *Farmacologia*. 7 $^{\text{a}}$  edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

SHELBY, M. D. NEWBOLD, R. R. TULLY, D. B. CHAE, K. DAVIS, V. L. Assessing Environmental Chemicals for Estrogenicity Using a Combination of in Vitro and In Vivo Assays. *Environmental Health Perspectives*, vol. 1104, nº 12, dec. 1996.

SILVA, F. V. RODRIGUES, J. L. BATISTA, B. L. OLIVEIRA, D. P. Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilatos: uma visão ambiental. *Revista Brasileira de Toxicologia*, vol. 20, nº 1 e 2, p. 1-12. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. GHISELLI, G. JARDIM, W. F. Interferentes Endócrinos no Ambiente. *Química Nova*, São Paulo; vol. 30, nº 3, p. 695-706, fev. 2007.

SONNENSCHNEIN, C. SOTO, A. M. Na Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 65, nº 1-6, p. 143-150. 1998.

STEVENSON, J. C. CROOK, D. GODSLAND, I. F. COLLINS, P. WHITEHEAD, M. I. Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System. *Adis International Limited*, p. 35 – 41, 1994.

TAVARES, V. HIRATA, M. H. HIRATA, R. D. C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR $\gamma$ ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabolismo*, vol. 51, nº 04, p. 526-533. 2007.

WARHURST, A. M. An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols. *Friends of the Earth*, p. 1-13. 1994.

WHO. Chapter 3: Endocrinology and Endocrine Toxicology, pág. 11-32. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch3.pdf?ua=1>. Acesso em: 2017.

WILSON, N. K. CHUANG, J.J. LYU, C. Levels of persistent organic pollutants in several child day care centers. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, vol. 11, p. 449-458, ago. 2001.

ZHANG, H. XUE, W. LI, Y. MA, Y. ZHU, Y. HUO, W. XU, B. XIA, W. XU, S. Perinatal exposure to 4-nonylphenol affects adipogenesis in first and second generation rats offspring, vol. 225, p. 325-332, jan. 2014.

ZIMMET, P. ALBERTIT, K. G. M. M. SHAW, J. Global and societal implication of the diabetes epidemic. *Nature*, vol. 414, p. 782-787, dez. 2001.

ZOELLER, R.T. BROWN, T. R. DOAN, L. L. GORE, A. C. SKAKKEBAEK, N. E. SOTO, A. M. WOOSRUFF, T. J. VOM SALL, F. S. Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from the Endocrine Society, vol. 153, n° 9, p. 4097-1422, jun. 2012.

## IV. ANEXO I

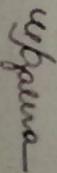
  
**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 12 de abril de 2016.

**DECLARAÇÃO**



Declaramos que o projeto intitulado **"EFETTO DO NONILFENOL SOBRE A MASSA CORPORAL, ADIPOSIDADE E HOMEOSTASE DA GLICOSE EM CAMUNDONGOS C57BL/6."**, UnBDoC n.º 20581/2016, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 60. A presente aprovação é válida pelo período de 07/04/2016 a 12/09/2019.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.