UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL AO BISFENOL-A, A GENISTEÍNA E AO INDOL-3-CARBINOL SOBRE MORFOGÊNESE E CARCINOGÊNESE DE ÓRGÃOS REPRODUTORES DE FÊMEAS SPRAGUE-DAWLEY DA GERAÇÃO F1.

Guilherme Ribeiro Romualdo

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP
2013

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus por todas as graças e oportunidades que acompanharam a minha vida até este momento, principalmente por ter me feito capaz de buscar aquilo que desejo e por ter uma família abençoada e harmônica.

Aos meus pais, José Sidney e Elenice, irmã, Luiza, e namorada, Carina, por sempre terem me apoiado em todas as decisões e me darem conforto emocional e espiritual em todos os momentos.

Aos meus padrinhos, Elizabete e Francisco, por todos os momentos divertidos e, especialmente aos meus avós, Orlando e Miquelina, que estariam muito felizes de me ver formado.

Aos meus amigos de Jundiaí, Lucas, Gustavo, Juliana, por terem compreendido minha ausência durante esses anos de graduação e mesmo assim continuarem próximos. E aos que conheci em Botucatu, Kelvin, Gabriel, Guilherme, Giancarlo, Leonardo, Thiago, Louise, Jaqueline e Marina pela companhia e aprendizado compartilhados durante o curso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, por ter me apresentado ao conhecimento científico e por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto. Aos meus colegas de laboratório, especialmente meus colaboradores, Mariana e Tony, pelo auxílio durante esses quase 3 anos de estágio. E a Profª Drª Camila Contin Diniz de Almeida Francia, pela avaliação do presente trabalho e pelas sugestões propostas.

Obrigado!

"You must look at your life through Heaven's Eyes"

Índice

Resumo 4
1. Introdução 6
I - Carcinogênese Hormonal e Neoplasias Ginecológicas 6
II – Desreguladores Endócrinos e o Bisfenol A 12
III – Genisteína e Indol-3-Carbinol 17
2. Objetivos 22
3. Materiais e Métodos 23
3.2. Preparo da ração com Genisteína e Indol-3-carbinol 23
3.3. Delineamento Experimental 23
5. Análise estatística dos dados 29
6. Resultados 32
7. Discussão 52
7.1. –Efeitos da exposição gestacional ao Bisfenol A 52
7.2. Efeitos da exposição gestacional a genisteina e ao indol-3-cabinol 58
8- Referências 66

Resumo

A exposição *in utero* a xenoestrógenos pode aumentar o risco de neoplasias de natureza endócrina na vida adulta. O Bisfenol A (BPA), componente de resinas e plástico, considerado xenoestrógeno e desregulador endócrino, tem sido investigado pelos seus potenciais efeitos adversos para a saúde humana. Como a Genisteína e o Indol-3-Carbinol possuem propriedades que podem inibir neoplasias de natureza endócrina, é possível que também atuem modulando/modificando os efeitos causados pela exposição gestacional ao BPA. O presente projeto teve como objetivos: (1) Avaliar os efeitos da exposição gestacional ao Bisfenol - A (BPA) sobre a morfogênese do útero e ovários na prole de fêmeas Sprague-Dawley (SD) da geração F1; (2) Avaliar se a exposição gestacional a genisteína e ao indol-3-carbinol altera os efeitos do BPA sobre sobre a morfogênese do útero e ovários na geração F1 e (3) avaliar os efeitos da exposição ao BPA, e às associações BPA e genisteína, BPA e indol-3-carbinol em relação à susceptibilidade a carcinogênese induzida pela N-*Metil*-N-*Nitrosuréia* (MNU). Portanto, fêmeas prenhas da linhagem SD foram divididas em 7 grupos experimentais e expostas ao Bisfenol A (BPA) (25 ou 250 ug/kg p.c.) DG 10 até o DG 21 (Moral *et al*. 2008), além de ração basal ou ração contendo genisteína (250 mg/kg) ou indol-3-carbinol (2000 mg/kg) durante toda a gestação. Parte da prole Fêmeas SD foi sacrificada parte no Dia Pós-Natal (DPN) 21 e parte ao final da 25ª semana após iniciação ou não com a MNU. Ao DPN 21 os ovários e útero foram removidos para contagem de folículos e morfometria, respectivamente. A prole restante de fêmeas recebeu uma única dose de MNU (50 mg/kg) ou solução de NaCl (1 ml/kg) no DPN 51 e foi sacrificada na 25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl. Ovários e útero foi removidos para análises histológicas, incluindo a determinação de lesões proliferativas e neoplasias. O tratamento com BPA causou aumento significativo na área e comprimento de miométrio nos animais sacrificados ao DPN 21 e aumento significativo na incidência de lesões proliferativas papilares nos animais sacrificados ao final do experimento. Os resultados obtidos sugerem que a exposição gestacional ao BPA aumentou a proliferação celular no útero da prole, podendo levar ao desenvolvimento de lesões proliferativas pré-neoplásicas, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias uterinas em grupos iniciados com a MNU. As associações de BPA com genisteína e I3C causaram redução significativa na incidência de lesões proliferativas papilares nos animais sacrificados ao final do experimento, além disso, a associação com I3C causou redução na incidência de adenocarcinoma uterino. Os resultados obtidos sugerem que a exposição gestacional a genisteína e com o indol-3-carbinol inibem o desenvolvimento de lesões proliferativas pré-neoplásicas no útero da prole expostas ao Bisfenol-A, reduzindo a susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias uterinas em roedores iniciados com a MNU.

UNITERMOS: Exposição uterina, Bisfenol A, Genisteína, Indol-3-carbinol, fêmeas SD

1. Introdução

I - Carcinogênese Hormonal e Neoplasias Ginecológicas

As atividades normais de células, tecidos e órgãos dependem da interação direta com um sistema de mensageiros químicos. Entre eles estão os hormônios endócrinos, que são liberados por células especializadas isoladas ou em glândulas e atuam em diversas funções no organismo humano. Em meio aos hormônios endócrinos estão os hormônios sexuais (esteróides, como andrógenos, estrógenos e progestinas), que são moduladores primários do desenvolvimento e manutenção de vários órgãos/sistemas, denominados de hormônio-sensíveis em diferentes fasesda vida (Guyton, 2006). Derivados a partir da estrutura básica do colesterol, os hormônios sexuais são lipossolúveis, atravessando a membrana plasmática das células-alvo e ligando-se a componentes da superfamília de receptores intracelulares (RI), que são ativados na presença e até na ausência de ligantes (Weigel & Moore, 2007). Quando há a presença de ligante, o receptor ativa-se por vias diversas, incluindo mecanismos genômicos, que envolvem a ligação de um elemento de resposta hormonal a determinada região gênica, ou mesmo, por mecanismos não-genômicos, quando o receptor ativa-se por meio de segundos mensageiros. Direta ou indiretamente, a ação dos hormônios na expressão gênica influencia, principalmente, vias de crescimento e proliferação celular (Guyton, 2006). Além dos hormônios de origem endógena, existem também substâncias de origem exógena que devido a sua semelhança estrutural com hormônios esteróides endógenos, podem atuar nos mesmos receptores intracelulares e mediarem respostas celulares semelhantes aos hormônios endógenos, como, principalmente, os químicos sintéticos –estrogen-like", destacando-se os xenostrógenos ambientais (Reinwald & Weaver, 2006).

Desde 1948, a exposição a hormônios é associada ao aumento da incidência de neoplasias, visto que a função secretora ovariana normal foi associada ao surgimento de neoplasias mamárias. (Bittner *et al*., 1948), Em paralelo, foi popularizada a idéia de que a carcinogênese é um processo dividido em etapas, compreendendo iniciação, promoção e progressão (Arnitage & Doll, 1954). Acreditava-se que os hormônios só participavam da etapa de promoção, sendo capazes de acelerar o processo de carcinogênese devido as suas funções na dinâmica celular. Assim, não participando da etapa de iniciação e na dependência da exposição a um agente iniciador, os hormônios não são agentes genotóxicos por natureza. No entanto, ao longo do tempo, controvérsias em relação a sua participação na carcinogênese estimularam estudos que resultaram na proposição de um modelo de carcinogênese independente da ação de agentes iniciadores (Furth, 1975) (Figura 1).

Durante a divisão celular, ocorrem erros no processo de replicação do DNA que podem levar a alterações genéticas e epigenéticas (de Grouchy, 1973). As alterações genéticas, se não reparadas

pela maquinaria de reparo ao DNA, podem fixar-se e contribuir para que a célula adquira um fenótipo maligno, resultando em características fenotípicas suficientes para escapar da forte pressão seletiva da imunidade tumoral do hospedeiro (Merlo *et al.,* 2006). Por estimularem replicação do DNA no processo de proliferação, a exposição a esses hormônios exógenos ou endógenos pode aumentar a susceptibilidade ao surgimento de erros genéticos aleatórios e também atuar na proliferação de células com erros genéticos pré-existentes (Figura 1). O estímulo hormonal parece, então, essencial para a etiologia e progressão do câncer.

Os erros genéticos aleatórios citados podem afetar genes relacionados às vias metabólicas, protooncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo ao DNA. Muitos desses genes que podem atuar no desenvolvimento dessas neoplasias ainda são pouco conhecidos (Henderson & Fiegelson, 2000), mas sabe-se que mutações nos genes supressores de tumor BRCA-1, BRCA-2, e TP53 e no oncogene HER2/neu são relacionadas a maior susceptibilidade a cânceres hormônio-dependentes, como neoplasias de mama e útero (Narod *et al*., 1994, Mutter *el al.,* 2000, Iamarcovai *et al*., 2008). Entre as principais neoplasias denominadas hormônio-dependentes, estão as neoplasias das mamas, próstata, testículo, tireóide e as denominadas neoplasias ginecológicas, que incluem tumores de ovários, corpo de útero, cérvice uterina, vagina e tubas uterinas.

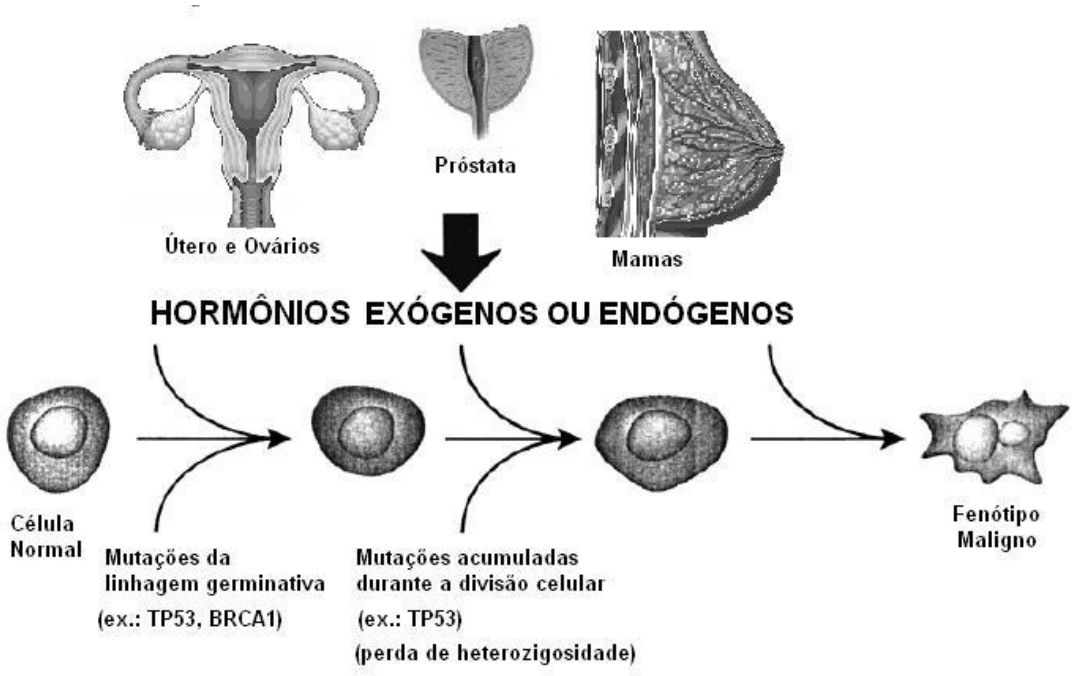


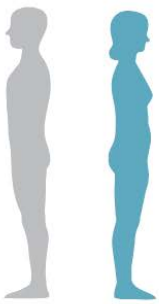
Figura 1. Modelo de Carcinogênese Hormonal. Adaptado de Henderson and Fiegelson, 2000. Ação de hormônios endógenos ou exógenos pode contribuir para que células normais adquiram fenótipo maligno.

Entre as neoplasias ginecológicas, os cânceres de vagina, cervical, corpo de útero, tubas uterinas, e ovários são as mais frequentes (American Cancer Society, 2013). O câncer cervical é considerado a terceira neoplasia mais comum entre as mulheres no mundo (INCA, 2012). Já as neoplasias de corpo de útero e de ovário ocupam mundialmente o sétimo e o oitavo lugares, respectivamente (Weiderpass *et al.*, 2012; INCA, 2012). As neoplasias de tubas uterinas e vagina são mais raras, representando 0,3% e 2% de todas as neoplasias ginecológicas (Piazza *et al.*, 2011).

No Brasil, o câncer cervical ocupou a terceira posição na estimativa cânceres mais incidentes em mulheres em 2012, e foi estimada a marca de aproximadamente 17000 novos casos (INCA, 2012). E as neoplasias de corpo de útero e de ovários atingiram juntas a aproximadamente 6% do total que estimado foi para 2012, ocupando sétimo e oitavo lugares, respectivamente.

Já nos Estados Unidos, a estimativa de câncer cervical para 2013 ultrapassa os 12000 novos casos, sendo, assim, a terceira neoplasia mais comum no trato genital feminino em incidência. No entanto, não estando entre as dez neoplasias mais incidentes no sexo feminino. Finalmente, as neoplasias de corpo de útero e ovário correspondem juntas a 9% do total de novos casos estimados para 2013, ocupando quarto e décimo lugares na incidência total para o sexo feminino (Figura 2) (American Cancer Society, 2013). Esses dados epidemiológicos sustentam a importância de tais doenças para a saúde feminina e para a oncologia ginecológica.

Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	238,590	28%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	118,080	14%
Cólon e Reto	73,680	9%
Bexiga	54,610	6%
Melanoma	45,060	5%
Rins	40,430	5%
Linfoma não Hodgkin	37,600	4%
Cavidade Oral	29,620	3%
Leucemia	27,880	3%
Pâncreas	22,740	3%



Localização primária	casos novos	percentual
Mama Feminina	232,340	29%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	110,110	14%
Cólon e Reto	69,140	9%
Corpo do Útero	49,560	6%
Glândula Tireoide	45,310	6%
Linfoma não Hodgkin	32,140	4%
Melanoma	31,630	4%
Rins	24,720	3%
Pâncreas	22,480	3%
Ovário	22,240	3%

Figura 2. Estimativa de novos casos de câncer nos Estados Unidos para o ano de 2013. Adaptado de Cancer Statistics, American Cancer Society, 2013.

Ocupando a posição de principal neoplasia ginecológica mundialmente, o câncer cervical tem sua maior incidência na faixa etária de 20 a 29 anos, principalmente. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos (INCA, 2012). Existem dois tipos principais: o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma (Weiderpass *et al.*, 2012). A grande maioria dos casos (70%) está relacionada com infecções

persistentes dos vírus HPV16 e 18, porém, outras exposições podem ser consideradas carcinogênicas, como a exposição *in utero* ao xenoestrógeno dietilestilbestrol (DES), o uso de contraceptivos orais, infecção com o vírus HIV1 e uso de tabaco (Cogliano *et al*., 2011).

As neoplasias de corpo de útero só ficam atrás do câncer cervical em incidência no mundo. (Ferlay *et al.*, 2010). As maiores taxas encontram-se na América do Norte e na Europa Ocidental, sendo dez vezes maiores do que nos países em desenvolvimento, observando-se grandes diferenças na incidência entre populações de áreas urbana e rural. O carcinoma de endométrio, que é o mais comum dos tumores malignos do endométrio, tem o seu pico de incidência na faixa etária de 55 a 65 anos, sendo incomum antes dos 40 anos. Levando-se em conta o aspecto histológico e perfil genético, tais neoplasias são divididas em dois grupos principais: 80% são tumores com aspecto mais diferenciado (endometrióide), relacionados a hiperplasia endometrial (Emons *et al*., 2000), já os restantes são tumores menos diferenciados, que se assemelham aos subtipos de carcinomas de ovário (carcinomas serosos) (Sherman *et al.*, 2000).

Apesar dos mecanismos não estarem totalmente esclarecidos, o grupo de maior incidência de carcinomas de endométrio parece ter forte associação com o estilo de vida e com exposição a hormônios, sejam de natureza endógena, como nas mulheres que têm exposição prolongada aos estrógenos devido a menarca precoce e a menopausa tardia (Grady and Ernster, 1996) e nas mulheres obesas pós-menopausicas (Kaaks, 2002), ou de origem exógena, como na exposição ao dietibestrol (DES) (Cogliano *et al.*, 2011) e na terapia de reposição hormonal (TRH) (IARC, 2007). Do ponto vista genético, tais tumores são associados com a inativação do gene supressor de tumor PTEN e à instabilidade microssatélite **(**Mutter *et al.*, 1996, 2000**)**. O segundo grupo de carcinomas endometriais não tem muita relação com a exposição hormonal, e surge em mulheres com idade mais avançada (Sherman *et al.*, 2000). Geneticamente, esse subtipo, denominado de seroso, raramente está associado a mutações em PTEN ou à instabilidade microssatélite, mas vinculado a mutações no gene *p53 (*Mutter *el al.*, 2000). Outros tumores malignos também afetam o endométrio, como os tumores mesenquimais que são representados, principalmente, pelo sarcoma do estroma endometrial, podendo ser de baixo ou alto grau de malignidade baseado na sua contagem mitótica. A etiologia desses tumores é pouco conhecida, porém, alguns fatores, incluindo exposição à radiação na pelve, obesidade, terapia de reposição hormonal, uso de tamoxifeno e anticoncepcionais orais podem aumentar o risco de desenvolvimento desses tumores (Wickerham *et al*,2002; ; Brooks *et al.*, 2004; Arenas *et al.*, 2006).

Estudos genéticos têm mostrado que no sarcoma endometrial ocorre uma translocação cromossômica, havendo a fusão entre 2 genes: JAZF 1 e JJAZ 1 (Koontz *et al.*, 2001). O miométrio também pode desenvolver tumores benignos e malignos. Os leiomiomas (também chamados de fibróides), são tumores benignos, mas justifica-se sua importância por serem muito comuns durante

a vida reprodutiva da mulher, apesar de raramente tornarem-se malignos (Robbins & Cotran, 2005). Alguns estudos demonstraram que esses tumores benignos são hormônio-dependentes, tendendo a regredir após a menopausa (Buttram *et al.*, 1981). A partir disso, a gênese e desenvolvimento desses tumores também podem estar envolvidos com substâncias químicas ambientais que possuam ação sobre os receptores de estrogênio e progesterona (Newbold *et al*., 2000). E os tumores malignos do miométrio, os leiomiossarcomas, são igualmente comuns antes e após a menopausa. Diferentemente do leiomioma, os leiomiossarcomas possuem cariótipos variados e complexos, como deleções em vários cromossomos (Quade *et al*., 1999).

Os tumores ovarianos, que têm maior incidência na faixa acima dos 50 anos, são normalmente classificados de acordo com tipo celular que se originam: 90% são tumores de origem epitelial, 5% de origem estromal e o restante de origem de células germinativas (Chen *et al.,* 2003). Por sua vez, os tumores de origem epitelial são classificados, de acordo com sua característica histológica em: adenocarcinoma seroso (43%), adenocarcinoma mucinoso (15%) , adenocarcinoma endometrioide (22%) e adenocarcinoma de células claras (5%) (Booth *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1995). Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 são responsáveis por muitos casos de câncer dos ovários com caráter familiar, correspondendo de 5% a 10% do total dos tumores de ovário, mas não pelos casos de câncer esporádico, que são a maioria (Iamarcovai *et al*., 2008, Narod *et al.,* 1994). As causas dos tumores ovarianos esporádicos são pouco entendidas (Riman *et al.*, 1995), mas normalmente são relacionadas à reposição hormonal, consumo de tabaco (Cogliano *et al.*, 2011) e álcool, obesidade e sedentarismo (IARC, 2007). Existe evidências de que mulheres com um grande número de ciclos ovulatórios têm risco aumentado de desenvolver cânceres ovarianos *p53*-positivos, mas não *p53*-negativos (Schildkraut *et al*., 1997). A superexpressão da proteína *p53* mutante, não atuando de maneira usual no reparo ao dano ao DNA, pode aumentar o risco de propagação do dano e na transformação maligna das células (Riman *et al.*, 1998). Da mesma forma, mutações nos protooncogenes *K-RAS* e *ERB-B2* têm papel importante no câncer de ovário esporádico (Boyd & Rubin, 1997).

O carcinoma primário de vagina, como já citado, é raro, e, além disso, abrange um grupo heterogêneo de tumores. A grande maioria dos casos de câncer de vagina (90%) é derivada de metástases provenientes de cânceres cervicais, endometriais e vulvares, que se disseminam por via linfática ou hematogênica (Kushner, 2011). O tipo mais comum de câncer primário de vagina é o carcinoma de células escamosas, correspondendo a 95% dos casos, e a maior incidência corresponde à faixa etária de 60 a 70 anos (Kosary, 1994). Já os adenocarcinomas de células claras da vagina são tumores compostos por glândulas revestidas de células vacuolizadas contendo acúmulo de glicogênio (Robbins & Cotran, 2005). Sua importância está relacionada ao aumento do risco de desenvolvimento desses adenocarcinomas em filhas de mulheres que foram expostas ao

DES durante a gravidez, no intuito de evitar o abortamento (Hatch *et al.*, 1998). Normalmente, tais tumores são descobertos em mulheres entre 15 e 20 anos. O DES parece exercer um efeito inibitório na transformação do epitélio embrionário urogenital em epitélio vaginal, que recobriria a vagina até a junção escamo-colunar do colo uterino (Herbst *et al.*, 1971). Assim, a manutenção do epitélio embrionário origina lesões pré-neoplásicas, as adenoses vaginais, que podem ser precursoras do adenocarcinoma vaginal (Newbold *et al.*, 1982).

Por fim, as lesões primárias que afetam as tubas uterinas são consideradas as neoplasias ginecológicas mais raras (Paul and Lawton, 1998). O adenocarcinoma tubário é o tipo mais comum, correspondendo a 90% das neoplasias tubárias. Outros tipos histológicos de neoplasias tubárias ainda mais incomuns podem ser observados, como o carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células claras, o carcinoma endometrioide e o sarcoma (Nordin, 1994). Além disso, o surgimento de neoplasias nas tubas uterinas ganhou atenção especial devido a um estudo epidemiológico que demonstrou que o carcinoma tubário pode estar associado a mutações no gene BRCA1 e BRCA2 que são correlatos ao desenvolvimento de neoplasias hereditárias nas mamas e nos ovários. (Aziz *et al.*, 2001). Como observado, parte importante da ocorrência de neoplasias ginecológicas é atribuída à exposição à hormônios, principalmente aos estrógenos, que são hormônios que podem agir como promotores tumorais e também como carcinógenos (Vollmer, 2003), fazendo com que o contato do ser humano com essas substâncias, independente da sua natureza, seja alvo de pesquisas para a determinação de níveis seguros de exposição para a saúde humana.

Assim, a possibilidade do desenvolvimento de modelos de neoplasias ginecológicas em roedores tem sido utilizada para avaliar o potencial cancerígeno de compostos químicos específicos; componentes endógenos ou componentes que conferem sensibilidade ou proteção ao processo de carcinogênese (Emons *et al.,* 2000). Tumores induzidos pela administração de cancerígenos químicos constituem ferramentas úteis para o entendimento das múltiplas etapas da carcinogênese e base para testes do potencial cancerígeno de agentes químicos e avaliação do risco (Anderson, 1992; Tornqvist and Ehrenberg, 1994). Os benefícios da utilização de modelos animais além dos custos, ética envolvida e capacidade de modulação do processo de carcinogênese, estão no fato de que roedores e o ser humano possuem ritmos biológicos semelhantes e que pode ser observada semelhança na morfologia, histopatologia e localização das neoplasias ginecológicas dos roedores em comparação aos reportados clinicamente em humanos (Mclachlan *et al*, 1980; Vollmer, 2003).

Em várias linhagens de ratos e camundongos, a exposição aos estrógenos aumentou a incidência de lesões não neoplásicas e tumores em diversos órgãos, incluindo o sistema reprodutor, particularmente durante os períodos de desenvolvimento e crescimento (Liehr, 2001). Estudos relatam anormalidades relacionadas à exposição ao DES *in utero* (Maclachlan *et al*., 1980), assim como a exposição neonatal (Forsberg, 1972; Bern *et al*., 1975; Takasugi, 1976), em ratas CD-1,

causando adenose vaginal e adenocarcinoma de células claras. A estrona (E1), o 17β – estradiol (E2) e o estriol (E3), quando administrados no período neonatal, também demonstraram aumentar a incidência de lesões pré-neoplásicas e adenocarcinomas uterinos em ratas CD-1 iniciadas com N-*Metil*-N-*Nitrosuréia* (MNU) (Niwa *et al.,* 1993). A iniciação da carcinogênese pela MNU e o aumento da incidência de tumores pelo uso de estrógenos provou ser útil como modelo para o estudo da carcinogênese, da histopatologia e de substâncias que atuem na prevenção e inibição de tumores endometriais (Vollmer, 2003).

II – Desreguladores Endócrinos e o Bisfenol A

O processo de industrialização aumentou a exposição do homem e dos outros seres a uma grande variedade de substâncias sintéticas, que são produtos de tal atividade humana crescente. Há algum tempo, as consequências dessa exposição estão sendo observadas, inicialmente em animais, como pássaros e peixes e também humanos. Entre esses efeitos, podem ser observadas alterações no padrão repodutivo, problemas de tireoide, alterações no comportamento e metabolismo, sugerindo perturbações no sistema endócrino (Organização Mundial da Saúde, 2002). Alguns desses compostos exógenos podem mimetizar *in vitro* e *in vivo*, o hormônio estrógeno 17β - estradiol (E2) (Figura 3), sendo denominados xenoestrógenos. Esses compostos constituem parte de um amplo grupo de agentes químicos que foram denominados desreguladores endócrinos devido a sua ação perturbadora do processo de homeostase hormonal (Singleton *et al.,* 2006).

Outra constatação importante é que essas possíveis perturbações no sistema endócrino podem ser observadas na prole dos animais expostos a essas substâncias em baixas concentrações. Além disso, existem períodos críticos no desenvolvimento do sistema reprodutor em humanos quanto em animais, em especial a gestação, em que organismos em desenvolvimento tem baixa produção de hormônios endógenos (Reinwald & Weaver, 2006), são sensíveis a alterações epigenéticas (Vieau, 2011), possuem um sistema imunológico imaturo (Currie *et al.,* 2011), baixas taxas de metabolismo hepático (Lee et al., 2012) e tamanho corpóreo diminuido, cogita-se que a exposição pré-natal e gestacional a químicos sintéticos *"estrogen-like"* aumentaria o risco do desenvolvimento de neoplasias ginecológicas na vida adulta.

Entre os xenoestrógenos, o bisfenol A, ou 2,2 Bis-4-Hidroxifenil Propano (BPA) é alvo de grande atenção em virtude da freqüente exposição humana (Durando et al. 2007)**.** Descoberto em 1891, atualmente é um dos compostos mais produzidos pela atividade humana, atingindo anualmente a marca 3,6 milhões de toneladas produzidas e 100 toneladas liberadas na atmosfera (Vandenberg *et al.,* 2009). É produzido pela condensação de uma molécula de acetona com dois equivalentes fenólicos, tendo como subproduto a água (Figura 3) (Ning & Ishida, 1994). É um

composto utilizado no processo de fabricação de plásticos policarbonato e resinas epóxi, que são encontrados em grande variedade de produtos comuns, incluindo embalagens reutilizáveis de alimentos e bebidas, mamadeiras, forros de proteção, em recipientes de metal de alimentos e bebidas enlatados, tubulação plástica, composição de cremes e selantes dental e em muitos outros produtos de utilização humana (Krishnan *et al.* 1993, Markey *et al.*, 2001, Welshons *et al.* 2006).

As primeiras investigações sobre as propriedades químicas do BPA tiveram início em 1930, quando seu potencial estrogênico foi descoberto (Dodds & Lawson, 1930). No entanto, as propriedades estrogênicas do DES (Figura 3) aparentavam ser maiores do que a do BPA, assim, os estudos sobre as propriedades do composto foram esquecidos por um determinado período (Dodds & Lawson, 1936).

A atividade estrôgenica de uma substância, levando-se em conta os receptores clássicos nucleares (RN) REα/β, é normalmente definida pela sua capacidade de interação com dois domínios específicos dos receptores, o AF-1 (região COOH-terminal) e o AF-2 (região NH2-terminal). A região AF-1 parece mediar a atividade dos REs de maneira independente de ligante, regulada por fosforilação em resposta a fatores de crescimento (Kato *et al*., 1995). A região AF-2 é o domínio que atua na ativação dos REs dependente da presença de um ligante (também conhecida como LBD, *ligant binding domain*, do inglês) (Stanisic´ *et al*., 2010). Dependendo da interação da substância com esses domínios, a conformação estrutural do receptor, que pode formar homodímeros α/α ou heterodímeros α/β, se torna inapta a receber fatores de corregulação, impedindo a ligação do receptor ao DNA e assim, inibindo a expressão gênica (sendo assim, base da ação de compostos agonistas e antagonistas) por diferentes mecanismos (Migliaccio *et al.,* 2007).

O mecanismo pela qual o BPA exerce sua atividade estrogênica é pouco conhecido. Mas sabe-se que a afinidade do BPA aos receptores clássicos de estrógeno α (REα) ou β (REβ) é de 10.000 e 1000 vezes menor do que o estradiol (E2), respectivamente (Kuiper *et al.* 1998). Isto sugere que o BPA deveria mimetizar ou competir com os estrogênios endógenos em doses da ordem micromolares. No entanto, o BPA em doses nano molares freqüentemente exibem atividades que são semelhantes aos da classe do estradiol E2, que é agonista tanto do receptor α quanto β em vários tecidos. (Watson *et al.* 2005; Welshons *et al.* 2006; Lapensee *et al.* 2009).

Isso pode ser atribuído ao fato de que, além dos mecanismos genômicos clássicos, existem mecanismos não genômicos de sinalização envolvendo a ação de estrógenos, como a ativação de segundos mensageiros e receptores de membrana (Stanisic´ *et al*., 2010). De fato, o BPA já demonstrou ter a capacidade de ligar-se a uma forma de receptor de membrana do REα (denominada mER), que é similar ao clássico REα (Chu and Fuller, 1998), além de um receptor transmembrana chamado de ~~"G~~ protein-coupled receptor 30" (GPR30), que tem maiores diferenças em relação ao clássico REα em comparação com o mRE (Thomas and Dong, 2006). Ambos

demonstraram atuar de maneira não genômica, como, por exemplo, nas células da hipófise (GH3/B6), que naturalmente expressam a forma mER, e quando expostas ao BPA (na ordem de picomolares e nanomolares), resultou em um aumento no influxo de cálcio e uma consequente liberação de prolactina (Watson *et al*., 2007). Além disso, o BPA também demonstrou atuar no mesmo mRE em células pancreáticas (Alonso-Magdalena *et al.,* 2005), demonstrando que a ligação do BPA a esses receptores distintos não se restringe somente a um tipo celular.

A interação entre o REs clássicos e o BPA pode acontecer durante o desenvolvimento fetal pois, em humanos, os REs (RNAm e proteína) são expressos durante o segundo trimestre de gestação (Glatstein *et al*., 1995). Já em roedores, REα e o REβ são expressos no mesênquima dos ductos e túbulos Müllerianos, na genitália indiferenciada, no estroma uterino e nos ovários entre o 10º e o 17º dias de gestação (Lemmen *et al*., 1999; Jefferson *et al*., 2000). A expressão de REα e/ou REβ também pode ser observada em outros tecidos durante o período de desenvolvimento gestacional de roedores, como coração, cérebro, mama e próstata, também evidenciando a possível ação de agentes com ação estrogênica na morfogênese de tais órgãos (Lemmen *et al*., 1999).

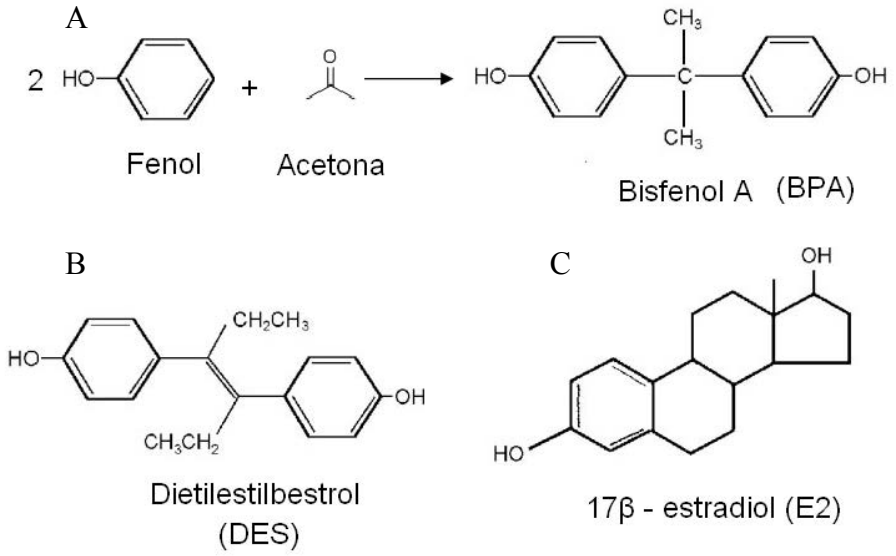


Figura 3. Síntese e estrutura do Bisfenol A (A), além das estruturas do DES (B) e do E2 (C). Destaca-se a semelhança da estrutura química do BPA, não esteroidal, com o E2 e DES.

Os dados de literatura sobre a segurança deste produto são controversos, tanto na exposição humana quanto na experimental. Investigações sobre a segurança do BPA têm mostrado que os produtos de consumo com resíduos de BPA são seguros para utilização e sem riscos conhecidos para a saúde humana (Haighton *et al.* 2002; Gray *et al*. 2004). Contrariamente, estudos têm demonstrado efeitos adversos em baixas doses e aumento da exposição humana ao BPA, devido ao maior o uso de produtos à base de resinas epóxi e plásticos de policarbonato (Welshons *et al.* 2006, Kang *et al.* 2006). Nos EUA, Europa e Japão, os níveis de BPA em soro humano de adultos e de

fetos estão na faixa de 0,2 a 10 ng/mL (~ 0,5-40 nM) (Welshons *et al.* 2006, Kuruto-Niwa *et al.* 2007). Devido a sua semelhança estrutural com o E2, o BPA possui características lipofílicas, e também pode acumular-se no tecido adiposo e detectado em amostras de tecido adiposo mamário (Fernandez *et al.* 2007). Em 2005, um estudo conduzido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças Americano (CCD - EUA) examinou 394 americanos e relatou que BPA foi encontrado em 95% das amostras de urina coletadas(Calafat *et al.* 2005), indicando que o homem é rotineiramente exposto a essa molécula. Em estudo recente, foi detectado BPA em 92,6% dos 2500 norte-americanos investigados (Calafat *et al.* 2008). A concentração na urina foi em torno de 0,4 a 149 g/L com media geométrica de 2.6 g/L e significativamente maior em crianças e adolescentes quando comparados com adultos. Além disso, vários estudos detectaram a presença de BPA no soro de mulheres grávidas, sangue de cordão umbilical, líquido amniótico e plasma fetal; sugerindo que os embriões e fetos são expostos ao BPA durante a gestação (Yamada *et al.* 2002; Engel *et al.* 2006). Além disso, o BPA tem sido detectado em leite humano (Sun *et al.* 2004), indicando que a exposição também ocorre durante o período de amamentação. Assim, a exposição a xenoestrógenos como o BPA, principalmente durante o desenvolvimento pré-natal e durante a lactação pode ter contribuído para o aumento da incidência de infertilidade, anomalias do trato genital e câncer de mama observada nos países europeus e União Européia ao longo dos últimos 50 anos (Sharpe and Skakkebaek 1993; Munoz-de-Toro *et al.* 2005).

Experimentalmente, as controvérsias também podem ser observadas em estudos que avaliaram as ações do BPA no sistema reprodutor da prole de roedores CD-1 e Sprague Dawley durante exposição gestacional, lactação ou pós-natal. Esses estudos revelaram que a exposição ao BPA durante esses períodos tem aumentado a susceptibilidade ao aparecimento de uma variedade de anormalidades no sistema reprodutor feminino, incluindo alterações morfológicas nos ovários (Markey *et al.*, 2003), na vagina (Schoënfelder *et al*., 2002) e útero (Papaconstantinou *et al.*, 2000). Além disso, o BPA pode causar perturbação do ciclo estral e diminuição dos níveis séricos do hormônio luteinizante (LH) em ratas ovariectomizadas (Honma *et al.* 2002; Howdeshell *et al.* 1999; Rubin *et al.* 2001; Markey *et al.* 2003). A partir da exposição neonatal ao BPA, observaram-se anormalidades benignas, pré-malignas e neoplásicas no sistema reprodutor feminino (Newbold *et al.,* 2007). Porém, outros estudos demonstraram que a exposição perinatal e neonatal ao BPA não alterou o desenvolvimento do trato genito-urinário de machos e fêmeas da geração F1 de ratos Sprague-Dawley (SD) (Kwon *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002), nem alterou crescimento somático (Kobayashi *et al.,* 2002). Na maioria dos estudos, além da variação de efeitos biológicos e do período de exposição dos animais, há grande variedade de concentrações e de meios de administração do BPA, como exemplificado na Tabela 1, o que pode explicar a diversidade dos efeitos biológicos. Sendo assim, são necessários mais estudos para determinar os potenciais efeitos adversos da exposição ao BPA durante estágios críticos do

desenvolvimento gestacional e neonatal, principalmente.

Tabela 1. Variação no delineamento experimental de estudos que avaliam exposição ao BPA e trato genital feminino

Concentração	Via de administração	Animais	Período de Exposição	Autor
25-250 ng/kg p.c.	Bombas osmóticas	Camundongos CD-1	Pós-natal e lactação	Markey *et al*., 2005
0.1-50 mg/kg p.c.	Gavagem	Ratos Sprague- Dawley	Gestacional	Schoënfelder *et al*., 2002
4,40,400 mg/kg p.c.	Gavagem	Ratos Sprague-Dawley	Gestacional e lactação	Kobayashi *et al.,* 2002
10, 100, 1000 ug/kg p.c.	Injeção subcutânea	Camundongos CD-1	Pós-natal	Newbold *et al.,* 2007
0.1-1.2 mg/kg p.c.	Água	Ratos Sprague-Dawley	Gestacional e lactação	Rubin *et al*., 2001

A ligação do BPA com outros receptores, como o receptor de hormônios da tireóide e o receptor de androgênio, também é um assunto controverso. No entanto, há evidências de que o BPA, assim como dois derivados do BPA utilizados como retardantes de chamas, o tetraclorobisfenol A e o tetrabromobisfenol A, ligam-se ao receptor de hormônios da tireoide de maneira antagonista, impedindo a ligação do hormônio T3 (Moriyama *et al*., 2002; Kitamura *et al*., 2002). Já em relação ao receptor de andrógenos, o BPA demonstrou ter ação antiandrogênica, na ordem de 10^{-5} e 10^{-7} M, quando submetido a um teste *in vitro* com a diidrotestosterona (Sohoni & Sumpter, 1998)

Além do sistema reprodutor, vários estudos demonstram as atividades deletérias do BPA em outros diferentes nos demais sistemas e órgãos. A exposição pós-natal ao BPA no desenvolvimento mamário de roedores aumentou o número de lesões hiperplásicas ductais consideradas pré-neoplásicas (Murray *et al*., 2007), alterou o desenvolvimento mamário normal (Tharpa *et al.,* 2012) e promoveu a angiogênese mediada por fatores endócrinos (Durando *et a*l., 2011) em exposição gestacional, contribuindo para a maior incidência de neoplasias mamárias na vida adulta.

Já em relação à próstata, a exposição ao BPA em animais adultos aumentou a expressão das enzimas importantes para a síntese aromatase e 5α-redutase, enzimas importantes para a síntese de diihdrotestosterona e estradiol, respectivamente (Castro *et al*., 2013). As expressões alteradas dessas enzimas podem ser consideradas fatores determinantes para o desenvolvimento de doenças prostáticas, como o câncer (Negri-Cesi *et al.,* 1998). Além disso, a exposição neonatal ao BPA causou alterações epigenéticas em genes específicos do desenvolvimento e maturação da glândula prostática, como alterações na metilação e expressão dos genes *Nspb1* e *Hpcal.* Tais alterações durante o período neonatal podem contribuir para a carcinogênese prostática (Tang *et al*., 2012).

III – Genisteína e Indol-3-Carbinol

Muitos dos agentes químicos que possuem ação estrogênica, e que despertaram atenção em relação aos seus efeitos, são sintéticos. No entanto, existem algumas substâncias naturais que também possuem ação estrogênica, mas demonstraram ter ação quimioprotetora, como os micoestrógenos e os fitoestrógenos (Gutendorf & Westendorf, 2001). O consumo de produtos a base de soja contendo fitoestrógenos tem recebido muita atenção pelo fato de promover melhora na qualidade de vida em especial de mulheres na menopausa. Dados epidemiológicos demonstram que o consumo de dieta com derivados de soja reduziu a incidência de câncer de mama, próstata, doenças cardiovasculares e osteoporose, além de diminuir o colesterol total (Lamartiniere *et al.* 1998, Zhou 2004). O consumo de fitoestrógenos varia mundialmente. Na dieta da Europa ocidental, os níveis estimados de fitoestrógenos na atingem menos do que 0.2 mg/kg/dia. Já na dieta do leste do Japão, os níveis de fitoestrógenos atingem 1.2 mg/kg/dia (Coward *et al.,* 1993).

Dentre os componentes químicos da soja, a 4',5,7-hidroxi-isoflavona, conhecida como genisteína, tem chamado a atenção de pesquisadores, produtores e indústria farmacêutica devido às diversas atividades biológicas. E essas atividades podem estar relacionadas com a estrutura dessa isoflavona (Figura 4). Sua semelhança estrutural com o estrogênio endógeno é evidente, e estudos já demonstraram que a genisteína atua em ambos os receptores de estrogênio (α e β) com menor afinidade do que o E2 (Mueller *et al*., 2004). Estudos estruturais de cristalografia e raio-X demonstraram que os grupos fenólicos C4' e C7 da genisteína possuem maior afinidade com a região AF-2 (LBD) do receptor de estrógeno β em comparação com α (Manas *et al.,* 2004). Essa capacidade da genisteína de ligar-se aos receptores e ativar a via estrogênica pode explicar os efeitos benéficos da ingesta de alimentos ricos em soja sobre os sintomas observados em mulheres na menopausa, visto que há diminuição dos hormônios endógenos nesse período da vida reprodutiva (Andersen & Markham, 2006).

Assim como outras isoflavonas e compostos fenólicos, a estrutura principal da genistéina é um anel heterocíclico. Mas podem ser observados grupos hidroxilas ligados ao anel que podem inibir a ação de radicais livres, contribuindo para possíveis atividades antioxidantes (Andersen & Markham, 2006). Em estudos *in vitro* e *in vivo,* a genisteína inibiu a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Wei *et al.,* 1993) e reduziu o desenvolvimento de neoplasias quimicamente induzidas em mama, pelo 3,2'dimetil-4-aminobifenil (DMBA) (Kato *et al*., 2000), e neoplasias de colón, induzidas pelo azoximetano (AOM) (Thiagarajan *et al*., 1998).

As ações da genisteína em proliferação e morte celulares também já foram observadas. Estudos prévios demonstraram a capacidade da genisteína em inibir as enzimas tirosina quinase e topoisomerase II (Akiyama *et al.* 1987; Okura *et al.* 1988), relacionadas com proliferação celular.

Além de ação pró-apoptótica, que já foi observada em uma grande variedade de células epiteliais (Banerjee *et al*., 2008) em concentrações de 10–200 μM, similares àquelas responsáveis pelas atividades antiproliferativas. *In vitro,* a genisteína aumentou a expressão de Bax, caspase-3 e caspase 9, proteínas pró-apoptóticas (Tophkhane *et al*., 2007; Kazi *et al*., 2003; Upadhyay *et al*., 2001). Podendo contribuir para a inibição de vários tipos de cânceres, em especial os hormônio-dependentes. Os mecanismos pelos quais a genisteína pode conferir proteção contra os cânceres ginecológicos, além dos citados anteriormente, são considerados complexos. Os possíveis mecanismos de ação da genisteína podem estar relacionados com a fraca ação estrogênica do composto, que competindo com o estrogênio endógeno pelo receptor de estrogênio, pode diminuir a proliferação celular por via estrogênica (Wiseman & Duffy, 2001; Huber, 2000). Além da supressão de *c-fos* e *c-jun* no tecido endometrial, que são proteínas dependentes da ação de estrogênio (Lian *et al*., 2001). Outra ação da genisteína pode estar relacionada à diminuição os níveis de RNAm dos REs (Wang *et al*., 1996), além do fato de que alimentos baseados em soja demonstraram diminuir os níveis dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) (Lu *et al*., 2000).

No entanto, a genisteína demonstrou ter ações proliferativas mediadas pelos receptores de estrogênio. A exposição *in vitro* a Genisteína (1 μM) causou aumento na proliferação de células tumorais mamárias MCR-7 (ER positivas) e da expressão do fator de transcrição *ps2*, envolvido com a via de proliferação estrogênica, mas não em células RE negativas. No mesmo estudo, *in vivo*, foi demonstrado que o composto (750 ppm) atuou estimulando o crescimento da glândula mamária de roedores adultos (Ching-Yi *et al*., 1998).

Como o consumo de bebidas de soja por crianças também é um hábito comum, e os níveis de soja consumidos podem chegar a 4 mg/kg de genisteína por dia. Assim, os efeitos desse consumo durante o desenvolvimento também é alvo de pesquisas em roedores. Alguns desses estudos indicam que a exposição a genisteína em concentrações semelhantes à ingestão humana durante a gestação e lactação não causa efeitos deletérios no sistema reprodutor da prole roedores (Kang *et al*., 2002), além de também não demonstrar efeitos adversos durante a vida adulta no trato reprodutivo de roedores machos (Kang *et al.*,2002). Enquanto outros estudos indicam que a exposição perinatal e neonatal (Delclos *et al*., 2001), ou somente neonatal (Kaludjerovic *et al*., 2012) à genisteína pode causar alterações no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, principalmente em ovários e útero. Outros estudos relacionados a genisteína podem auxiliar na determinação de concentrações seguras para a exposição humana durante os períodos críticos de desenvolvimento funcional e estrutural dos órgãos reprodutivos.

Além dos componentes da soja, outra molécula que vem sendo amplamente investigada pelas suas propriedades é o Indol-3-carbinol (I3C), um componente natural encontrado em altas concentrações nos vegetais da família das *Brassicas* que inclui brócolis, couve-flor, couve de

bruxelas e repolho (Jongen, 1996). Durante o processo digestivo, o I3C é exposto às condições ácidas do trato gastrointestinal, originando derivados poliaromáticos indólicos que são responsáveis pelas diversas atividades biológicas desse composto. O principal produto dessa conversão polimérica é o 3,3'-diindolilmetano (DIM), além de outros compostos, como o indolcarbazol (ICZ), o 3-(metóximetil)indol e o N1-nitroso-3-nitrometilindol (Chen *et al.,* 1996).

Entre uma grande variedade de efeitos biológicos, o I3C e seus derivados demonstraram ter *in vitro* atividade antiproliferativa em células de câncer mamário (Katdare *et al*., 1998), câncer de cólon (Hudson *et al.,* 2003) e câncer prostático (Nachshon-Kedmi *et al*., 2003), normalmente relacionadas com a sua capacidade pró-apoptótica. Em células tumorigênicas de mama, o I3C e o DIM aumentaram a taxa de expressão de Bax e causaram ativação da caspase-3 (proteínas pró-apoptóticas), além de redistribuir a proteína Bax para a mitocôndria e diminuir a expressão de Bcl-2 e de Bcl-xL (proteinas anti-apoptóticas) (Rahman *et al*., 2003; Hong *et al.,* 2002; Rahman *et al*., 2000). Além disso, o I3C já foi capaz de inibir a formação de aductos no DNA causados pela ação de aminas heterocíclicas como a 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]piridina (PhIP), indutor de tumores mamários em roedores, e a 2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]quinolina (IQ), responsável pela indução de tumores mamários e hepáticos em roedores (He *et al.,* 1999). Essas e outras propriedades biológicas também colocam o I3C e seus derivados como compostos com possível ação quimiopreventiva em diferentes tipos de câncer, tanto espontâneos quanto quimicamente induzidos.

In vivo, o I3C demonstrou inibir o desenvolvimento de lesões pré-neolásicas (hiperplasias endometriais) e adenocarcinoma esporádico de útero em roedores (Kojima *et al*., 1994), sendo um candidato promissor para a quimioprevenção de tumores hormônio-dependentes. O mecanismo quimioprevenção do I3C e seus derivados, como o ICZ, em relação aos cânceres hormônio dependentes pode estar relacionado com a indução do citocromo P450 no fígado e em outros órgãos, incluindo os citocromos CYP1A1, 1A2 e 1B1, que catalisam reações de fase I (hidroxilação), metabolizando compostos de ação tóxica para o organismo. O I3C e o ICZ possuem ação agonista sobre o receptor Aril hidrocarbono (AHR) *in vitro*, que tem como resposta a indução de citocromos específicos (Liu *et al*., 1994). Em uma grande variedade de espécies, a metabolização do estradiol endógeno (E2) é feita por enzimas do citocromo P450, que modulam seus efeitos no organismo. Em roedores, os citocromos CYP1A2, 2B1/2B2 catalizam a hidroxilação do E2 para 2-hidroxiestradiol (2HE) e 4-hidroxiestradiol (4-HE) (Wilson & Reed, 2001; Horn *et al*., 2002). A 2-hidroxilação do estradiol é a principal via de metabolização do E2 (Zhu & Conney et al., 1998), originando um composto metabólico com pequena afinidade ao receptor de estrogênio e com menor potencial estrogênico do que o E2, afetando, assim, a sinalização dependente de E2 por competir com o hormônio endógeno pelos receptores de estrogênio (MacLusky et al., 1983). Além disso, a

indução do citocromo CYP1A1 pelo I3C/DIM aumenta a metabolização da estrona (E1) em 2-hidroxiestrona, que possui atividades antiproliferativas e pró-apoptóticas (Bradlow *et al*., 1996), podendo contribuir para a prevenção de cânceres hormônio dependentes. Um outro mecanismo que pode estar relacionado à modulação dos cânceres hormônio dependentes é a ação direta de I3C sobre a inibição da atividade do receptor de estrogênio α ativado por ligante endógeno (Meng *et al*., 2000a) e o aumento da expressão do gene supressor de tumor BRCA-1, que atua na inibição da expressão de ERα. No mesmo estudo, foi demonstrado que o I3C atua inibindo a expressão de fatores de transcrição dependentes da via do estrogênio, como ps2 e catepsina-D (Meng *et al.,* 2000b). Por fim, um mecanismo independente da via estrogênica está relacionado o aumento da expressão do genes da família GADD, responsáveis por atuar na saída da célula do ciclo celular e também na indução de apoptose, causado pela exposição ao I3C/DIM (Auborn *et al.,* 2003).

No entanto, outros estudos indicam que o I3C e seus derivados podem atuar na promoção de cânceres hormônio dependentes, como pôde ser observado em um estudo no qual o I3C promoveu o desenvolvimento de adenocarcinoma endometrial em roedores iniciados pela N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (Yoshida et al., 2004). Entre os mecanismos propostos para essa ação biológica está relacionada a 4-hidroxilação do E2 pelo citocromo P450, especificamente pelo CYP1B1, que origina o metabólito 4-hidroxiestradiol, que é um composto com forte atividade estrogênica em comparação com o principal metabólito de E2, o 2-hidroxiestradiol (Liehr *et al*., 1996). Assim, de acordo com concentração de I3C que os animais são expostos, a indução de P450 pode variar as taxas da transformação de E2 em 2-HE e 4-HE, sendo um marcador para o desenvolvimento de tumores hormônio-dependentes (Yoshida *et al*., 2004). Outros fatores relacionados a via do estrogênio também podem promover o desenvolvimento desse tipo de tumores, como, por exemplo, a ação fraca estrogênica de ICZ (Liu *et al*., 1994) e a metabolização alternativa de E2 por 16α-hidroxilação, que pode originar compostos que atuam no aumento da proliferação celular (Telang *et al*., 1997).

De maneira geral, os seres humanos são expostos a uma grande variedade de compostos naturais e sintéticos que podem causar efeitos biológicos importante durante sua vida, mas segundoYang (1994), a grande maioria dos estudos e recursos são utilizados para avaliar os efeitos de somente um composto. Assim, como a Genisteína e I3C possuem propriedades biológicas que podem modular os cânceres hormônio dependentes causados pela ação de hormônios endógenos, é possível que também atuem modulando/modificando os efeitos causados pela exposição gestacional ao BPA, composto que já apresentou efeitos estrogênicos *in vivo* e *in vitro,* quando associados.

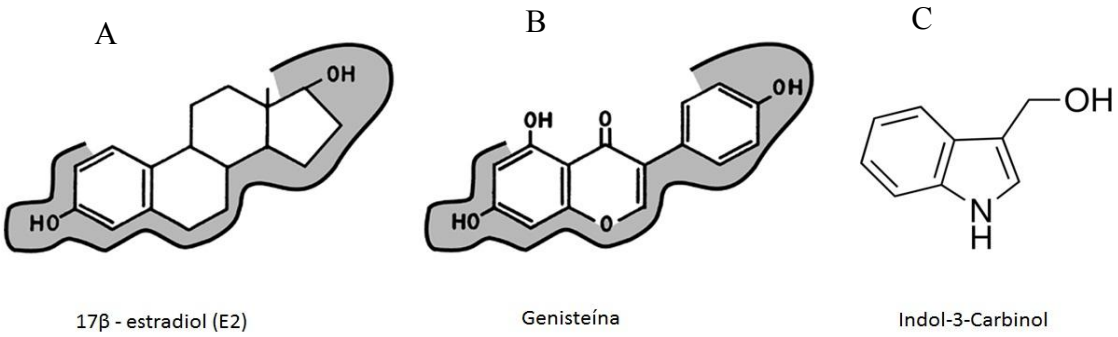


Figura 4. Estruturas do E2 (A), Genisteína (B) e Indol-3-Carbinol (C). É possível observar em A e B (cinza), a semelhança estrutural do E2 com a Genisteína.

2. Objetivos

O presente projeto teve como objetivos:

1. Avaliar os efeitos da exposição gestacional ao Bisfenol - A (BPA) sobre a morfogênese do útero e ovários na prole de fêmeas Sprague-Dawley (SD) da geração F1;

2. Avaliar se a exposição gestacional a genisteína e ao indol-3-carbinol altera os efeitos do BPA sobre sobre a morfogênese do útero e ovários na geração F1;

3. Avaliar os efeitos da exposição ao BPA, e às associações BPA e genisteína, BPA e indol-3-carbinol em relação à susceptibilidade a carcinogênese induzida pela MNU.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e ambiente de experimentação

Ratos machos e fêmeas da linhagem Sprague-Dawley, em idade reprodutiva foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP (Campinas-SP) e mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Os animais foram distribuídos em duas fêmeas e um macho adulto (acasalamento) e, posteriormente, a prole em cinco fêmeas por gaiola de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas três vezes por semana.

Durante toda a fase de experimentação as condições ambientais do biotério foram controladas, como: temperatura (22 ± 2^{o}C), umidade relativa do ar (55 ± 10%), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam ração comercial (Nuvilab-CR1 – Nuvital, PR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico, com capacidade para 500 ml. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*. Durante o experimento, os animais passaram por avaliação clínica semanal. Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e sacrifício dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (protocolo número 447-CEUA)**.**

3.2. Preparo da ração com Genisteína e Indol-3-carbinol

Genisteína (CAS nº 446-72-0, Sigma-Aldrich, EUA) e Indol-3-carbinol (CAS nº 700-06-1 Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados e misturados à ração em pó Nuvilab-CR1 (Nuvital-PR) na concentração final de 250 mg/kg e 2000 mg/kg de ração, respectivamente. Após completa homogeneização e umidificação, realizada em misturador industrial (CAF-modelo M60), a ração foi peletizada em máquina peletizadora de ração (Chavantes – PR), seca por ventilação e acondicionada em sacos plásticos previamente identificados e mantidos sob refrigeração (-8ºC) até o momento do uso.

3.3. Delineamento Experimental

Por questões práticas, o protocolo experimental (Figura 5) foi dividido em duas fases:

3.3.1. FASE I – Período gestacional até o Dia Pós-Natal 21 (DPN21)

Após o período de aclimatação duas fêmeas sexualmente virgens foram colocadas com um macho por gaiola por 12h (período escuro). A presença de esperma no esfregaço vaginal e da citologia vaginal positiva da fase de estro foram considerados como indicadores do Dia Gestacional

0 (DG0) (Grassi *et al.,* 2011) (Figura 6). As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas individualmente nas gaiolas. Grupos de fêmeas prenhes foram expostas ao BPA (Sigma-Aldrich Co., USA, CAS No. 80-05-7) via oral (gavagem) nas concentrações de 25 ou 250 ug/kg de peso corpóreo (p.c.) ou volume equivalente de dimetil sulfóxido (DMSO - veículo de diluição BPA) do dia DG 10 até o DG 21 (Moral *et al.* 2008). Durante o período gestacional as fêmeas receberam ração basal ou ração acrescida de genisteína (250 mg/kg) ou indol-3-carbinol (2000 mg/kg) e água *ad libitum* até o DG 21. Após esse período (DPN 1 até DPN21 - lactação), as mães receberam ração basal e água *ad libitum* e parte da prole foi sacrificada no DPN 21.

3.3.2. FASE II –DPN21 até final periodo experimental (25ª semana após iniciação com a MNU)

O restante da prole de fêmeas recebeu no dia DPN 51, dose única intravenosa (i.v.) de *N*-metil *N*-nitrosoureia (MNU - 50 mg/kg CAS nº 684-93-5, Sigma-Aldrich, EUA) ou solução de 0,9% NaCl (1ml/kg, veículo de diluição MNU) e ração basal até a 25ª semana após a aplicação das doses de MNU ou NaCl, quando a prole restante de fêmeas foi sacrificada.

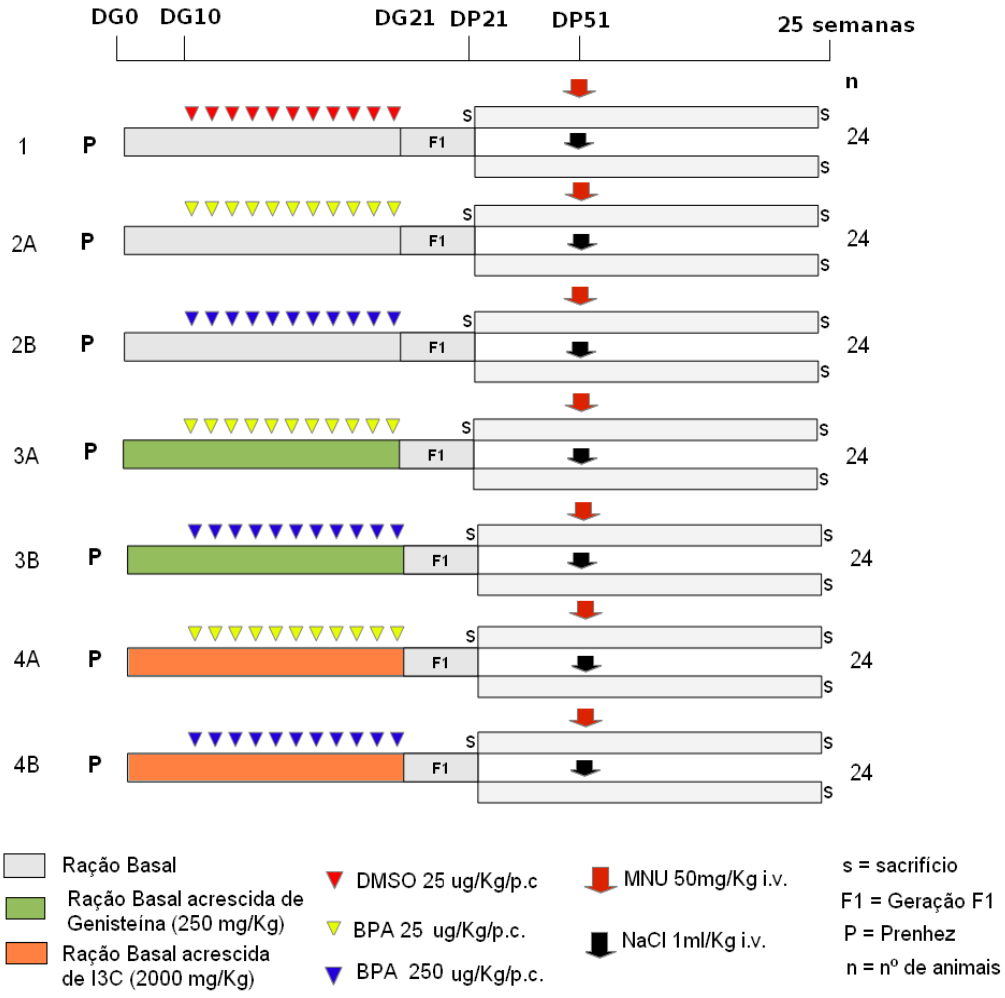


Figura 5. Delineamento Experimental

3.3.3. Parâmetros avaliados - FASE I - DPN 21

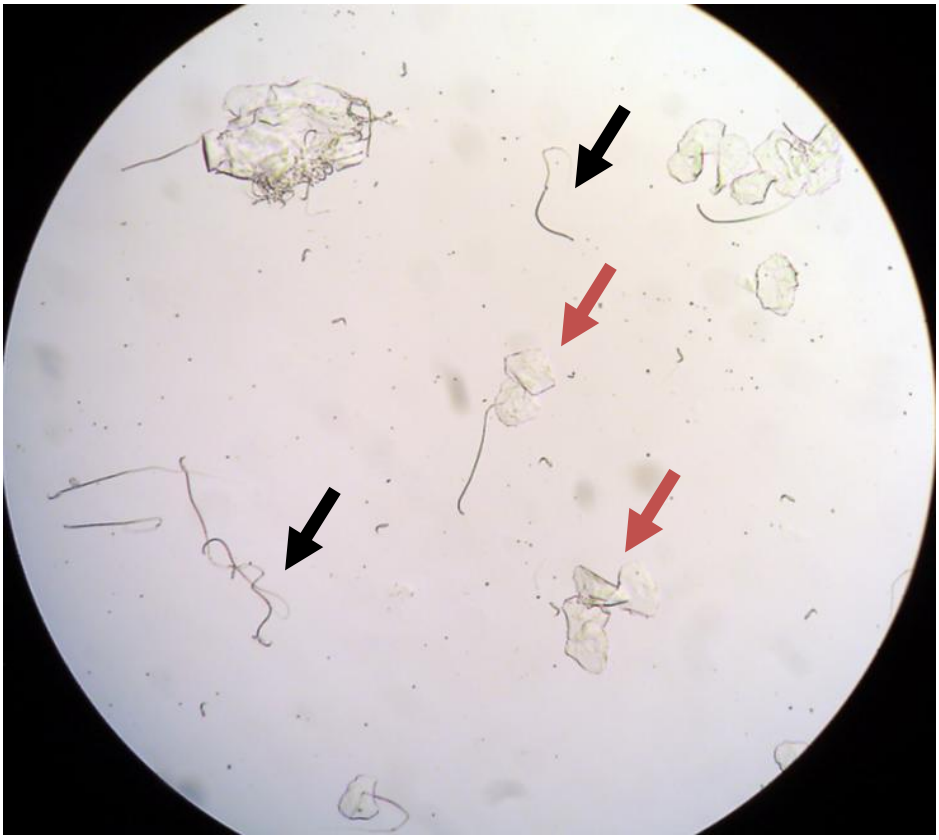


Figura 6 – Fotomicrografia de esfregaço vaginal após 12h de acasalamento considerado positivo. Presença de espermatozóides (seta preta) e células cornificadas características da fase estro do ciclo estral (seta vermelha).

I – Dados da prole e das mães

No período correspondente a gestação e a lactação, alguns parâmetros foram observados, tanto para as mães quanto para as proles (fêmeas e machos). Foram registrados valores de duração de gestação (dias), tamanho da ninhada, proporção de sexo da ninhada (F:M), peso córporeo médio das mães no 20 GD, ganho de peso córporeo, consumo de ração (mg/rato/dia) e consumo de genisteína/I3C (mg/rato/dia). Os três últimos parâmetros foram calculados do DG 0 até o DG 21. O peso corpóreo médio da prole de fêmeas foi calculado em 3, 10, 21, 51 PND.

II - Coleta dos ovários, útero e tubas uterinas para análise histológica

Após o sacrifício dos animais no DPN 21, os ovários e útero da prole de fêmeas iniciadas ou não com a MNU foram retirados e pesados para o cálculo de peso relativo, depois, juntos às tubas uterinas, lavados em solução fisiológica, fixados em formalina tamponada 10% por 48 h, e levados para processamento histológico (H&E).

Para a coloração de HE, as lâminas contendo cortes de útero, ovários e tubas uterinas de 5 µm espessura passaram pelas seguintes etapas: bateria de hidratação (Xilol I, II e III por 10 minutos em cada; álcool absoluto I, II e III, álcool 90% por 10 segundos cada passagem; água), Hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavagem em água corrente por 10 minutos, Eosina por 2 minutos e a bateria de desidratação (Álcool 90%, álcool absoluto I, II e III; Xilol I, II e III por 10 segundos cada passagem). Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Merck (Alemanha). Terminada a coloração, as lâminas foram para a montagem. Foram colocadas lamínulas (24x32mm) em resina sintética Permount (Fisher, EUA).Após a montagem, as lâminas histológicas foram rotuladas e identificadas.

III – Contagem e Classificação de Folículos Ovarianos

As amostras dos ovários foram processadas para obtenção de cortes histológicos de 5µ de espessura e corados pela técnica de H&E para a contagem e classificação folicular segundo a descrição prévia de Myers *et al*., 2004 (Figura 7). As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz com analisador de imagem (CellSens Standard Imaging System, Olympus, Japão). Folículos primordiais foram caracterizados pela presença de uma única camada de células foliculares pavimentosas envolvendo o oócito. Já os classificados como primários, possuem uma única camada de células foliculares cuboides em torno do oócito. Folículos foram classificados como pré–antrais quando apresentavam de 2-4 camadas de células na camada granulosa e não possuíam espaço antral. Folículos classificados como antrais apresentavam 3 ou mais camadas de células na camada granulosa e espaço antral claramente definido. Os folículos pré-ovulatórios (ou de Graaf) foram classificados pelo seu grande tamanho e pela presença de uma camada definida de células da granulosa envolvendo o oócito (cumulus oophorus). Por fim, os folículos atrésicos foram caracterizados pela presença de células da granulosa desorganizadas e picnóticas (apoptose) e apresentando ainda ovócito em degeneração e deslocamento da membrana basal. Foram feitas medidas de área dos ovários (em mm²) e os resultados foram expressos em número total de folículos (de cada tipo) divididos pela área ovariana (mm^2). Além disso, para o cálculo do total de folículos, foram somados todos os tipos de folículos ovarianos e, em seguida, o resultado de cada análise folicular foi dividido pela área ovariana.

IV - Análise morfométrica de útero e tubas uterinas

As amostras de útero e tubas uterinas foram processadas para obtenção de cortes histológicos de 5µ de espessura, corados pela técnica de H&E e analisados com auxílio de um microscópio de luz com analisador de imagem, conforme descrito por Markey *et al*., 2005. Os parâmetros morfométricos calculados para as medidas de útero compreenderam medidas de

comprimento (em μm) de epitélio luminal, epitélio glandular, lâmina própria, camada interna e externa do miométrio e lúmen uterino. Além de medidas de área absoluta (em mm²) e relativa (em %) de endométrio, miométrio interno e externo lúmen uterino e vasos sanguíneos. Já para tuba uterina, foi medida altura das células epitéliais**,** comprimento de camada muscular e serosa das regiões de ampola e istmo (em μm).

3.3.4. Parâmetros a serem avaliados - FASE II – Final do período experimental (25ª semana após iniciação ou não com a MNU)

I - Coleta de ovários, útero e tubas uterinas para análise histológica

Após o sacrifício dos animais inciados e não iniciados (25ª semana após a aplicação de MNU ou NaCl), o sistema reprodutor da prole foi retirado, ovários e útero foram pesados para o cálculo de peso relativo, depois, juntos às tubas uterinas, lavados em solução fisiológica, fixados em formalina tamponada 10% por 48 h, e seguidos para processamento histológico (H&E). As alterações histológicas e as neoplasias de ovário e útero foram classificadas segundo os critérios estabelecidos por (Dixon et al., 1999). A incidência de lesões proliferativas e neoplasias encontradas foi determinada para cada grupo experimental.

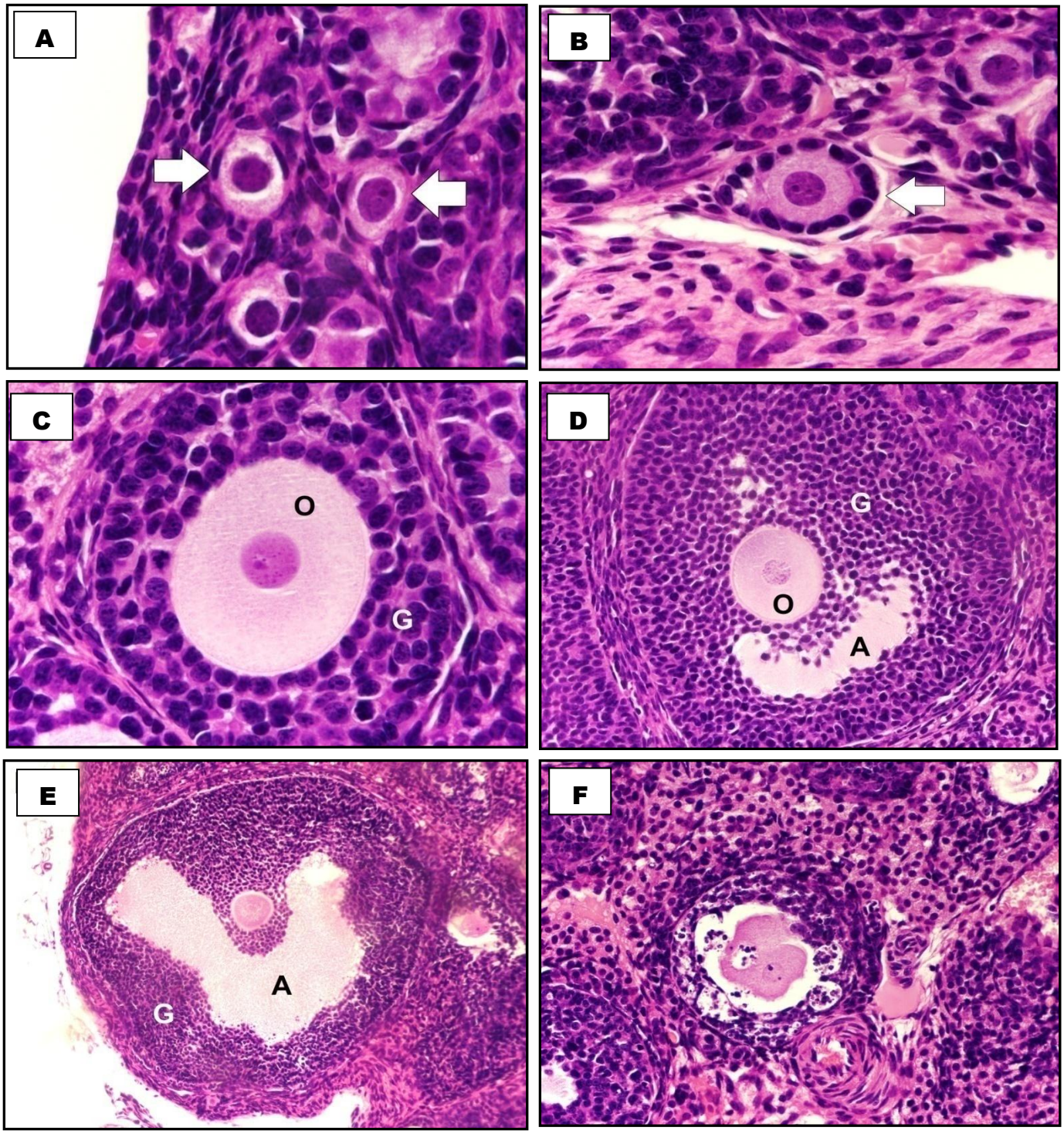


Figura 7. Fotomicrografias da histologia de ovários (H&E). **A.** Folículos Primordiais (setas), presença de uma única camada de células foliculares pavimentosas envolvendo o oócito (O), Aumento 100x. **B.** Folículo Primário (seta), possuindo uma única camada de células foliculares cuboides em torno do oócito. Aumento 100x. **C.** Folículo Pré-Antral, podem ser observadas várias camadas de células da camada granulosa (G) envolvendo o oócito, ainda sem a formação de espaço antral. Aumento 100x **D.** Folículo Antral, observa-se a formação do espaço antral (A). Aumento 40x **E.** Folículo de Graaf, caracterizado pelo tamanho e pela presença de uma camada definida de células da camada granulosa envolvendo o oócito. Aumento 20x **F.** Folículo Atrésico, há presença de células da camada granulosa desorganizadas e picnóticas, além de ovócito em degeneração. Aumento 40x.

4. Sacrifício de animais

O sacrifício dos animais nas Fases I e II foi realizado pela abertura da parede abdominal e do diafragma, seguida da secção da veia cava inferior após narcose induzida em câmara de CO2.

5. Análise estatística dos dados

Os dados de peso corpóreo, ganho de peso corpóreo, pesos de ovários e útero absolutos e relativos, contagem folicular e parâmetros morfométricos foram analisados pela Análise de Variância para Experimentos Inteiramente Aleatorizados (EIA) para amostras independentes ou pelo teste de Kruskal-Wallis. O contraste entre os grupos para os testes de ANOVA e Kruskal-Wallis foi avaliado utilizando-se os Testes de Tukey ou Student-Neuman-Keuls, respectivamente (Zar, 1984). A incidência e multiplicidade de lesões histológicas e neoplasias foram analisadas pelos testes Qui-quadrado ou teste exato de Fischer. O "n" considerado para cada grupo experimental foi de cinco animais por tratamento. Devido a complexidade dos dados coletados e da quantidade dos grupos experimentais (7 grupos), a comparação foi realizada em 3 blocos: Bloco 1 - Grupo 1 (Controle) *vs* Grupo 2A (BPA 25ug/kg/pc) e 2B (BPA 250ug/kg/pc); Bloco 2 - Grupo 2A (BPA 25ug/kg/pc) *vs* Grupo 3A (GEN + BPA 25ug/kg/pc) e Grupo 2B (BPA 250ug/kg/pc) *vs* Grupo 3B (GEN + 250ug/kg/pc); Bloco 3 - Grupo 2A (BPA 25ug/kg/pc) *vs* Grupo 4A (I3C + BPA 25ug/kg/pc) e Grupo 2B (BPA 250ug/kg/pc) *vs* Grupo 4B (I3C + BPA 250ug/kg/pc). A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de $p < 0,05$.

Observações:

1) Viabilidade dos animais, e o consumo de ração e água foram verificados três vezes por semana ao longo do experimento;

2) Equipamentos de segurança pessoal foram utilizados durante o manuseio das substâncias químicas. A neutralização de resíduos dos cancerígenos foi feita de acordo com procedimentos operacionais padrão (POP) do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE).

3) Além de parte da prole utilizada nesse estudo, as mães, o restante da prole de fêmas e a prole de machos foi encaminhado para outros estudos do mesmo grupo de pesquisa. O restante da prole de fêmeas e as mães foram destinados ao projeto de pós-doutorado entitulado "Exposição *in útero* ao desregulador endócrino Bisfenol A e a agentes quimiopreventivos na susceptibilidade a carcinogênese mamária em ratas Sprague-Dawley" (Tony Fernando Grassi, Bolsa FAPESP. 2009/17894-9). Já os machos os machos foram utilizados em dois projetos de mestrado que tem por

objetivo avaliar o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em próstata de animais expostos na gestação a BPA, GEN e I3C. Projeto 1: "Exposição in útero e lactacional ao desregulador endócrino Bisfenol A e ao agente quimiopreventivo Indol-3-Carbinol: efeitos na morfogênese inicial da próstata e na susceptibilidade a carcinogênese prostática em ratos Sprague-Dawley (Joyce Zalotti Brandt, Bolsa FAPESP. 2010/17262-0)" Projeto 2: "Exposição *in útero* ao desregulador endócrino Bisfenol A e a genisteína: efeitos sobre a morfogênese e susceptibilidade a carcinogênese prostática em ratos Sprague-Dawley (Bruna Dias Bernardo, Bolsa CAPES).

Grupo 1: foi exposto via oral (gavage) ao DMSO (25ug/kg p.c.) do DG 10 até o DG 21 e recebeu água e ração ad libitum (do DG 0 ao DPN 21). No dia DPN 21 parte da ninhada de fêmeas da geração F1 foi sacrificada para avaliação dos parâmetros já descritos (Fase I) e a outra parte da ninhada de fêmeas da geração F1 recebeu tratamento com dose única i.v. de MNU (50mg/kg) ou dose única i.v. de NaCl (veículo de diluição MNU) no DPN 51 e ração basal do DNP 21 até o final do experimento (25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl), quando foi sacrificada para a avaliação dos parâmetros da Fase II.

Grupo 2A: foi exposto ao BPA, via oral (gavage) na concentração de 25 ug/kg p.c do DG 10 até o DG 21 e recebeu água e ração basal *ad libitum* (do DG0 ao DPN 21. No dia DPN 21 parte da ninhada de fêmeas da geração F1 foi sacrificada para avaliação dos parâmetros já descritos (Fase I) e a outra parte da ninhada de fêmeas da geração F1 recebeu tratamento com dose única i.v. de MNU (50mg/kg) ou dose única i.v. de NaCl (veículo de diluição MNU) no DPN 51 e ração basal do DNP 21 até o final do experimento (25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl), quando foi sacrificada para a avaliação dos parâmetros da Fase II.

Grupo 2B: foi exposto ao BPA, via oral (gavage) na concentração de 250 ug/kg p.c. do DG 10 até o DG 21 e recebeu água e ração basal *ad libitum* (do DG0 ao DPN 21. No dia DPN 21 parte da ninhada de fêmeas da geração F1 foi sacrificada para avaliação dos parâmetros já descritos (Fase I) e a outra parte da ninhada de fêmeas da geração F1 recebeu tratamento com dose única i.v. de MNU (50mg/kg) ou dose única i.v. de NaCl (veículo de diluição MNU) no DPN 51 e ração basal do DNP 21 até o final do experimento (25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl), quando foi sacrificada para a avaliação dos parâmetros da Fase II.

Grupo 3A: foi exposto ao BPA, via oral (gavage) na concentração de 25 ug/kg p.c do DG 10 até o DG 21 e recebeu água e ração basal acrescida de genisteína (250mg/kg) *ad libitum* (do DG0 ao DPN 21. No dia DPN 21 parte da ninhada de fêmeas da geração F1 foi sacrificada para avaliação

dos parâmetros já descritos (Fase I) e a outra parte da ninhada de fêmeas da geração F1 recebeu tratamento com dose única i.v. de MNU (50mg/kg) ou dose única i.v. de NaCl (veículo de diluição MNU) no DPN 51 e ração basal do DNP 21 até o final do experimento (25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl), quando foi sacrificada para a avaliação dos parâmetros da Fase II.

Grupo 3B: foi exposto ao BPA, via oral (gavage) na concentração de 250 ug/kg p.c. do DG 10 até o DG 21 e recebeu água e ração basal acrescida de genisteína (250mg/kg) *ad libitum* (do DG0 ao DPN 21. No dia DPN 21 parte da ninhada de fêmeas da geração F1 foi sacrificada para avaliação dos parâmetros já descritos (Fase I) e a outra parte da ninhada de fêmeas da geração F1 recebeu tratamento com dose única i.v. de MNU (50mg/kg) ou dose única i.v. de NaCl (veículo de diluição MNU) no DPN 51 e ração basal do DNP 21 até o final do experimento (25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl), quando foi sacrificada para a avaliação dos parâmetros da Fase II.

Grupo 4A: foi exposto ao BPA, via oral (gavage) na concentração de 25 ug/kg p.c do DG 10 até o DG 21 e recebeu água e ração acrescida de indol-3-carbinol (2000mg/kg) *ad libitum* (do DG0 ao DPN 21. No dia DPN 21 parte da ninhada de fêmeas da geração F1 foi sacrificada para avaliação dos parâmetros já descritos (Fase I) e a outra parte da ninhada de fêmeas da geração F1 recebeu tratamento com dose única i.v. de MNU (50mg/kg) ou dose única i.v. de NaCl (veículo de diluição MNU) no DPN 51 e ração basal do DNP 21 até o final do experimento (25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl), quando foi sacrificada para a avaliação dos parâmetros da Fase II.

Grupo 4B: foi exposto ao BPA, via oral (gavage) na concentração de 250 ug/kg p.c. do DG 10 até o DG 21 e recebeu água e ração basal acrescida de indol-3-carbinol (2000mg/kg) *ad libitum* (do DG0 ao DPN 21. No dia DPN 21 parte da ninhada de fêmeas da geração F1 foi sacrificada para avaliação dos parâmetros já descritos (Fase I) e a outra parte da ninhada de fêmeas da geração F1 recebeu tratamento com dose única i.v. de MNU (50mg/kg) ou dose única i.v. de NaCl (veículo de diluição MNU) no DPN 51 e ração basal do DNP 21 até o final do experimento (25ª semana após a aplicação de MNU ou de NaCl), quando foi sacrificada para a avaliação dos parâmetros da Fase II.

6. Resultados

6.1.1 – Dados de biotério de mães e prole de fêmeas SD

Os dados das mães (gestação) e da prole de fêmeas (lactação) estão apresentados na Tabela 2 Os tratamentos com bisfenol A (BPA), e genisteína (GEN) e indol-3 carbinol (I3C) foram bem tolerados pelas mães durante a fase gestacional, sem toxicidade sistêmica evidente. Os tratamentos com BPA isoladamente, e em associação com a genisteína e com o I3C não alteraram a duração da gestação, o tamanho médio da ninhada ao nascimento ou a proporção entre o nascimento de machos e fêmeas.

Houve aumento significativo ($p<0,001$) no peso corpóreo médio (DG 20) das mães do grupo tratado com GEN e BPA 25 μg/kg p.c. (3A) em comparação com o grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c**.** (2A)**.** O ganho de peso corpóreo no período DG 0 ao DG 20 do grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c. (2B) foi significativamente ($p=0,021$) maior quando comparado com o grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A). Não houve diferença entre os demais grupos experimentais.

Em relação ao peso corpóreo da prole de fêmeas no DPN 03, o grupo tratado com GEN e BPA 25 μg/kg p.c. (3A) apresentou aumento significativo ($p<0,001$ e $p=0,028$) de peso corpóreo quando comparado com o grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c**.** (2A). No PND 10, o grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c**.** (2A) apresentou aumento significativo ($p<0,001$) de peso corpóreo quando comparado ao grupo controle (1) e ao grupo tratado com tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c**.** (2B). Além disso, o peso da prole no PND 10 foi significativamente ($p<0,001$) maior no grupo tratado com GEN e BPA 25 μg/kg p.c. (3A) em comparação com o grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c**.** (2A). Por fim, foi observado aumento significativo ($p<0,001$) no peso corpóreo do grupo tratado com GEN e BPA 250 μg/kg p.c. (3B) em comparação com o grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c**.** (2B). No PND 21, o grupo tratado com I3C e BPA 25 μg/kg p.c. (4A) apresentou peso corpóreo significativamente maior ($p=0,003$) em comparação como grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A). No PDN 51, o grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A) apresentou redução significativa ($p=0,004$) no peso corpóreo em comparação com o grupo controle (1).

6.1.2 – Dados do primeiro sacrifício em 21 PND

Os dados de peso final e peso relativo de ovários e útero da prole de fêmeas no DPN 21 estão apresentados na Tabela 3. O grupo tratado com I3C e BPA 25 μg/kg p.c. (4A) apresentou peso corpóreo significativamente ($p<0,001$) maior em comparação como grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A).

O peso relativo do ovário direito dos grupos tratados com I3C e BPA 25 μg/kg p.c. (4A) e I3C e BPA 250 μg/kg p.c (4B) foi significativamente ($p<0,001$ em ambos) maior em comparação como os grupos tratados somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A) e BPA 250 μg/kg p.c. (2B), respectivamente. Em relação ao peso relativo de ovário esquerdo, o grupo tratado com I3C e BPA 250 μg/kg p.c. (4B) apresentou redução significativa ($p=0,002$) em comparação como grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c. (2B). Em relação ao útero, o grupo tratado com I3C e BPA 25 μg/kg p.c. (4A) apresentou aumento significativo ($p=0,006$) em comparação como grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A).

6.1.3 – Dados do segundo sacrífício, 25 semanas após a iniciação ou não com MNU

No momento do sacrificio foram registradas alterações macroscópicas no sistema reprodutor feminino classificadas incialmente como edema, dilatações císticas e massas tumorais na tuba uterina, útero e ovários (Prancha 3). Essas alterações foram analisadas microscopicamente para melhor diagnóstico e interpretação dos resultados da macroscopia (ver abaixo).

Os dados de peso corpóreo, ganho de peso e peso relativo de ovários e útero da prole inciada e não iniciada com a MNU ao final do experimento estão apresentados nas Tabelas 4 e 4.1, respectivamente. Nos grupos iniciados com a MNU (Tabela 3), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros de peso corpóreo final e ganho de peso corpóreo.

O grupo tratado com I3C e BPA 250 μg/kg p.c. (Grupo 4B) apresentou aumento significativo ($p<0,001$ para os três parâmetros) no peso de ambos os ovários e útero em comparação como grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c. (2B). Na Tabela 4.1 apresentamos os dados dos grupos não iniciados. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao peso corpóreo final, ganho de peso e peso relativo de ambos os ovários e útero entre os grupos experimentais.

Tabela 2. Dados da gestação e da prole sacrificada ao 21 DPN nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos[1]						
	1	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Mães							
Número de animais	10	13	11	8	12	12	16
Duração da gestação (dias)	22.08 ± 0.29	21.79 ± 0.43	21.92 ± 029	22.08 ± 0.29	21.83 ± 0.39	22.00± 0.00	21.79 ± 0.42
Tamanho da ninhada	10.00 ± 4.41	11.21 ± 2.83	11.25 ± 3.22	9.33 ± 2.96	10.42 ± 2.81	10.00 ± 3.78	10.00 ± 3.16
Proporção de sexo da ninhada (F:M)	0.86 ± 0.41	1.11 ± 1.44	0.97 ± 0.58	1.92 ± 1.14	1.72 ± 1.83	1.00 ± 0.84	0.84 ± 0.70
Peso corpóreo médio (g) no 20 DG	376.40 ± 32.82	367.31 ± 19.89	391.10 ± 23.23	423.13 ± 31.20 b	382.55 ± 30.71	375.75 ± 22.30	395.38 ± 22.76
Ganho de peso corpóreo (g)[2]	127.70 ± 22.46	113.00 ± 19.32	134.40 ± 12.16 b	133.56 ± 21.01	122.60 ± 17.86	122.83 ± 11.11	119.19 ± 19.24
Consumo de ração (mg/rato/dia)[2]	63.94 ± 31.22	64.54 ± 25.63	64.08 ± 26.72	69.41 ± 34.91	60.45 ± 29.37	66.05 ± 21.55	69.08 ± 24.27
Consumo genisteína/I3C (mg/rato/dia)[2]	-	-	-	5.78	5.16	44.03	46.05
Prole de Fêmeas							
Peso corpóreo (g)							
DPN 03	8.02 ± 0.71	8.01 ± 0.61	8.26 ± 0.68	8.55 ± 1.01 b	8.57 ± 1.32	8.09 ± 0.72	7.93 ± 0.86
DPN 10	19.52 ± 1.42	19.99 ± 1.12 ac	21.06 ± 1.80	23.47 ± 4.11 b	21.65 ± 2.14 c	22.04 ± 1.00	20.47 ± 3.35
DPN 21	48.55 ± 4.21	47.32 ± 4.48	48.90 ± 5.37	47.18 ± 4.59	46.17 ± 3.81	49.41 ± 5.84 b	43.08 ± 5.25
DPN 51	200.39 ± 14.45	191.13 ± 11.43 a	190.67 ± 14.59	188.13 ± 14.52	190.71 ± 13.02	190.33 ± 14.99	191.89 ± 11.50

Os valores expressos na tabela correspondem à Média ± Desvio Padrão. [1](1) Controle, (2A) BPA 25 µg/kg p.c., (2B) BPA 250 µg/kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 µg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 µg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 µg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 µg/kg p.c. [2]Do 0 DG até 20 DG. ~~a~~": Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). ~~b~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). ~~c~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 µg/ kg p.c. ($p<0,05$)

Tabela 3. Peso corpóreo final e pesos relativos de útero e ovários da prole sacrificada ao 21 DPN.

Grupo/Tratamento[1]	N	Peso final (g)	Peso Relativo (%)		
			Ovário D.	Ovário E.	Útero
Controle (1)	20	48.55 ± 4.21	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.10 ± 0.04
BPA 25 µg/kg (2A)	25	47.32 ± 4.48	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.03
BPA 250 µg/kg (2B)	21	48.90 ± 5.37	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.04
GEN + BPA 25 µg/kg (3A)	21	47.18 ± 4.59	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.14 ± 0.11
GEN + BPA 250 µg/kg (3B)	18	46.17 ± 3.81	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.09
I3C + BPA 25 µg/kg (4A)	22	49.41 ± 5.84 b	0.03 ± 0.01 b	0.03 ± 0.00	0.14 ± 0.03 b
I3C + BPA 250 µg/kg (4B)	24	43.08 ± 5.25	0.03 ± 0.01 c	0.02 ± 0.01 c	0.12 ± 0.07

Os valores expressos na tabela correspondem à Média ± Desvio Padrão. [1](1) Controle, (2A) BPA 25 µg/kg p.c., (2B) BPA 250 µg/ kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 µg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 µg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 µg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 µg/kg p.c.. ~~a~~": Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). ~~b~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). ~~c~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). D: direito, E: esquerdo.

Tabela 4. Peso corpóreo final e pesos relativos de útero e ovários da prole iniciada ao final do experimento.

Grupo/Tratamento[1]	N	Peso final (g)	Ganho de peso	Peso Relativo (%)		
				Ovário D.	Ovário E.	Útero
Iniciados						
Controle (1)	13	341.85 ± 38.80	140.15 ± 34.84	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.22 ± 0.09
BPA 25 µg/kg (2A)	12	329.83 ± 31.94	134.75 ± 29.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.21 ± 0.08
BPA 250 µg/kg (2B)	12	327.75 ± 37.48	139.25 ± 42.56	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.22 ± 0.07
GEN + BPA 25 µg/kg (3A)	12	312.08 ± 28.26	129.67 ± 23.52	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.30 ± 0.14
GEN + BPA 250 µg/kg (3B)	12	314.75 ± 27.44	123.92 ± 24.22	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.29 ± 0.15
I3C + BPA 25 µg/kg (4A)	12	317.25 ± 39.92	125.33 ± 47.83	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.20 ± 0.10
I3C + BPA 250 µg/kg (4B)	12	286.83 ± 43.97	108.45 ± 13.32	0.04 ± 0.03 c	0.04 ± 0.03 c	0.33 ± 0.10 c

Os valores expressos na tabela correspondem à Média ± Desvio Padrão. [1](1) Controle, (2A) BPA 25 µg/kg p.c., (2B) BPA 250 µg/ kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 µg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 µg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 µg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 µg/kg p.c.. ~~a~~": Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). ~~b~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). ~~c~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). D: direito, E: esquerdo.

Tabela 4.1. Peso corpóreo e pesos relativos de útero e ovários da prole não-iniciada ao final do experimento.

Grupo/Tratamento[1]	N	Peso final (g)	Ganho de peso	Peso Relativo (%)		
				Ovário D.	Ovário E.	Útero
Não-Iniciados						
Controle (1)	10	348.20 ± 39.62	149.50 ± 36.17	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.27 ± 0.13
BPA 25 µg/kg (2A)	12	323.33 ± 30.82	136.17 ± 32.39	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.21 ± 0.07
BPA 250 µg/kg (2B)	12	340.83 ± 31.97	148.00 ± 35.76	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.21 ± 0.09
GEN + BPA 25 µg/kg (3A)	12	345.75 ± 37.75	151.92 ± 34.10	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.05
GEN + BPA 250 µg/kg (3B)	12	329.42 ± 30.60	138.83 ± 32.42	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.04
I3C + BPA 25 µg/kg (4A)	12	335.67 ± 30.53	146.92 ± 31.83	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.11	0.21 ± 0.09
I3C + BPA 250 µg/kg (4B)	12	321.19 ± 32.59	127.94 ± 26.70	0.04 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.20 ± 0.04

Os valores expressos na tabela correspondem à Média ± Desvio Padrão. [1](1) Controle, (2A) BPA 25 µg/kg p.c., (2B) BPA 250 µg/ kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 µg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 µg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 µg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 µg/kg p.c.. ~~a~~": Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). ~~b~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). ~~c~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). D: direito, E: esquerdo.

6.2– Contagem Folicular

A Tabela 5 indica os valores de média e desvio padrão da contagem de folículos primordiais, primários, pré-antrais, antrais, de Graaf e atrésicos (em nº de folículos/área ovariana), além do cálculo do total de folículos e o total dividido pela área ovariana dos animais sacrificados ao 21 PND (Fase I).

6.3 - Alterações Histológicas

Durante a contagem folicular nos roedores, foi observada a presença de folículos contendo mais de um óocito (MOFs, Multioocyte Folicles, do inglês) (Figura) em dois animais tratados com BPA 25 µg/kg p.c. (2A), e em um animal tratado com GEN e BPA 25 µg/kg p.c. (3A), com não sendo observados nos demais grupos. Nesses animais, os MOFs continham 2 óocitos dividindo a mesma estrutura folicular (Figura 8).

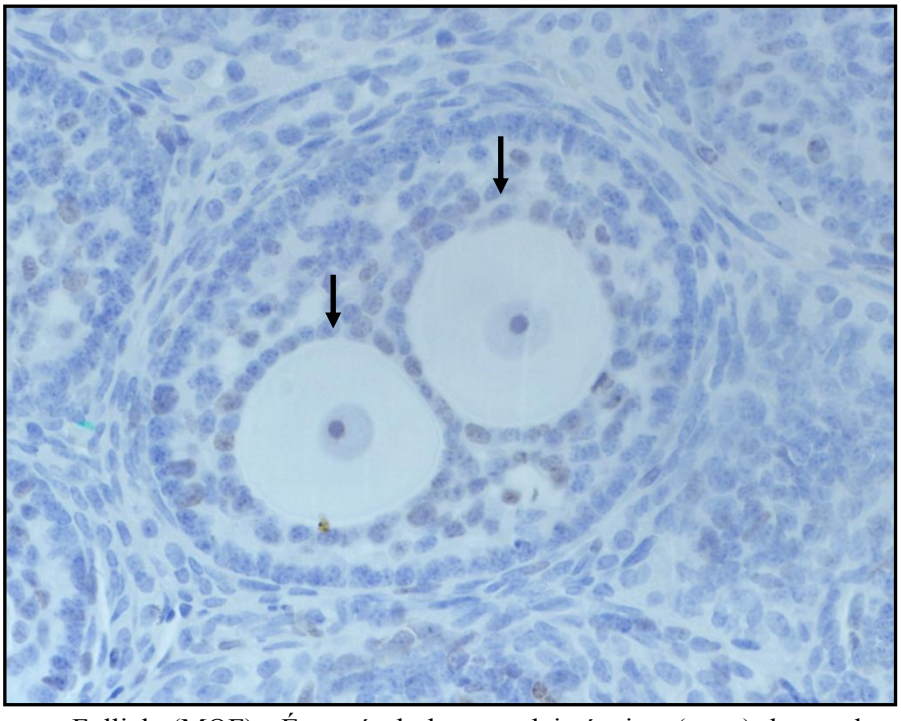


Figura 8. Multioocyte Follicle (MOF). É possível observar dois óocitos (setas) dentro do mesmo folículo. Aumento 100x

6.3.1 – Tipos de Folículo

Na contagem de folículos primordiais e primários, observou-se aumento significativo (p=0,009 e p=0,011) no grupo tratado com GEN e BPA 25 µg/kg p.c. (3A) em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A). Tanto nos folículos antrais quanto nos atrésicos foi observado aumento significativo (p=0,035 e p=0,008) no grupo tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B), e nos folículos de

Graaf, aumento significativo (p=0,015) no grupo tratado com I3C e BPA 25 µg/kg p.c. (4A) em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A). Não houve diferença significativa entre os grupos na contagem de folículos Pré-Antrais.

6.3.2 - Folículos totais e folículos totais/área

Na contagem folículos ovarianos totais observou-se aumento significativo (p=0,006) no grupo tratado com GEN e BPA 25 µg/ kg p.c. (3A) em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) e aumento significativo (p=0,005) no grupo que recebeu I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) foi observado em relação ao grupo que recebeu somente e BPA 250 µg/kg p.c. (2B). Em relação ao número de folículos totais /área ovariana, foi possível observar aumento significativo (p<0,001) no grupo tratado com GEN e BPA 25 µg/kg p.c. (3A) em relação ao grupo que recebeu somente e BPA 25 µg/kg p.c. (2A). Além disso, um aumento significativo (p=0,001) no número de folículos totais /área ovariana no grupo que recebeu I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) foi observado em relação ao grupo que recebeu somente e BPA 250 µg/kg p.c. (2B).

6.4 - Morfometria

As Tabelas 5 e 6 indicam os valores dos parâmetros morfométricos de útero e tubas uterinas, compreendendo medidas de comprimento (em µm) de epitélio luminal, epitélio glandular, lâmina basal, miométrio interno, miométrio externo e lúmen de útero, epitélio, camada muscular e serosa de tuba uterina. Além de medidas de área absoluta (em mm²) e relativa (em %) de endométrio, miométrio interno, miométrio externo, lúmen glandular de útero, avaliadas nos animais sacrificados ao 21 PND (Fase I).

6.4.1 – Útero

Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação a altura do epitélio luminal e comprimento do epitélio glandular e lâmina própria. Já em relação às medidas de miométrio interno, foi observado aumento significativo (p=0,033) na espessura no grupo tratado com I3C e BPA 25 µg/kg p.c.(4A) em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A), além de aumento significativo (p=0,03) no grupo tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B) (Figura 10). Na espesura do miométrio externo, observou-se aumento significativo (p=0,042) no grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B) em relação ao grupo controle (1). Por fim, nas medidas do diâmetro do lúmen uterino, foi observado aumento significativo (p=0,012) no grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) em relação ao controle (1) (Figura 9).

6.4.2 –Tuba Uterina

Em relação às análises do istmo da tuba uterina, foi observada diminuição significativa (p=0,015) na altura do epitélio luminal do grupo tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B). Em relação as medidas de camada muscular, foi observada diminuição significativa (p=0,024) em sua espesura no grupo tratado com GEN e BPA 25 µg/kg p.c. (3A) em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A). Não foi observada diferença significativa entre os grupos nas medidas de espessura de serosa no istmo. Nas medidas feitas na parte da ampola das tubas uterinas foi observada diminuição significativa (p=0,011 e p<0,001) na altura das células do epitélio luminal dos grupos tratados com GEN e BPA 250 µg/kg p.c. (3B) e I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B). Não foi observada diferença significativa entre os grupos nas medidas de espessura de camada muscular na ampola.Por fim, nas medidas de espessura da serosa da ampola foi observada uma diminuição significativa (p=0,015) no grupo tratado com GEN e BPA 250 µg/kg p.c. (3B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B).

6.4.3 – Área Absoluta

Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação à área absoluta do lúmen uterino e de vasos sanguíneos (dados não mostrados). No entanto, nas medidas de área absoluta total do útero, foi observado aumento significativo (p=0,008) no grupo tratado com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) em relação ao controle (1) (Figura 9). Também foi observado aumento significativo (p=0,007) na área absoluta total no grupo tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B) (Figura 10). No endométrio foi observado aumento significativo (p=0,022) da área absoluta total no grupo tratado com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) em relação ao controle (1) (Figura 9). No miométrio interno observou-se aumento significativo (p=0,009) na área absoluta total no grupo tratado com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) em relação ao controle (1) (Figura 9) Além dissso, foi observado aumento significativo (p<0,001) na área total absoluta do miométrio interno no grupo tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B) (Figura 10). Por fim, nas medidas de miométrio externo, foi observado aumento significativo (p=0,004) na área absoluta total nos grupos tratados com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) em relação ao controle (1) (Figura 9). Além disso, também foi observado aumento significativo (p =0,002) do grupo tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B) (Figura 10).

6.4.4 – Área Relativa

Não se observou diferença significativa entre os grupos em relação à área relativa de endométrio, perimétrio e lúmen uterino e vasos Sanguíneos (dados não mostrados). No entanto, no miométrio interno foi possível observar aumento significativo (p=0,019) da área relativa (%) no grupo tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B) (Figura 10)

Obs.: No grupo tratado somente com com BPA 25 µg/kg p.c. (2A), foram observadas maiores diferenças morfométricas em relação ao controle (1) e em menor proporção ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B), 5 itens (comprimento lúmen, área absoluta de endométrio, m. interno, m.externo e área total) contra 1 item (comprimento de m. externo).

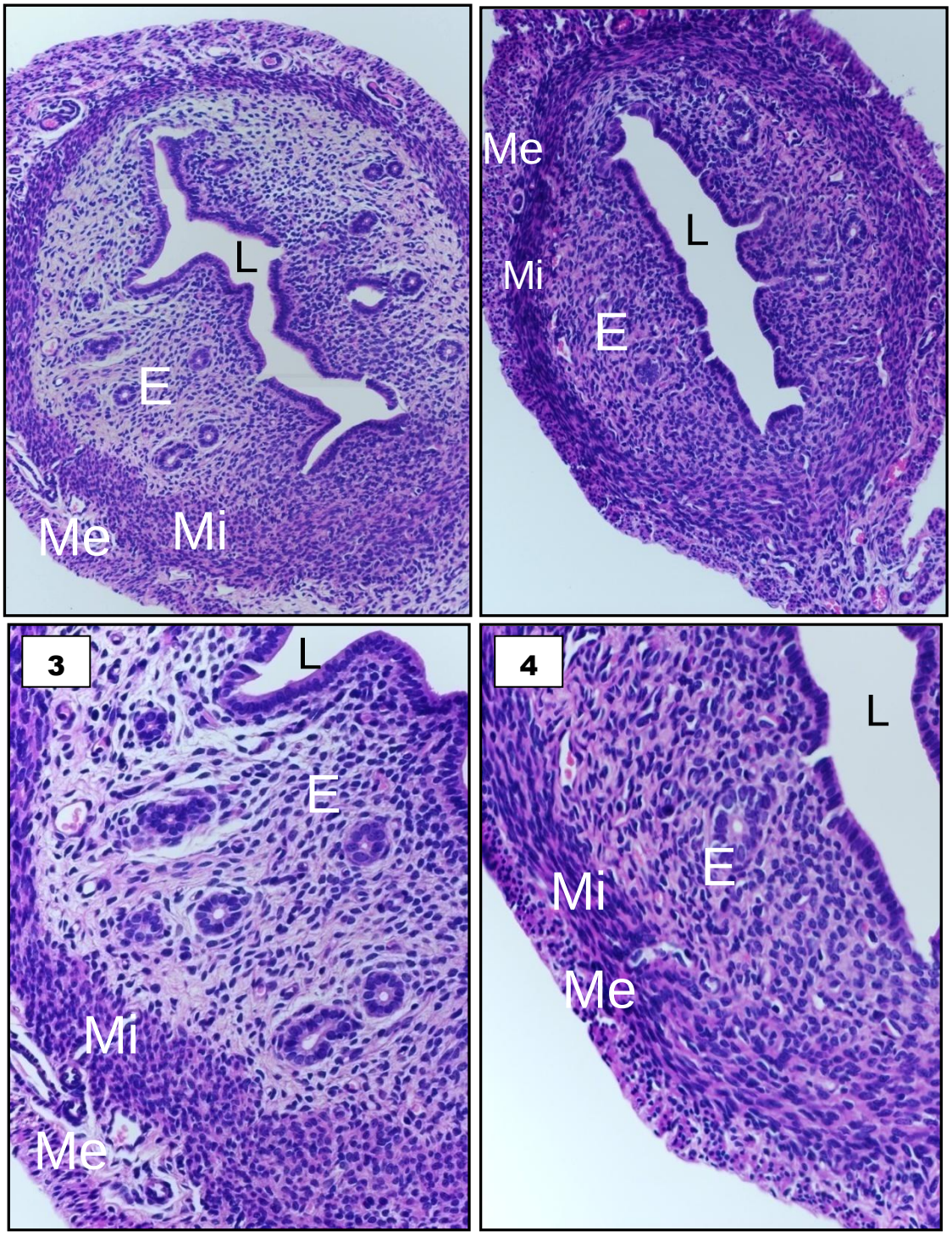


Figura 9. Fotomicrografias do corno uterino dos animais sacrificados no 21 DPN (HE). **(1)** Corno uterino de animal tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (A). Aumento 20x**. (2)** Corno uterino de animal do grupo controle (1). Aumento 20x. **(3)** Detalhe do corno uterino de animal tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A). Aumento 40x. **(4)** Corno uterino de animal do grupo controle (1). Aumento 40x. L: Lúmen Uterino, E: Endométrio, Mi: Miométrio Interno, Me: Miométrio Externo. Foi possível observar diferenças entre tais grupos nos seguintes parâmetros: Área total uterina, áreas absolutas de endométrio, miométrio interno e externo e comprimento de lúmen uterino.

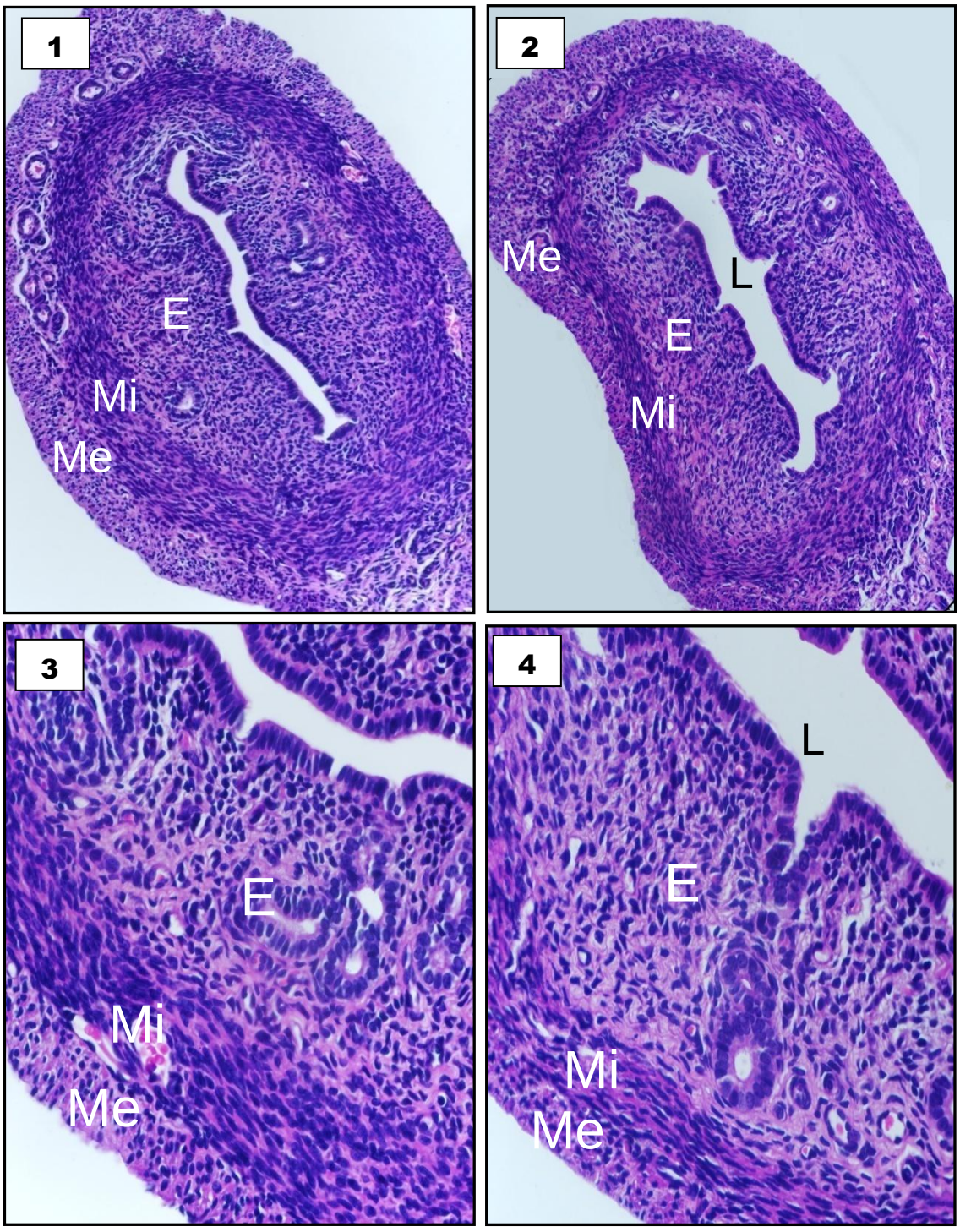


Figura 10. Fotomicrografias do corno uterino dos animais sacrificados no 21 DPN (HE). **(1)** Corno uterino de animal tratado com I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B). Aumento 20x**. (2)** Corno uterino de animal do grupo tratado somente com BPA 250 µg/ kg p.c.(2B). . Aumento 20x. **(3)** Detalhe do corno uterino de animal tratado com I3C e BPA 250 µg/ kg p.c. (4B). Aumento 40x. **(4)** Corno uterino de animal somente com BPA 250 µg/kg p.c. (2B). Aumento 40x. L: Lúmen Uterino, E: Endométrio, Mi: Miométrio Interno, M: Miométrio Externo. Foi possível observar diferenças entre tais grupos nos seguintes parâmetros: Área total uterina, comprimento, área absoluta e relativa de miométrio interno e área absoluta de miométrio

Tabela 5. Contagem folicular e morfometria uterina dos animais sacrificados no DPN 21.

Parâmetros[1]	Grupos[2]						
	1	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Ovário							
Primodial	1,43 ± 0,59	1,26 ± 0,48	1,58 ± 1,19	4,27 ± 1,31 b	2,29 ± 1,01	2,36 ± 1,29	2,43 ± 1,08
Primário	0,81 ± 0,35	0,61 ± 0,54	1,08 ± 0,64	2,24 ± 1,16 b	1,87 ± 1,44	1,18 ± 1,17	2,53 ± 1,46
Pré-Antral	3,78 ± 0,98	4,89 ± 2,22	2,89 ± 0,94	6,02 ± 3,12	5,93 ± 2,70	4,05 ± 3,69	3,89 ± 1,67
Antral	2,81 ± 0,61	2,81 ± 0,94	2,51 ± 0,78	3,30 ± 1,14	4,69 ± 2,13	3,95 ± 1,53	5,41 ± 2,77 c
Graaf	0,31 ± 0,06	0,15 ± 0,10	0,35 ± 0,14	0,29 ± 0,27	0,24 ± 0,11	0,31 ± 0,09 b	0,35 ± 0,16
Atrésico	3,26 ± 1,02	2,40 ± 0,78	2,27 ± 0,74	4,23 ± 1,27	3,49 ± 0,95	2,58 ± 0,63	4,30 ± 0,70 c
Total/Área	12,39 ± 1,21	12,11 ± 2,27	10,69 ± 0,82	20,35 ± 3,37 b	18,51 ± 3,43	14,43 ± 4,49	18,92 ± 3,09 c
Total	49,90 ± 5,31	46,80 ± 3,74	38,50 ± 11,18	61,00 ± 7,62 b	52,30 ± 15,52	58,00 ± 15,71	62,90 ± 11,62 c
Corno uterino Comprimento							
E. Luminal	11,10 ± 1,19	10,82 ± 0,91	10,93 ± 1,02	11,34 ±1,37	11,26 ± 2,72	12,89 ± 2,31	11,61 ± 1,08
E. Glandular	11,22 ± 1,40	11,58 ± 1,34	11,47 ± 0,92	11,75 ± 1,41	12,00 ± 3,02	12,75 ± 2,91	12,23 ± 1,43
L. Própria	83,46 ± 14,25	98,66 ± 16,65	78,37 ± 16,64	100,01 ± 14,35	90,61 ± 14,97	102,75 ± 19,56	89,01 ± 13,76
M. Interno	29,92 ± 7,95	33,15 ± 3,04	36,99 ± 6,79	38,19 ± 3,96	49,17 ± 8,45	47,39 ± 10,4 b	51,04 ± 7,74 c
M. Externo	24,52 ± 7,89	33,13 ± 4,61	36,59 ± 7,66 a	36,34 ± 4,39	40,71 ± 9,07	37,07 ± 7,76	35,75 ± 8,57
Lúmen	150,25 ± 28,20	223,73 ± 32,40 a	191,37 ± 38,66	210,78 ± 34,67	203,28 ± 29,80	198,23 ± 29,75	213,48 ± 28,46
Corno uterino Área Absoluta							
Total	0,20 ± 0,02	0,28 ± 0,03 a	0,23 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,32 ± 0,07	0,34 ± 0,07 c
Endométrio	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,02 a	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,03
M. Interno	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01 a	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02 c
M. Externo	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01 a	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,01 c
Lúmen	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Corno uterino Área Relativa							
Endométrio	39,10 ± 3,25	38,73 ± 2,87	38,32 ± 1,40	40,70 ± 3,60	36,01 ± 4,32	40,31 ± 4,96	36,11 ± 2,71
M. Interno	24,19 ± 2,90	24,21 ± 1,93	23,64 ± 1,06	24,40 ± 1,64	27,29 ± 3,44	26,22 ± 4,11	27,89 ± 2,34 c
M. Externo	28,53 ± 2,76	29,91 ± 2,61	31,82 ± 2,60	29,72 ± 2,58	30,35 ± 3,48	31,09 ± 6,51	31,22 ± 2,29
Lúmen	8,24 ± 3,04	7,18 ± 2,17	6,28 ± 1,86	5,16 ± 1,25	6,82 ± 3,67	6,06 ± 2,85	4,75 ± 1,09

Os valores expressos na forma de média ± DP. [1]Parâmetros: contagem folicular (nº de folículos/área ovariana), comprimento (µm), área absoluta (mm²), área relativa (%) .[2]Grupos experimentais (n=5); (1) Controle, (2A) BPA 25 µg/kg p.c., (2B) BPA 250 µg/ kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 µg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 µg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 µg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 µg/kg p.c.. ~~a~~": Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). ~~b~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). ~~c~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 µg/ kg p.c. ($p<0,05$).

Tabela 6. Morfometria de tuba uterina dos animais sacrificados no DPN 21.

Parâmetros[1]	Grupos[2]						
	1	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Tuba Istmo Comprimento							
Epitélio	16,25 ± 2,42	15,47 ± 0,77	19,35 ± 3,47	14,71 ± 2,24	14,37 ± 1,85	14,94 ± 1,13	12,92 ± 2,48 c
Muscular	56,53 ± 7,89	67,75 ± 7,93	67,58 ± 3,64	38,85 ± 9,03 b	58,14 ± 4,16	61,36 ± 5,58	60,02 ± 6,41
Serosa	10,81 ± 2,68	11,76 ± 5,31	14,70 ± 4,78	14,48 ± 2,80	11,24 ± 1,19	11,37 ± 3,08	10,80 ± 1,83
Tuba Ampola Comprimento							
Epitélio	16,71 ± 2,70	16,91 ± 0,94	17,71 ± 1,89	16,89 ± 1,45	13,21 ± 2,81 c	15,19 ± 2,49	12,99 ± 1,27 c
Muscular	21,16 ± 4,66	14,99 ± 3,92	20,16 ± 3,00	17,36 ± 5,75	18,83 ± 1,81	15,03 ± 1,65	14,19 ± 1,71
Serosa	7,32 ± 1,47	8,75 ± 1,53	12,09 ± 0,74	7,87 ± 1,93	7,65 ± 1,51 c	7,59 ± 2,10	8,12 ± 3,64

Os valores expressos na forma de média ± DP. [1]Parâmetros: comprimento (μm).[2]Grupos experimentais (n=5); (1) Controle, (2A) BPA 25 μg/kg p.c., (2B) BPA 250 μg/ kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 μg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 μg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 μg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 μg/kg p.c.. –a": Diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05). –b": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 μg/ kg p.c. (p<0,05). –c": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 μg/ kg p.c. (p<0,05).

6.5– Análise Histológica: alterações histológicas e neoplasias

As pranchas representam de forma ilustrativa as alterações histológicas e neoplásicas encontradas nos animais sacrificados na 25ª semana após a iniciação com MNU ou não (Fase II). Entre as alterações, foram identificados cistos e linfoma nos ovários; hiperplasias epiteliais na tuba uterina; glândulas uterinas dilatadas (GUD), glândulas uterinas hiperplásicas (GUH), pólipos estromais (PE), lesões papilíferas (LP), focos inflamatórios, linfoma e carcinoma no útero. As Tabelas 7 e 8 representam a proporção de animais, iniciados e não iniciados, respectivamente, que apresentaram alterações histológicas seguida da porcentagem em parênteses.

6.5.1 – Incidência: iniciados e não-iniciados

No cálculo da incidência de alterações histológicas e neoplasias dos animais não iniciados (Tabela 7), foi observado aumento significativo (p=0,002) na incidência de lesões papilíferas nos útero dos animais do grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c. (2B) em relação ao grupo controle (1). Foi observada maior incidência de cistos ovarianos, GUD e inflamação no útero dos animais tratados com BPA 250 μg/kg p.c. (2B) em comparação com o grupo controle (Grupo 1), no entanto, tal diferença não foi significativa. Assim como maor incidência de GUH e de inflamação no útero de animais tratados com BPA 25 μg/kg p.c. (2A) em comparação com o grupo controle (Grupo 1), no entanto, tal diferença também não foi significativa.

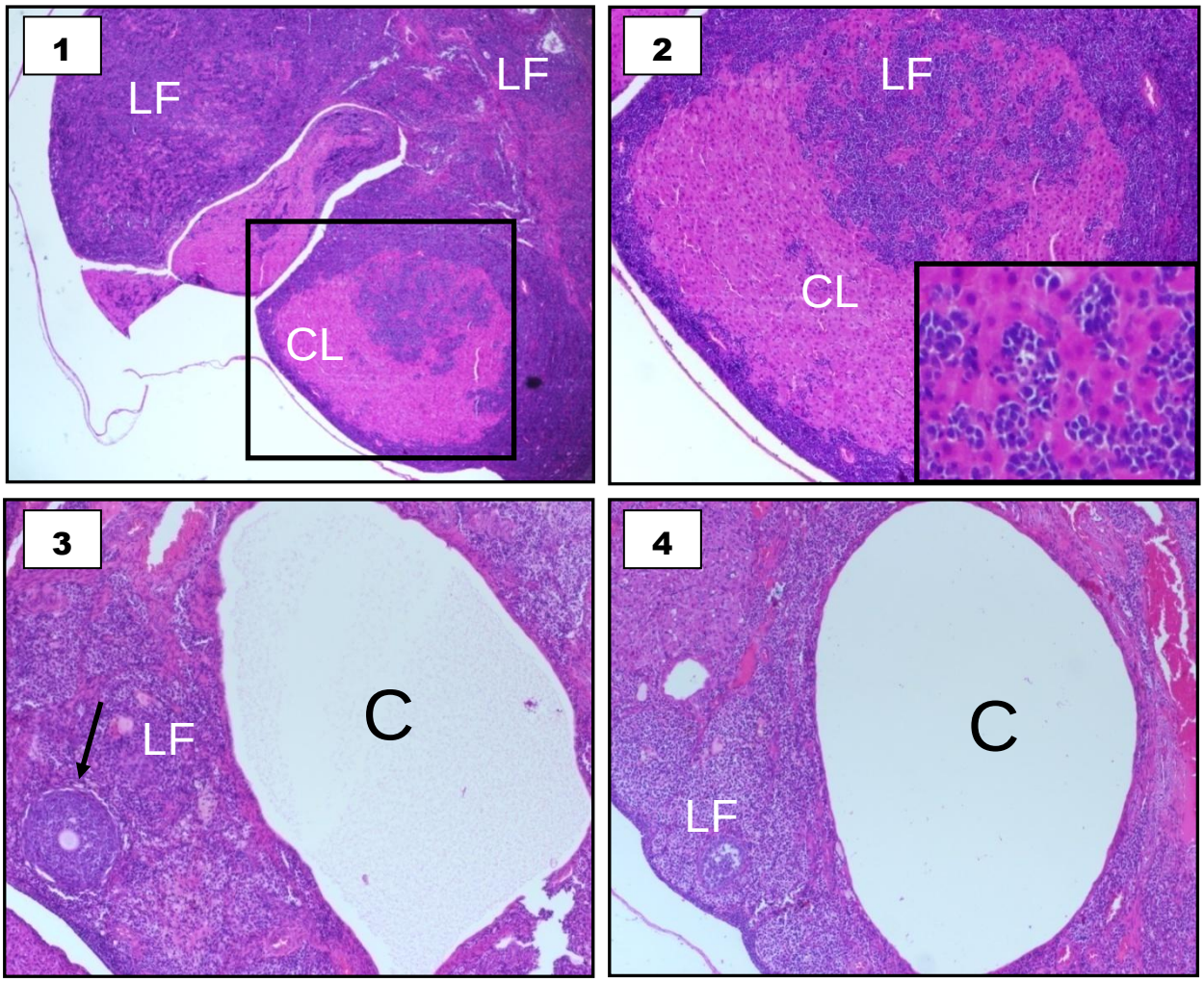
Além disso, foi observada redução significativa (p<0,001 e p=0,0054) na incidência de lesões papilíferas dos grupos tratados com GEN e BPA 250 μg/kg p.c. (3B) e I3C e BPA 250 μg/kg

p.c. (4B) em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg /kg p.c.(2B).

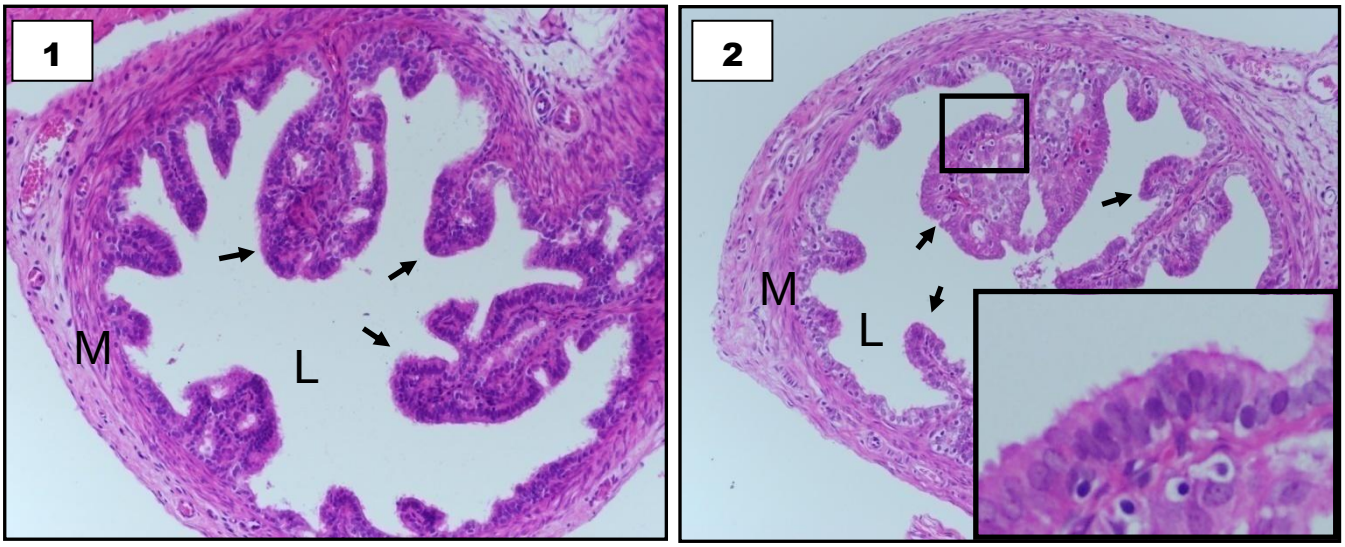
Nos grupos iniciados com a MNU (Tabela 8) foi possível observar redução significativa (p=0,003) na incidência de adenoarcinoma uterino no grupo tratado com I3C e BPA 25 µg/kg p.c. (4A) em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A). Foi observada maior incidência de cistos ovarianos no grupo BPA 250 µg/kg p.c. (2B) em relação ao controle (1) e maiores incidências de adenocarcinoma uterino, GUD e inflamação nos grupos tratados com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) e 250 µg/kg p.c. (2B) em relação ao grupo controle (1), no entanto essas diferenças não foram significativas.

6.5.2 – Incidência: susceptibilidade à carcinogênese pela MNU

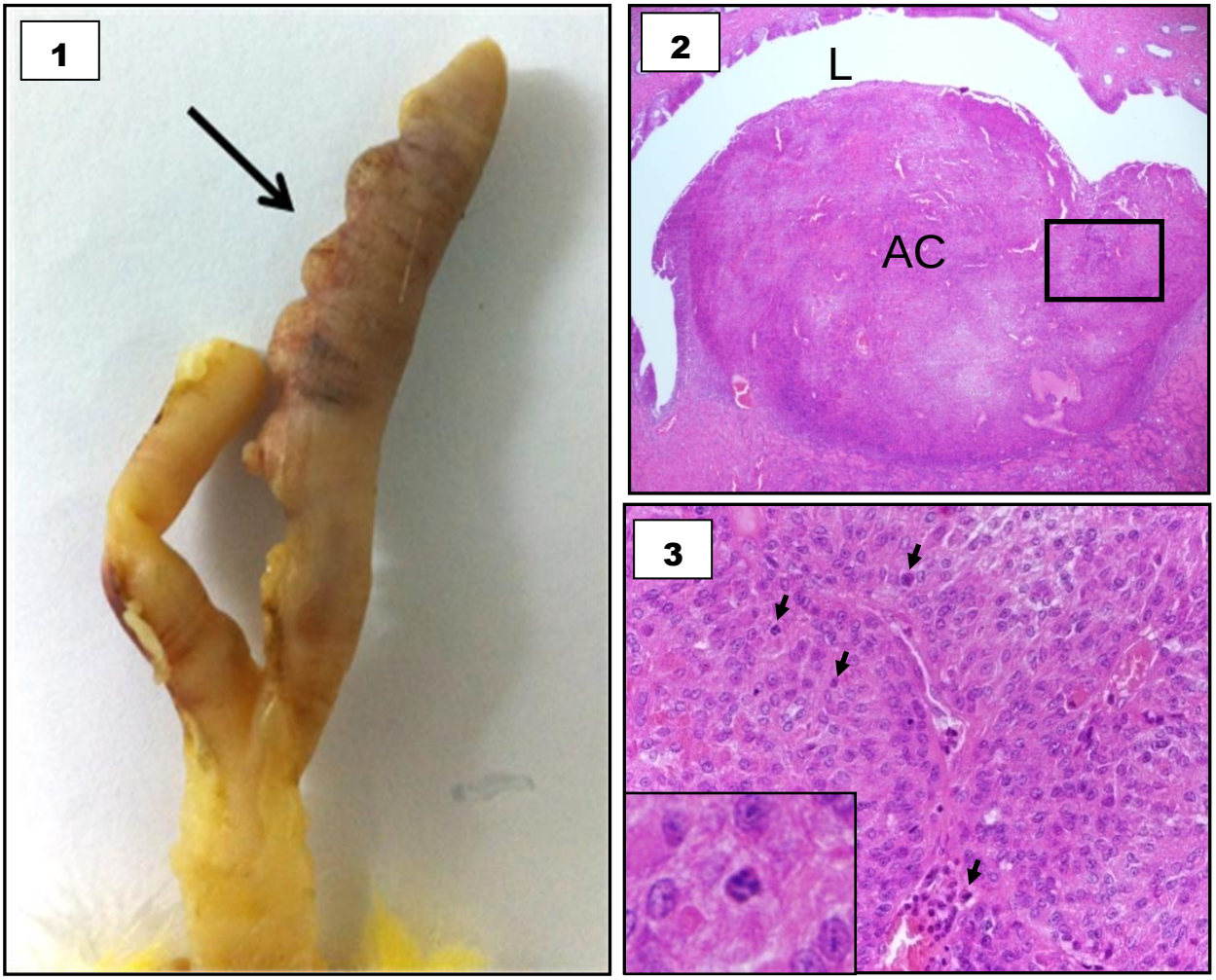
Foram comparadas as incidências de lesões histológicas e neoplasias no mesmo grupo, comparando animais iniciados com não iniciados, verificando-se a susceptibilidade a iniciação pela MNU. Assim, na incidência de adenocarcinoma no útero, foi observado aumento significativo (p<0,001) no grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) nos grupos iniciados em comparação com os não iniciados (5/12 (41,67) vs. 0/12 (0)). Não foi possível observar outras diferenças na incidência de lesões histológicas e neoplasias nos grupos iniciados em comparação aos não iniciados.



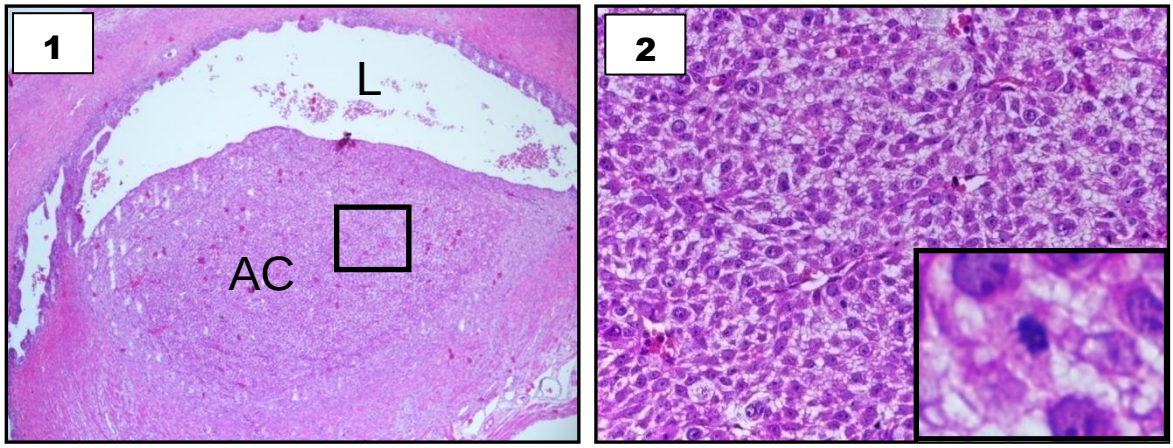
Prancha 1. Fotomicrografias das lesões histológicas encontradas nos ovários dos animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não (HE). **(1)** Ovário apresentando metástase de linfoma originado no baço. Pode-se notar o tecido linfoide (LF), de coloração mais basófila, ocupando parte do estroma ovariano. Aumento 10x. **(2)** Detalhe do corpo lúteo (CL) da figura (1), é possível observar as células luteínicas do corpo lúteo, de coloração mais acidófila. Além disso, pode ser notada infiltração de tecido linfoide (LF), mais basófilo, na parte superior da estrutura. No retângulo, detalhe das células metastáticas em meio as células luteínicas. Aumento 20x. **(3)** Cisto ovariano (C) no estroma ovariano, onde é possível observar um único folículo (seta) em meio a infiltração metastática de tecido linfoide (LF). Aumento 20x. **(4)** Cisto ovariano (C) no estroma uterino, que também apresenta infiltração de tecido linfoide metastático (LF). Aumento 20x.



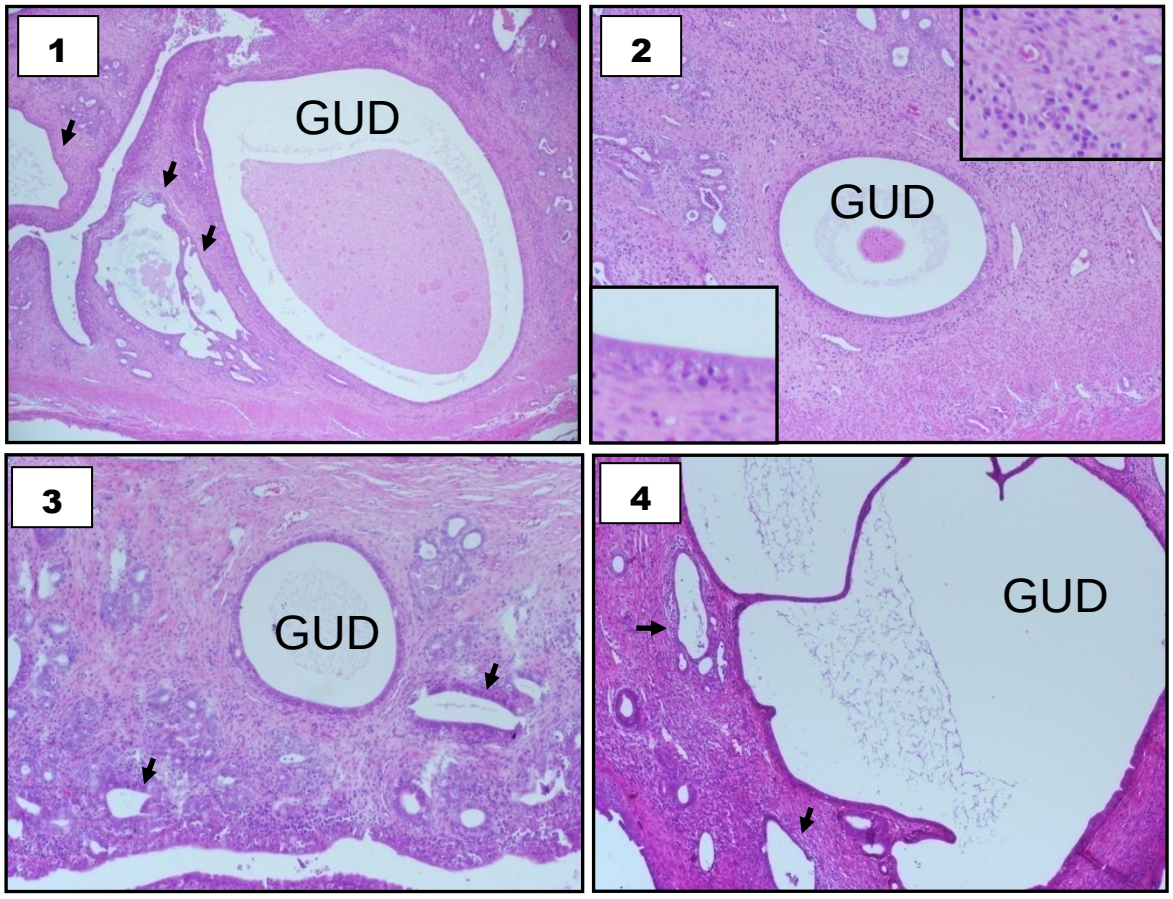
Prancha 2. Fotomicrografias das Lesões histológicas encontradas nas tubas uterinas dos animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não (HE). **(1) e (2)** Tuba uterina apresentando Hiperplasia epitelial, região de ampola. É possível observar aumento no número de células epiteliais das pregas da mucosa tubária (Setas) na figura 2 é possível observar o detalhe do epitélio hiperplásico tubário (retângulo). Aumento 20x. L: lúmen; M: camada muscular.



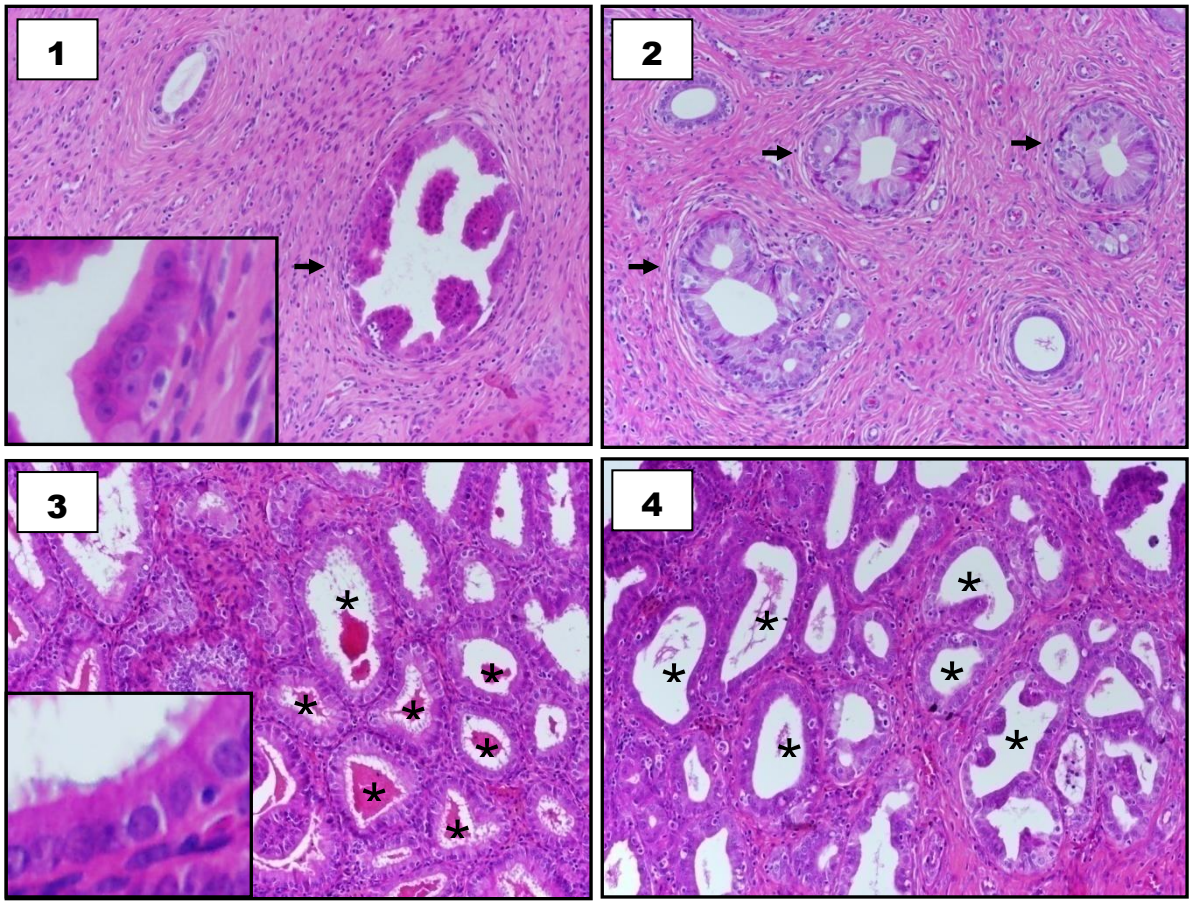
Prancha 3. Lesões uterinas dos animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não. **(1)** Massas macroscópicas observadas em corno uterino (seta). **(2)** Fotomicrografia da lesão macroscópica após processamento histológico classificada como adenocarcinoma de útero (AC)(HE). Aumento 10x**. (3)** Detalhe do adenocarcinoma uterino (retângulo fig.2) (HE). É possível observar algumas figuras mitóticas (setas e retângulo) na massa tumoral, atipia celular, além de desorganização do tecido uterino. Aumento 40x.



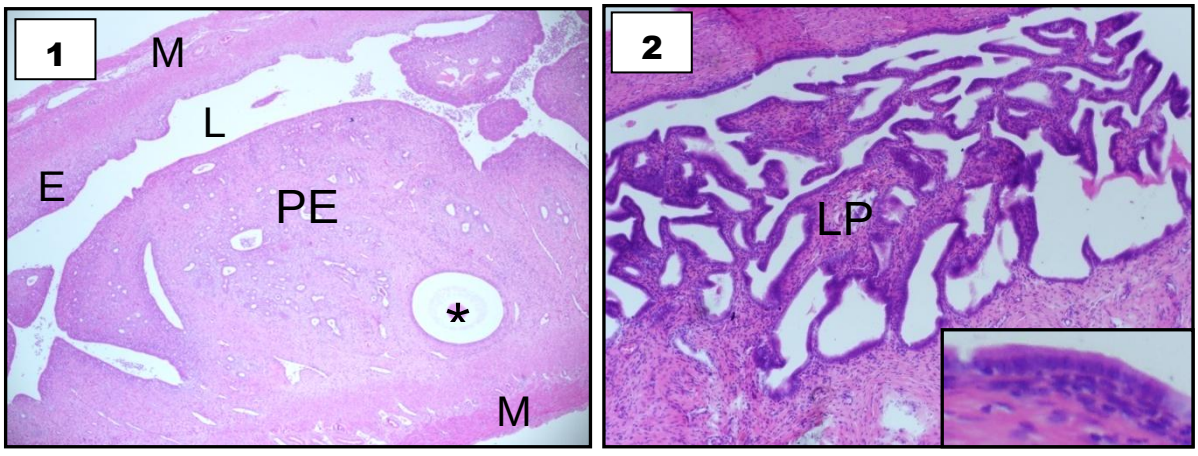
Prancha 4. Fotomicrografias de lesões histológicas encontradas no útero de animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não (HE). **(1)** adenoarcinoma de útero (AC). Aumento 10x**. (2)** Detalhe do adenocarcinoma uterino (retângulo da figura 1). É possível observar algumas figuras mitóticas (retângulo) na massa tumoral, atipia celular, além de desorganização estrutural do tecido uterino. Aumento 40x. L: lúmen.



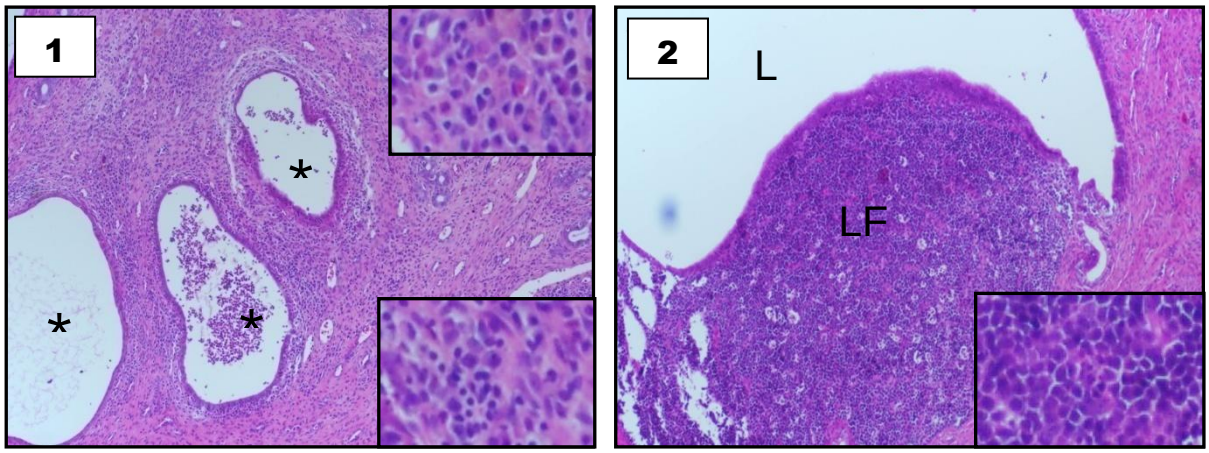
Prancha 5. Fotomicrografias de lesões histológicas encontradas no útero de animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não (HE). **(1), (2), (3)** e **(4)** Glândulas uterinas dilatadas (GUD e setas). Além da estrutura dilatada das glândulas, é possível observar alterações no estroma, que é menos abundante, diminuindo a distância de uma glândula a outra. Na figura 2 é possível observar o detalhe do estroma uterino, com características fibrovasculares (canto superior direito) e o detalhe do epitélio de revestimento das alterações císticas do útero, epitélio de células cuboides um pouco achatadas (canto inferior esquerdo). Aumento 10x.



Prancha 6. Fotomicrografias de lesões histológicas encontradas no útero de animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não (HE). **(1)** e **(2)** Glândulas Uterinas Hiperplásicas (setas). É possível observar um aumento no número de células do epitélio glandular uterino. Tais células possuem citoplasma mais eosinofílico em relação as glândulas normais, além de nucléolo evidente (retângulo da figura 2). Aumento 20x. **(3)** e **(4)** Glândulas Uterinas Hiperplásicas (algumas determinadas por *). É possível observar aumento no número de células do epitélio glandular uterino. Além disso, pode ser observado aumento no número e tamanho das glândulas uterinas, e a presença de glândulas cheias de secreção (3). Aumento 20x.



Prancha 7. Fotomicrografias de lesões histológicas encontradas no útero de animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não (HE). **(1)** Pólipo Estromal Uterino (PE). Essas lesões são caracterizadas pela presença de Glândulas dilatadas (*), além de crescimento hiperplásico de glândulas e estroma, que possui característica fibrovascular. Aumento 10x. L: Lúmen; E: Endométrio; M: Miométrio. **(2)** Lesões Papilíferas (LP) observadas no útero dos animais. Tais lesões estão revestidas por epitélio cuboide hiperplásico (retângulo), de células com o citoplasma mais eosinofílico em comparação com o epitélio normal uterino. E o estroma possui característica fibrovascular. Aumento 10x.



Prancha 8. Fotomicrografias de lesões histológicas encontradas no útero de animais sacrificados 25 semanas após a iniciação ou não (HE). **(1)** Glândulas uterinas dilatadas (*) e inflamação do estroma uterino. Observa-se a presença de infiltrados inflamatórios no estroma uterino (retângulos) , principalmente em volta das glândulas dilatadas. Aumento 20x. **(2)** Linfoma uterino (LF). No retângulo, detalhe tecido metastático linfoide que infiltrou-se pelo estroma uterino. L: Lúmen. Aumento 10x.

Tabela 7. Incidência de lesões neoplásicas e não neoplásicas dos animais não iniciados

Parâmetros	Grupos[1]						
	1	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Ovário							
Cisto	0/12 (0)	0/12 (0)	2/12 (16,67)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	2/12 (16,67)	1/12 (8,33)
Linfoma	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)
Tuba Uterina							
Hiperplasia	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	0/12 (0)
Corno Uterino							
Adenocarcinoma	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	0/12 (0)
GUD	1/12 (8,33)	1/12 (8,33)	2/12 (16,67)	1/12 (8,33)	2/12 (16,67)	1/12 (8,33)	1/12 (8,33)
GUH	0/12 (0)	1/12 (8,33)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	0/12 (0)
PE	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	0/12 (0)
LP	0/12 (0)	0/12 (0)	5/12 (41,67) a	0/12 (0)	0/12 (0) c	1/12 (8,33)	0/12 (0) c
Inflamação	1/12 (8,33)	2/12 (16,67)	2/12 (16,67)	1/12 (8,33)	0/12 (0)	2/12 (16,67)	0/12 (0)
Linfoma	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)

Os valores são apresentados com dados da proporção de animais que apresentaram determinada alteração histológica, e porcentagem em parênteses. [1]Grupos experimentais (n=5); (1) Controle, (2A) BPA 25 µg/kg p.c., (2B) BPA 250 µg/kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 µg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 µg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 µg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 µg/kg p.c. ~~a~~": Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). ~~b~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). ~~c~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). Abreviações: GUD: Glândula Uterina Dilatada, GUH: Glândula Uterina Hiperplásica, PE: Pólipo Estromal, LP: Lesões Papilíferas.

Tabela 8. Incidência de lesões neoplásicas e não neoplásicas dos animais iniciados

Parâmetros	Grupos[1]						
	1	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Ovário							
Cisto	4/12 (33,33)	2/12 (16,67)	7/12 (58,33)	2/12 (16,67)	4/12 (33,33)	2/12 (16,67)	2/12 (16,67)
Linfoma	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	2/12 (16,67)
Tuba Uterina							
Hiperplasia	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	1/12 (8,33)	3/12 (25)	1/12 (8,33)
Corno Uterino							
Adenocarcinoma	1/12 (8,33)	5/12 (41,67)	2/12 (16,67)	1/12 (8,33)	1/12 (8,33)	0/12 (0) b	1/12 (8,33)
GUD	1/12 (8,33)	5/12 (41,67)	6/12 (50)	8/12 (66,67)	5/12 (41,67)	4/12 (33,33)	7/12(58,33)
GUH	2/12 (16,67)	2/12 (16,67)	1/12 (8,33)	0/12 (0)	0/12 (0)	4/12 (33,33)	0/12 (0)
PE	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	0/12 (0)
LP	1/12 (8,33)	0/12 (0)	1/12 (8,33)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)
Inflamação	1/12 (8,33)	4/12 (33,33)	3/12 (25)	5/12 (41,67)	2/12 (16,67)	1/12 (8,33)	0/12 (0)
Linfoma	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	2/12 (16,67)

Os valores são apresentados com dados da proporção de animais que apresentaram determinada alteração histológica, e porcentagem em parênteses. [1]Grupos experimentais (n=5); (1) Controle, (2A) BPA 25 µg/kg p.c., (2B) BPA 250 µg/kg p.c., (3A) Genisteína e BPA 25 µg/kg p.c., (3B) Genisteína e BPA 250 µg/kg p.c., (4A) I3C e BPA 25 µg/kg p.c. e (4B) I3C e BPA 250 µg/kg p.c. ~~a~~": Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$). ~~b~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 25 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). ~~c~~": Diferença significativa em relação ao grupo tratado com BPA 250 µg/ kg p.c. ($p<0,05$). Abreviações: GUD: Glândula Uterina Dilatada, GUH: Glândula Uterina Hiperplásica, PE: Pólipo Estromal, LP: Lesões Papilíferas.

7. Discussão

7.1. –Efeitos da exposição gestacional ao Bisfenol A

Neste estudo foram avaliados os efeitos da exposição gestacional ao BPA em duas concentrações diferentes (25 μg/kg p.c. e 250 μg/kg p.c.) sobre morfogênese e carcinogênese de orgãos reprodutores na prole de fêmeas SD da geração F1. As concentrações de BPA utilizadas assemelham-se aquelas utilizadas em estudos de exposição gestacional e neonatal (1, 10, 100 e 1000 μg/kg p.c.), nos quais foram observados efeitos deletérios sobre a morfogênese do trato reprodutivo de roedores (Newbold *et al.*, 2007, 2009).

Os resultados indicam que a exposição gestacional ao BPA resultou em diferenças significativas no peso da prole nos dias DPN 10 e 51. Foi observado aumento de peso corpóreo no grupo tratado com BPA 25 μg/kg p.c (2A) quando comparado ao grupo controle (1) nos dias DPN 10 e 51 e redução de peso corpóreo quando comparado ao tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c. **(**2B) no dia DPN 10. Não foram observadas diferenças significativas nos demais parâmetros durante a gestação (mães) e na prole na lactação e ao final do experimento (vida adulta) quanto aos pesos relativos de útero e ovários no primeiro e segundo sacrifícios. Em geral, as diferenças apresentadas podem ser atribuídas a variabilidade associada ao número de filhotes nascidos, já que não houve diferença no consumo de ração entre os grupos experimentais. Embora tenham sido observadas diferenças no peso corpóreo da prole de fêmeas em diferentes momentos (DPN 10 e 51), essas diferenças pontuais parecem não estar associadas ao tratamento específico, mas a própria variabilidade de crescimento das ninhadas. Outros estudos, nos quais a exposição gestacional e lactacional ao BPA ocorreu em concentrações maiores (4, 40 e 400 mg/kg p.c.) ou na mesma faixa de exposição ao do presente estudo (1, 10, 100, e 1000 ug/kg p.c.), o tratamento com BPA não causou alterações significativas no peso corpóreo na prole de fêmeas (Kobayashi *et al*., 2002; Newbold *et al*., 2009), fortalecendo a premissa de que as diferenças observadas podem ser mesmo atribuídas a variabilidade de crescimento da ninhada.

Nas avaliações morfométricas de útero e de tubas uterinas dos grupos de animais sacrificados no DPN 21, a exposição gestacional ao BPA 25 μg/kg p.c (2A) causou aumento significativo na área total uterina, áreas absolutas de endométrio, miométrio interno e externo e comprimento de lúmen uterino, enquanto que o tratamento com BPA 250 μg/kg p.c**.** (2B) causou aumento significativo somente no comprimento de miométrio externo em comparação ao controle (1). Entretanto, o tratamento com BPA, em ambas as concentrações, não alterou os parâmetros morfométricos analisados nas tubas uterinas no DPN 21.

Durante o período de embriogênese em roedores, especificamente no período do DG 9 ao DG 17, já ocorre a expressão de receptores de estrogênio (α e/ou β) nas estruturas do trato genital

feminino, assim como nas estruturas que as precedem durante o desenvolvimento (Lemmen *et al.,* 1999). Assim, os órgãos reprodutores estariam susceptíveis a ação de substâncias endógenas ou exógenas que atuem nesses receptores. Especificamente no útero, a ação do estrogênio endógeno é essencial para processos de morfogênese, crescimento, proliferação, citodiferenciação e atividade secretória (Gray *et al*., 2001; Winuthayanon *et al*, 2010), sendo o receptor de estrogênio expresso no epitélio, estroma e miométrio uterinos (McCormack e Glasser, 1980; Shughrue *et al*., 1996). Estudos indicam que o BPA apresenta atividades estrogênicas e com potencial para atuar nas duas formas de RE (α e/ou β), mas com menor afinidade em comparação com o estradiol (E2) (Kuiper *et al.* 1998) e com o DES (Blair *et al*., 2000). No entanto, os efeitos biológicos do BPA assemelham-se aos dois compostos citados em vários ensaios.

Em estudos anteriores, tanto o BPA quanto o E2 causaram aumento significativo na altura do epitélio uterino e aumento no tamanho e na quantidade de cílios das células epiteliais em animais adultos (7-8 semanas) (Steinmetz *et al*., 1998). O DES, em exposição pós-natal (DPN 1-5), também demonstrou ter feitos semelhantes (Yoshida *et al.,* 1998). O próprio BPA (nas concentrações de 25-250 ng/kg p.c.), em exposição pós-natal e durante a lactação, causou alteração significativa no volume de lâmina própria de útero, assim como aumento no comprimento de miométrio da prole, no entanto, tal diferença não foi estatisticamente significativa (Markey *et al.,* 2005). Outro indício da ação proliferativa do BPA sobre o trato genital feminino está relacionado com o fato de que a exposição ao composto induziu a expressão da proteína *c-fos* no útero de roedores adultos (Steinmetz *et al*., 1998). O *FOS* é um protooncogene que faz parte da família dos fatores de transcrição e seu produto, a proteína *c-fos* , forma um dímero com a proteína *c-jun*, originando o fator de transcrição AP-1. O AP-1 atua nas vias de proliferação e crescimento celulares, principalmente associado aos receptores de estrogênio no epitélio do trato genital feminino (Loose-Mitchell *et al.,* 1988). Por si só, o *c-fos* não acarreta uma resposta proliferativa, no entanto, na estimulação por E2, o AP-1 atua na saída da célula da fase G0 para a fase S (Persico *et al*., 1990). As diferenças morfométricas obtidas podem indicar que o BPA possa ter atuado sobre os receptores de estrogênio do estroma do endométrio e, principalmente, sobre o miométrio durante a morfogênese da prole, causando aumento de proliferação celular em tais camadas, resultando em aumento na espessura e área total das mesmas e também contribuindo para o aumento na área total uterina e na abertura do lúmen uterino.

Além disso, no grupo tratado somente com a menor concentração de BPA (25 μg/kg p.c.) (2A), foram observadas as maiores diferenças morfométricas em relação ao controle (1) e em menor proporção ao grupo tratado com a maior concentração (250 μg/kg p.c.) (2B), cinco (05) itens (comprimento lúmen, área absoluta de endométrio, m. interno, m.externo e área total) contra (01) item (comprimento de m. externo). Esse tipo de resposta já foi observado em outros estudos, em

que a menor concentração de BPA (1 µg/kg p.c.) foi responsável pelo maior número de alterações histológicas no trato genital feminino em relação as maiores concentrações (10, 100 e 1000 µg/kg p.c.) (Newbold *et al*., 2009; Newbold *et al.,* 2007). Esse tipo de resposta, denominado não-linear, tem sido descrito em vários estudos endocrinológicos (vom Saal et al. 1997). Uma explicação para esses efeitos pode ser observado em estudos de DNA *microarray*, em que a alteração das concentrações de compostos com ação estrogênica, da menor para maior concentração, resulta em *arrays* de genes totalmente diferentes (Coser et al., 2003). Assim, a ideia de que o efeito causado pela ação do composto altera-se de maneira quantitativa (~~"m~~aiores efeitos em maiores concentrações") não é observada nesses estudos.

No entanto, em ambas as concentrações, o BPA não alterou parâmetros morfométricos das tubas uterinas. Essa divergência de efeitos biológicos nas mesmas condições experimentais já foi observada em outros estudos *in vivo*. Em exposição pós-natal e durante a lactação, o BPA (25-250 ng/kg p.c.) causou alterações morfométricas, proliferativas e na expressão de REα no útero da prole, no entanto, não foram observadas diferenças na vagina (Markey et al., 2005). Além do fato de que cada composto possui diferentes padrões em relação a sua mecanística de interação com os receptores α e β, a expressão de REα e REβ nos tecidos varia constitutivamente, podendo resultar em respostas biológicas diferentes de maneira tecido-específicas (Brandenberger, 1997). Especificamente no desenvolvimento das tubas uterinas em roedores, as expressões de REα quanto de REβ já foram identificadas, apesar de que REα parece ter papel principal no desenvolvimento do trato genital feminino (Okada *et al*., 2003). A coexpressão de tais receptores nesses tecidos e a formação de heterodímeros α/β, pode alterar o padrão de resposta biológica, podendo também estar relacionado com a capacidade de recrutamento de fatores coativadores tecido-específicos. Em estudo *in vitro* já foi demonstrado que o BPA é responsável por causar grandes alterações na expressão gênica de células contendo o receptor REβ quando o coativador TIF2 é corregulador principal, e também causando grandes alterações tanto em REα quanto em REβ quando o coativador-1a está presente (Routledge *et al*., 2000). Assim, o fato de o BPA ter uma ação proliferativa no útero dos animais mas não ter causado efeitos nas tubas uterinas sugere um tipo de resposta tecido-específica em exposição a compostos com ação estrogênica.

Nos resultados da contagem folicular, o BPA não causou nenhuma diferença significativa nos parâmetros de contagem analisados nas duas concentrações. No entanto, foi possível observar a ocorrência de folículos contendo mais de um óocito, os MOFs (*Multioocyte Folicles*, do inglês) em dois animais tratados com BPA 25 µg/kg p.c. (2A). Apesar de serem consideradas raras em roedores, essas alterações histológicas já foram observadas em camundongos (Zhang *et al*., 2012) e ratos (Rodrigues *et al*., 2010) pela exposição ao próprio BPA e outros compostos com ação estrogênica (revisado em Pepling, 2012). Durante a embriogênese de roedores, as células

germinativas migram para crista genital durante o período do 10º até o 14º DPC (*days post coitus*) (McLaren, 2001), sofrendo proliferação durante esse período. Essas células permanecem em meiose I e só continuam seu desenvolvimento no período pós-natal. No periodo pós-natal, essas células que pararam em meiose I são cercadas por uma porção de células somáticas, formando, assim, um cisto de células germinativas (Ginsburg et al., 1990). As oogonias, que são células germinativas, originam os oócitos primordiais. Os óocitos contidos no cisto se separam em um processo denominado "quebra do cisto" (*cyst breakdown*), dando origem aos folículos primordiais, cercados por uma única camada de células achatadas da pré-granulosa (Pepling & Spradling., 2001). Parte desses folículos primordiais que sobrevivem ao processo quebra, podem maturar-se pelo processo de ativação folicular na maturidade sexual, mas outra parte sofre morte celular seguida de atresia folicular.

A importância da quebra do cisto parece estar relacionada com a duração da vida reprodutiva das fêmeas e, portanto, com o sucesso reprodutivo (Pepling, 2012). O processo de quebra do cisto, assim como os processos de morte celular, sobrevência, crescimento e proliferação de células germinativas e da granulosa envolvem a ação equilibrada de uma série de fatores pró-apoptóticos, anti-apoptóticos, fatores de crescimento e de transcrição e hormônios. Quando esse equilíbrio de fatores é modificado, dentro de outras alterações, a quebra do cisto pode não acontecer, ou acontecer de maneira incorreta, formando os MOFs (Jefferson *et al.,* 2006). Durante a quebra do cisto, o REα é expresso nas células da pré-granulosa e REβ no núcleo de alguns óocitos (Chen *et al*., 2009). A ação de estrógenos sobre o processo de quebra do cisto, como a exposição neonatal ao E2 (Iguchi *et al.,* 1986), ao DES (Iguchi *et al*., 1990) e ao próprio BPA (Rodrigues *et al*., 2010), causou aumento significativo número de MOFs, sugerindo que os hormônios com ação estrogênica inibem a quebra do cisto, podendo atuar tanto em REα quanto em REβ (Pepling, 2012). Nos mesmos estudos em que houve aumento dos MOFs nos ovários de neonatos expostos ao BPA, foram observadas outras alterações como diminuição significativa no número de folículos pimordiais e aumento no número de folículos em crescimento, sugerindo uma taxa de proliferação aumentada no ovários desses animais devido a estimulação via estrógeno (Rodrigues *et al*., 2010). No entanto, tais exposições aconteceram em concentrações maiores de BPA do que o presente estudo (20 mg/kg p.c.), sendo, assim, as menores doses de BPA utilizadas seria uma possível justificativa para a ausência de efeitos biológicos do BPA sobre os ovários dos animais expostos no DPN 21.

A análise histológica das fêmeas sacrificadas 25 semanas após a iniciação ou não com a MNU revelou o desenvolvimento de alterações histológicas no trato genital feminino após exposição gestacional ao BPA nas duas concentrações. Nos grupos não-inciados, somente o tratamento com BPA 250 μg/kg p.c. (2B) causou aumento significativo na incidência de lesões

papilíferas no útero em relação ao grupo controle (1). Foi observada maior incidência de cistos ovarianos, glândulas uterinas dilatadas (GUD) e inflamação no útero dos animais tratados com BPA 250 μg/kg p.c. (2B) em comparação com o grupo controle (1), no entanto, tal diferença não foi significativa. Maior incidência de glândulas uterinas hiperplásicas (GUH) e de inflamação no útero foi observada no grupo tratado com BPA 25 μg/kg p.c. (2A) em comparação com o grupo controle (1), no entanto, tal diferença também não foi significativa. Em relação a outros estudos, já foi observado o desenvolvimento de alterações semelhantes em útero e ovários de animais expostos ao BPA. Em exposição gestacional (0.1, 1, 10, 100 ou 1.000 μg/kg p.c.), o BPA causou aumento na incidência de hiperplasia no útero e cistos ovarianos em animais sacrificados aos 16-19 meses de idade (Newbold *et al*., 2009). Alterações semelhantes foram observadas em animais expostos ao BPA (10, 100 ou 1.000 μg/kg p.c.) no período neonatal (Newbold *et al*., 2007). Essas alterações histológicas também assemelham-se àquelas observadas em exposição ao DES (Newbold, 1995).

As lesões hiperplásicas que desenvolveram-se no útero de animais não iniciados possuiam diferentes características histológicas. De acordo com a revisão feita por Horn (2007), existem dois tipos de hiperplasias uterinas: atípica e típica. As lesões uterinas apresentando dilatações glandulares (GUD) encontradas nos animais tratados com BPA são lesões hiperplásicas típicas classificadas como simples. Histologicamente, as hiperplasias típicas simples são lesões nas quais é possível observar dilatação glandular evidente, epitélio hipercromático e aumento no número de glândulas em relação ao estroma (relação glândula/estroma), mas não há atipia. Já os focos hiperplásicos encontrados (GUH) demonstraram 2 aspectos distintos classificados como hiperplasia complexa típica e hiperplasia atípica. Na hiperplasia complexa típica, há epitélio hipercromático, maior número de glândulas no estroma, no entanto, não há atipia e ainda há grande quantidade de estroma separando uma glândula de outra. Já na hiperplasia atípica, há pouco citoplasma separando uma glândula a outra, há atipia, além de acúmulo de secreção nas glândulas. As lesões hiperplásicas atípicas ainda compreendem lesões em que há projeções papilares no lúmen uterino, como as lesões papíliferas (LP) encontradas nos animais tratados com BPA 250 μg/kg p.c. (2B). Em relação a importância dessas lesões, as lesões hiperplásicas atípicas, incluindo as papilares, parecem estar mais relacionadas com o desenvolvimento de adenocarcinoma de útero, sendo consideradas lesões precursoras, já as hiperplasias típicas (simples ou complexas) não tem uma forte relação com o desenvolvimento do adenocarcinoma uterino. Os focos inflamatórios observados no útero dos animais podem ser considerados consequências da ocorrência de glândulas uterinas dilatadas (GUD), visto que lesões semelhantes também já foram observadas em exposição ao DES (Newbold *et al.,* 1983).

Nos grupos iniciados com a MNU foi observada maior incidência de cistos ovarianos no grupo tratado com BPA 250 μg/kg p.c. na gestação (2B) em relação ao controle (1) e maiores

incidências de adenocarcinoma uterino, lgândulas uterinas dilatadas e inflamação nos grupos tratados com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) e 250 µg/kg p.c. (2B) em relação ao grupo controle (1). No entanto, essas diferenças não foram significativas.Apesar de não ser significativa, a maior incidência de adenocarcinoma uterino nos grupos iniciados e tratados com BPA é um achado relevante. Como nos animais não-iniciados foram observadas lesões consideradas precursoras do adenocarcinoma uterino, a maior incidência de adenocarcinoma nos grupos iniciados tratados com BPA em relação ao grupo controle pode indicar que o BPA aumentou a susceptibilidade à carcinogênese induzidapelo MNU. Essa afirmação pode ser comprovada pelo fato de que quando comparada a incidência de adenocarcinoma entre grupos iniciados com não iniciados, verifica-se a maior susceptibilidade a iniciação pela MNU pelo aumento significativo no grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A) no grupo iniciado em comparação com o não-iniciado (5/12 (41,67) vs. 0/12 (0)). Estudos anteriores demonstraram que a exposição a diferentes estrogênicos aumentou a susceptibilidade ao desenvolvimento de adenocarcinoma uterino em roedores iniciados com a MNU (Niwa et al., 1993), assim como no presente estudo. As alterações proliferativas observadas no útero dos animais sacrificados ao DPN 21 e as alterações hiperplásicas observadas principalmente nos animais não iniciados podem ser atribuídas ao efeito estrogênico do BPA.

Nos ovários da prole, tanto nos grupos iniciados quanto nos não-iniciados foram observadas lesões consideradas benignas, os cistos ovarianos. Como já citado, o BPA tem efeitos adversos sobre os ovários devido a sua ação na indução de cistos, assim como a exposição ao DES (Newbold *et al*., 1990) e ao tamoxifeno (Newbold *et al*., 1997). Além disso, o BPA já demonstrou ter efeitos adversos sobre a oogênese (Susiarjo *et al.,* 2007) e sobre a formação e crescimento folicular como discutido anteriormente, no entanto, os mecanismos que envolvem a formação dos cistos ainda não estão esclarecidos (Newbold *et al*., 2009). Além dos efeitos observados sobre o útero e ovários da prole, não foram observadas alterações morfológicas nas tubas uterinas no DPN 21 e na vida adulta, tanto nos grupos iniciados quanto nos não-iniciados reforçando a idéia de que os efeitos do BPA, assim como de outros compostos com ação estrogênica, dependem da característica constitutiva do tecido, como discutido anteriormente.

Os resultados obtidos sugerem que a exposição gestacional ao BPA aumentou a proliferação celular no útero da prole, podendo levar ao desenvolvimento de lesões proliferativas pré-neoplásicas, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias uterinas em grupos iniciados com a MNU. Essa hipótese será comprovada após a análise das taxas de proliferação celular no útero (análise em andamento).

7.2. Efeitos da exposição gestacional a genisteina e ao indol-3-cabinol

Neste estudo foi avaliado se a exposição gestacional a genisteína e ao indol-3-carbinol modificaria os potenciais efeitos adversos da exposição ao BPA sobre a morfogênese e carcinogênese de útero e ovários na geração F1. O consumo médio de genisteína no presente estudo, baseado na concentração determinada no seu início (250 mg/kg de ração), atingiu 5,78 mg/animal/dia no grupo tratado com genisteína e BPA 25 μg/kg p.c (3A) e 5,16 mg/animal/dia no grupo tratado com genisteína e BPA 250 μg/kg p.c (3B). Em outros estudos com consumos médios semelhantes (1,39 – 7,72 mg/animal/dia) em exposição gestacional e pós-natal causaram alterações no desenvolvimento de ovários, ovidutos, útero e mamas em roedores fêmeas da geração F1 (Declos et al., 2001). Já o consumo médio de I3C nos grupos experimentais atingiu 44,06 mg/animal/dia no grupo tratado com I3C e BPA 25 μg/kg p.c (4A) e 46,06 mg/animal/dia no grupo tratado com I3C e BPA 250 μg/kg p.c (4B). Estudos com menor consumo médio de I3C (2.1, 5.3, e 10.9 mg/animal/dia) observaram efeitos quimiopreventivos do composto em câncer esporádico de útero em animais (Kojima *et al.,* 1994).

Em relação as medidas de peso, no 20 DG foi observado aumento significativo no peso corpóreo das mães tratadas com genisteína e BPA 25 μg/kg p.c (3A) em comparação ao grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c (2A). Não foram observadas diferenças significativas nos demais parâmetros da gestação e das mães. Na prole de fêmeas foi observado aumento significativo de peso corpóreo no grupo tratado com BPA 25 μg/kg p.c e genisteina (3A) em comparação ao grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c (2A) no DPN 3 e 10. No DPN 10 também foi observado aumento significativo de peso corpóreo no grupo tratado com genisteína e BPA 250 μg/kg p.c (3B) em comparação ao grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c (2B). No DPN 21, houve aumento significativo no peso corpóreo do grupo tratado com I3C e BPA 25 μg/kg p.c (4A) em comparação ao grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c (2A). As diferenças apresentadas também podem ser atribuídas a variabilidade associada ao número de filhotes nascidos, já que não houve diferença no consumo de ração entre os grupos experimentais. Embora também tenham sido observadas diferenças no peso corpóreo da prole de fêmeas em diferentes momentos (3, 10, 21 PND), essas diferenças parecem não estar associadas ao tratamento específico, mas a própria variabilidade de crescimento das ninhadas. Estudos em que a exposição a genisteína ocorreu durante a gestação e lactação, alterações significativas nos parâmetros da gestação, peso médio e ganho de peso corpóreo tanto de mães quanto de prole (machos e fêmeas) foram observadas na maior concentração utilizada (69,96 mg/animal/dia para mães e 73,10 mg/animal/dia para a prole). No mesmo estudo, em concentrações semelhantes ao do atual estudo, não foram observadas tais

diferenças, no entanto, foram observadas alterações morfológicas nos ovários, útero, tubas e glândulas mamárias (Declos et al., 2001).

No cálculo dos pesos relativos de útero e ovários da prole sacrificada ao DPN 21, foram observadas diferenças significativas entre os grupos. O grupo tratado com I3C e BPA 25 μg/kg p.c (4A) teve maior peso de ovário direito e útero em comparação com o grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c (2A). No grupo tratado com I3C e BPA 250 μg/kg p.c (4B) foi observado maior peso relativo de ovário direito e menor peso relativo de ovário esquerdo em comparação com o grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c (2B). O aumento de peso de útero pode estar relacionado aos resultados obtidos na análise histológica dos animais sacrificados ao DPN 21, em que foram observadas alterações na área e no comprimento de algumas camadas uterinas, principalmente nos grupos que receberam a associação I3C e BPA (4A e 4B). Esses resultados serão discutidos posteriormente após análise de proliferação celular. Mas apesar de também existirem diferenças de peso relativo de ovário esquerdo e direito, as diferenças são pequenas, e podem não representar significado biológico, visto que não foram observadas alterações histológicas importantes no DPN 21. Ao final do experimento foram observadas diferenças significativas entre os grupos no cálculo de pesos relativos de útero e ovários da prole. Nos animais iniciados com a MNU, o grupo tratado com I3C e BPA 250 μg/kg p.c (4B) apresentou maior peso relativo de útero e ambos os ovários em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c (2B). Não houve diferenças significativas entre os animais não-iniciados. Esse aumento de peso relativo pode estar relacionado com o desenvolvimento de diferentes lesões proliferativas observadas na análise histológica, apesar de que na maioria das incidências dessas lesões, não serem estatisticamente diferentes entre os grupos.

O útero dos animais sacrificados ao DPN 21 foi analisado morfometricamente. O tratamento com I3C e BPA 250 μg/kg p.c (4B) causou aumento significativo no comprimento de miométrio interno, áreas absolutas de miométrio externo, interno, área relativa de miométrio interno e aumento significativo na área total em comparação ao grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c (Grupo 2B). O tratamento com I3C em associação ao BPA 25 μg/kg p.c (Grupo 4A) também causou aumento de comprimento de miométrio interno em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c (Grupo 2A). Como anteriormente destacado, o período de morfogênese de diferentes espécies de animais é o momento em que há menor produção de hormônios endógenos (Reinwald & Weaver, 2006) e há baixas taxas de metabolismo hepático (Lee *et al.,* 2012) entre outras características que conferem maior susceptibilidade a ação de substâncias químicas, principalmente aquelas que podem atuar alterando a homeostase hormonal, visto que muitos dos

eventos da etapa de morfogênese são depedentes dehormônios(Sakuma, 2009). Tanto o I3C como o BPA apresentam potencial para atuar nessa homeostase hormonal de várias maneiras, principalmente interferindo na via estrogênica. Além das evidências já citadas, o BPA demonstrou em vários estudos ter efeitos proliferativos no útero de roedores pelo teste uterotrófico e em outras análises morfométricas.

Em roedores jovens, o BPA demonstrou ter efeito uterotrófico nas concentrações de 0.04, 400 e 800 mg/kg p.c.(Ashby &Tinwell, 1998), assim como na concentração de 100 mg/kg p.c. (Markey *et al*., 2001). Nesse último estudo, o BPA também causou aumento na altura de epitélio nas concentrações de 5, 75 e 100 mg/kg p.c. e em comprimento de lâmina própria, mas só na concentração de 50 mg/kg p.c. Por outro lado o I3C, entre outras ações na via estrogênica, parece induzir enzimas do citocromo P450 em reações de fase I tanto em roedores adultos (200, 500, and 1000 ppm) quanto em humanos (500 mg/dia), metabolizando o 17β – estradiol (E2) e originando um composto metabólico com pequena afinidade ao receptor de estrogênio e com menor potencial estrogênico do que o E2, o 2'-hidroxiestradiol (2-HE). Assim o BPA parece interferir na sinalização dependente de E2 pelo fato do 2-HE competir com o hormônio endógeno pelos receptores de estrogênio (Kojima *et al.,* 1994; Michnovicz e Bradlow, 1990), atuando nos mecanismos em potencial para a inibição do desenvolvimento de lesões proliferativas e neoplásicas em mama e útero de roedores (Kojima *et al.,* 1994). No entanto, a exposição ao I3C (2000 ppm) já demonstrou ter efeitos promotores relacionados ao mesmo processo de indução do P450 e metabolização do E2, só que em outra via, a da 4-hidroxilação do 17β – estradiol, gerando o composto 4-hidroxiestradiol (4-HE), que possui ação estrogênica maior do que a do 2-HE, podendo mediar efeitos proliferativos nos órgãos hormônio-sensíveis (Yoshida *et al.,* 1994). Apesar de a grande maioria dos estudos utilizar animais adultos, há indícios que a exposição gestacional ao I3C também atue induzindo enzimas do citocromo P450 na prole, especificamente CYP1A1 e CYP1B1, que estão relacionados com a metabolização do E2 e de xenobióticos (Larsen-sum & Williams, 2001). Quando avaliados os efeitos da exposição gestacional somente ao BPA no útero da prole, os resultados obtidos indicam que o BPA isoladamente pode ter agido sobre estroma de endométrio e principalmente sobre o miométrio, causando a proliferação celular em tais camadas. Já as diferenças morfométricas obtidas no tratamento com I3C e BPA sobre o útero, indicam que essa associação pode ter efeito proliferativo principalmente sobre o miométrio durante a morfogênese da prole. Evidenciando um possível efeito sinérgico entre os dois compostos, visto que ambos já demonstraram atuar na proliferação via estrógeno.

A associação de genisteína e BPA (3A e 3B) não causou efeitos significativos sobre o útero dos animais sacrificados no DPN 21 em comparação aos grupos tratados somente com BPA (2A e 2B). Apesar de existirem poucos estudos sobre a interação de compostos com ação estrogênica, um

estudo realizado por Tinwell &Ashby (2004), utilizou várias combinações de genisteína e BPA em teste uterotrópico em roedores jovens, além dos dois compostos isoladamente. Tanto o BPA (30, 75, 150, 300 mg/kg p.c.) quanto a genisteína (2.5, 5, 10 mg/kg p.c.) individualmente foram responsáveis por aumento significativo de peso de útero em várias concentrações, evidenciando efeito proliferativo dessas substâncias sobre o órgão. No entanto, apesar de as várias combinações de genisteína e BPA causarem aumento significativo no peso de útero em comparação ao controle, esse aumento não diferiu do aumento observado quando os compostos foram administrados isoladamente, evidenciando uma ausência de efeitos aditivos. Esses resultados assemelham-se de certa forma aos do presente estudo, no qual o BPA demonstrou ter efeitos proliferativos sobre o útero da prole quando administrado isoladamente, no entanto, quando associado a genisteína, os resultados não diferiram. Em estudo *in vivo* em animais adultos ovariectomizados, a genisteína (100 mg/kg p.c.), o BPA (200 mg/kg p.c.) e o E2 (30 mg/kg p.c.) foram adminstrados isoladamente e em associação, e os resultados demonstraram que BPA e genisteína isoladamente possuiam efeitos proliferativos sobre o útero, com aumento de epitélio e peso uterino absoluto, mas menos pronunciados do que E2. No entanto, a associação de BPA com genisteína não demonstrou ter efeitos proliferativos aditivos (Schmidt et al, 2006). Em ambos os estudos, as concentrações de BPA e genesteína eram muito superiores em comparação ao do atual estudo. A variabilidade no delineamento experimental pode contribuir para as diferentes respostas biológicas observadas entre os estudos.

Nas medidas de tuba uterina houve diferenças significativas tanto em ampola quanto em istmo. O tratamento com genisteínaf e BPA 250 µg/kg p.c (3B) causou redução nas medidas de altura de epitélio e de espessura de serosa de ampola em comparação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c (2B). Por outro lado, o tratamento com I3C e BPA 250 µg/kg p.c (4B) causou redução significativa nas medidas de altura de epitélio de ampola em comparação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c (2B). Não foram observadas diferenças significativas nas medidas de espessura de camada muscular. Nas medidas de istmo, o tratamento com I3C e BPA 250 µg/kg p.c (4B) causou redução nas medidas de altura de epitélio de istmo em comparação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg/kg p.c (2B). Enquanto que o tratamento com GEN e BPA 25 µg/kg p.c (3A) causou redução nas medidas de altura de epitélio e espessura da camada muscular de istmo em comparação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c (2A). Não foram observadas diferenças nas medidas de camada serosa.

Como discutido anteriormente, os tratamentos isolados com BPA nas duas concentrações não foram responsáveis por respostas biológicas significativas, mas a interações do BPA com I3C e

com a genisteína afetaram o desenvolvimento de tubas uterinas. Em estudos prévios, a exposição pós-natal a uma dieta baseada em componentes da soja (2 mg daidzeína + 5 mg de genísteina/kg p.c.) causou alterações no epitélio de tubas uterinas em animais sacrificados aos 4 meses de idade (Kaludjerovic *et al*., 2012). Em outro estudo de exposição pós-natal, a genisteína alterou a morfogênese de ovidutos por atuar na expressão de genes da família *homeobox*, um conjunto de genes relacionados com desenvolvimento e diferenciação de várias parte do organismo de seres humanos e roedores, inclusive o sistema reprodutor (Kitajewski and Sassoon, 2000). Como resultado, as tubas uterinas se tornaram "posteriorizadas", por expressarem genes e proteínas observados nas partes posteriores do trato genital, como cérvix e vagina. No mesmo estudo, uma análise de microarray dos ovidutos de fêmeas prenhas no DG 2 demonstraram que a genisteína altera nas mães a expressão de uma série de genes relacionados com a resposta inflamatória, que normalmente são regulados por ação hormonal, sugerindo que as alterações no desenvolvimento da prole também podem estar relacionadas a essa resposta inflamatória materna (Jefferson *et al*., 2011). Outros estudos que relacionam o I3C ao trato genital feminino são normalmente relacionados às ações no útero, e existem poucos estudos relacionados aos efeitos do I3C e seus derivados nas tubas uterinas. Como discutido anteriormente, as expressões tanto de REα quanto de REβ já foram identificadas na mofogênese de tubas uterinas, apesar de que REα parece ter o papel principal no desenvolvimento (Okada *et al*., 2003), assim, esse tecido estaria também susceptível às ações do I3C e seus derivados, que já demonstraram atuar na homeostase hormonal. Quando avaliados os efeitos da exposição gestacional somente ao BPA sobre tubas uterinas, não foram observados efeitos do tratamento isolado. No entanto, os resultados obtidos sugerem que as associações do BPA com a genisteína (3A e 3B) e uma das associações com o I3C (4B) podem alterar a morfogênese das tubas uterinas.

Nos parâmetros de contagem de folículos nos ovários, o tratamento com genisteína e BPA 25 μg/kg p.c. (3A) causou aumento significativo na contagem de folículos primodiais, primários, folículos totais e folículos totais/área em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A), além de ter sido observado um foliculo contendo mais de um óocito (MOF). O tratamento com I3C e BPA 250 μg/kg p.c. (4B) foi observado aumento significativo na contagem de folículos antrais, atrésicos, folículos totais e folículos totais/área em relação ao grupo tratado somente com BPA 250 μg/kg p.c. (2B). Em relação aos folículos de Graaf, o tratamento com I3C e BPA 25 μg/kg p.c. (4A) induziu aumento significativo em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 μg/kg p.c. (2A). Não houve diferença significativa entre os grupos na contagem de folículos pré-antrais. Os tratamentos isolados com BPA não causaram diferença significativa em relação ao controle, mas foram observados folículos contendo mais de um óocito (MOFs), um possível indício da ação do

BPA sobre a morfogênese de ovários. As interações do BPA com genisteína e I3C, principalmente os grupos 3A e 4B, demonstraram alterar o desenvolvimento folicular ovariano.

Como discutido anteriormente, o período pré-natal é critico para o trato reprodutivo feminino pelo fato de que células germinativas que são geradas nesse momento vão determinar toda a vida reprodutiva do animal. As células germinativas migram para crista genital durante o período do 10º até o 14º DPC (*days post coitus*), sofrendo proliferação durante esse período (McLaren, 2001). Essas células permanecem em meiose I e só continuam seu desenvolvimento no período pós-natal. No período pós-natal, essas células que pararam em meiose I são cercadas por uma porção de células somáticas, formando, assim, um cisto de células germinativas. As oogônias, que são células germinativas, originam os oócitos primordiais. Os óocitos contidos no cisto se separam em um processo denominado "quebra do cisto" (*cyst breakdown*,), parte dos folículos sobrevive e origina os folículos primordiais, cercados por uma única camada de células achatadas da pré-granulosa, e parte sofre apoptose seguida de atresia folicular (Pepling & Spradling., 2001), no entanto, apesar de o processo de apoptose ser observado com maior evidência na quebra do cisto, ele ocorre nas células germinativas do 14 DPC e estende-se até o período pós-natal onde há quebra do cisto (Pepling &Spradling, 2001). Tanto a proliferação como a apoptose das células germinativas no período pré-natal quanto a formação dos folículos primordiais e atresia, pela quebra do cisto no período pós-natal, são processos controlados pela ação de vários mediadores, como os hormônios (Pepling, 2012).

Em animais expostos a genisteína no período pós-natal, em concentrações de 0,5 a 50 mg/kg p.c. foram observados folículos contendo mais de um óocito (MOFs) em vários estudos (Chen *et al*., 2007; Jefferson *et al*., 2006; Cimafranca *et al.,* 2010), assemelhando-se a ocorrência desses folículos em exposições ao DES ou ao E2 (Iguchi et al., 1990), assim como no presente estudo, em exposição gestacional, sugerindo que o composto pode também atuar na inibição da quebra do cisto. Outro fato que demonstra que a genisteína pode mesmo atuar na quebra do cisto está relacionada com um estudo que determinou que esse processo é mediado principalmente pela ação hormonal no receptor REβ (Jefferson *et al*., 2002), o qual a genisteína demonstrou ter maior afinidade (Manas *et al.,* 2004). Além disso, a exposição pós-natal a genisteína demonstrou inibir o processo de morte celular que acontece naturalmente com parte dos folículos do cisto, aumentando a quantidade total de folículos sobreviventes nos ovários (Jefferson *et al*., 2006). Efeitos semelhantes já foram observados na exposição aos estrógenos (Billig *et al*., 1993).

Poucos estudos avaliam os efeitos do I3C sobre os ovários no período de desenvolvimento. Porém, em um estudo com roedores jovens, a exposição ao I3C (1.5 mg/kg/dia) foi responsável por inibir a ovulação. Esse resultado foi atribuído a diminuiçãonos níveis plasmáticos de FSH e LH causados pela exposição o I3C, que pode ter atuado no nível hipotalâmico-hipofisário (Gao *et al*.,

2002). Apesar de o papéis de FSH e LH serem considerados pequenos nos processos relacionados à proliferação e apoptose de células germinativas e quebra do cisto (Roy & Albee, 2000), a alteração nos níveis desses hormônios pode também modificá-los. No atual estudo, a associação de BPA com a genisteína (3A) aumentou o número total de folículos, total de folículos/área e número de folículos primordiais e primários. E a associação do BPA com o I3C (4A e 4B) aumentou o número total de folículos, total de folículos/área, número de folículos Antrais e número de folículos de Graaf, sugerindo que essas associações podem ter atuado, direta ou indiretamente, nos processos de proliferação em que as células germinativas sofrem durante a gestação (McLaren, 2001), e consequentemente alterado os processos subsequentes relacionados a quebra de cisto e sobrevivência folicular na vida pós-natal. Na associação do BPA com o I3C, apesar de o número total de folículos e total/área estarem aumentados, foi observado aumento significativo no aumento de folículos atrésicos. O I3C e seus derivados aumentam a expressão de Bax e ativação da caspase-3 (proteínas pró-apoptóticas) (Rahman *et al*., 2003; Hong *et al.,* 2002), o resultado obtido no estudo atual pode ser atribuído a essas propriedades.

As análises histológicas dos animais sacrificados ao final do experimento (25 semanas após a iniciação ou não) revelaram diferenças significativas entre os grupos tanto nos animais não iniciados quanto nos iniciados. Nos grupos não inciados, os tratamentos com GEN e BPA 250 µg/kg p.c. (3B) e I3C e BPA 250 µg/kg p.c. (4B) causaram redução significativa no número de lesões papilíferas relação ao grupo tratado somente com BPA 250 µg /kg p.c.(2B). Já nos iniciados, o tratamento com I3C e BPA 25 µg/kg p.c. (4A) causou redução de adenocarcinoma em relação ao grupo tratado somente com BPA 25 µg/kg p.c. (2A). As associações do BPA com a GEN (3A,3B), assim como a outra Associação do BPA com o I3C (4B) também causaram redução na incidência de adenocarcinoma de útero, mas essas diferenças não foram significativas. Foi observado o desenvolvimento das outras lesões nos grupos de associação do BPA com a GEN (3A, 3B) e com o I3C (4A, 4B) nos grupos iniciados e não iniciados, no entanto, não foram observadas diferenças significativas. Como já discutido, as lesões papilíferas são consideradas lesões proliferativas que têm sua importância relacionadas a maior chance de desenvolvimento de adenocarcinoma de útero, sendo consideradas lesões precursoras (Silverberg, 2003). O tratamento com BPA 250 µg /kg p.c.(2B) causou aumento significativo dessas lesões em relação ao grupo controle (1) e nos animais iniciados, foi observada maior incidência de adenocarcinoma de útero nos grupos tratados com BPA (2A, 2B) em relação ao controle. Junto aos resultados da análise morfométrica uterina dos animais sacrificados ao 21 PND, os resultados obtidos sugerem que a exposição gestacional ao BPA aumenta a proliferação no útero da prole, podendo levar ao desenvolvimento de lesões proliferativas pré-neoplásicas, que são fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias uterinas em roedores iniciados com a MNU.

Em estudos prévios, o I3C demonstrou inibir o desenvolvimento de lesões pré-neolásicas (hiperplasias endometriais) e adenocarcinoma esporádico de útero em roedores (Kojima *et al*., 1994). Esses resultados foram associados à capacidade do I3C de induzir a expressão de enzimas do citocromo P450, aumentando a metabolização do E2 em 2-HE, um composto metabólico com pequena afinidade ao receptor de estrogênio e com menor potencial estrogênico do que o E2, afetando, assim, a sinalização dependente de E2 por competir com o hormônio endógeno pelos receptores de estrogênio (MacLusky et al., 1983). *In vitro*, o derivado DIM foi responsável por inibir a proliferação de células de adenocarcinoma por estimular a expressão de TGF-α, que atuou ativando vias citostáticas que inibiram o crescimento de tais células (Leong *et al*., 2001). Além disso, *in vivo,* o próprio I3C reduziu a incidência de tumores mamários espontâneos (Bradlow *et al*., 1991) e induzidos quimicamente (Gruubs *et al.,* 1994). A genisteína também demonstrou inibir o desenvolvimento de lesões hiperplásicas pré-neoplásicas e adenocarinoma uterino em roedores que foram tratados E2. Essa inibição foi relacionada a supressão de *c-fos* e *c-jun* no tecido endometrial, que são proteínas relacionadas com proliferação de células uterinas dependente da via estrogênica, além da supressão de IL-1 α e TNF- α, independentes da via estrogênica (Lian *et al*., 2001). O composto também inibiu neoplasias quimicamente induzidas em mama (Kato *et al*., 2000). As isoflavonas, incluindo a genisteína, apresentam ações antioxidantes e antigenotóxicas em estudos *in vitro* (Wei et al., 1993), podendo contribuir para a inibição de neoplasias quimicamente induzidas (Andersen & Markham, 2006). Apesar de terem sido observadas alterações nas tubas uterinas e nos ovários causadas pelas associações nas análises morfométricas e contagem folicular no DPN 21, não foram observadas diferenças significativas na incidência de neoplasias e alterações histológicas nos animais sacrificados ao final do experimento nesses órgãos, sugerindo que essas alterações no DPN 21 não contribuíram para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e também não aumentaram a susceptibilidade a carcinogênese pela MNU em tuba e ovários.

No útero, as associações de I3C e BPA demonstraram ter efeito proliferativo nas análises morfométricas no DPN 21 (4A e 4B), enquanto que as associações de genisteína e I3C não demonstraram efeito significativo. Apesar de as associações de I3C e BPA sugerirem esses efeito proliferativo, as análises histológicas dos animais sacrificados ao final do experimento indicam essa associação (4B) inibiu o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no útero dos grupos (4B) não inciados, assim como a associação de genisteína e BPA (3B), e reduziu a susceptibilidade a carcinogênese pela MNU (4A).

Os resultados obtidos sugerem que a exposição gestacional a genisteína e com o indol-3-carbinol inibem o desenvolvimento de lesões proliferativas pré-neoplásicas no útero da prole expostas ao Bisfenol-A, reduzindo a susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias uterinas em roedores iniciados com a MNU.

8- Referências

8.1 – Livros

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**, CRC Press, Boca Raton, p. 471–553, 2006.

DIXON, D. *et al.* **Proliferative Lesions of the Ovary, Uterus, Vagina, Cervix and Oviduct in Rats,** Guides for Toxicologic Pathology, Washington D.C. 1999.

FURTH, J. **Hormones as etiological agents in neoplasia. In Cancer — A Comprehensive Treatise**, Plenum Press, New York, 1ª edição, 1975.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Sinauer Associates, Sunderland, 5ª edição, 2007.

GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica,** Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 11ª edição, 2006.

MACLUSKY, N. J. et al. **Catechol Estrogens**. Raven Press, Nova Iorque, p. 151—165, 1983.

ROBINS & COTRAN, **Bases Patológicas das Doenças: Aparelho Genital Feminino**, Elsevier Saunders, Rio de Janeiro, 7ª edição, p.1138-1139, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, New Jersey, 4ª edição, 1999.

8.2 - Artigos

AGGARWAL, B.B.; ICHIKAWA, H. **Molecular targets and anti-cancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives.** Cell Cycle, v. 4, p. 1201–1215, 2005.

AKIYAMA, T. et al **Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases.** J Biol Chem, v. 262, p. 5592-5595, 1987.

ALONSO-MAGDALENA, P. **Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca signals in pancreatic-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans**, Environ Health Perspect, n. 113, p. 969–977, 2005.

AMERICAN INSITUTE FOR CANCER RESEARCH (AICR). **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective,** 2007.

ANDERSON E.L. **Cancer risk assessments: an overview. In: Oncogene and transgenic correlates of cancer risk**, New York: Plenum Press, p.1 – 20, 1992.

ARENAS, M., et al. **Uterine sarcomas in breast cancer patients treated with tamoxifen.** Int J Gynecol Cancer v. 16, p. 861-865, 2006.

ARMITAGE, P.; DOLL, R. **The age distribution of cancer and a multistage theory of carcinogenesis**. British Journal of Cancer, n. 8, p. 1-12, 1954.

ASHBY, J.; TINWELL, H. **Sensitivity of the Immature Rat Uterotrophic Assay to Mixtures of Estrogens, Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 5, 2004.

ASHBY, J.; TINWELL, H. **Uterotrophic Activity of Bisphenol A in the Immature Rat.** Environmental Health Perspectives , v. 106, n. 1, 1998.

AUBORN, K. J. et al. **Indole-3-Carbinol Is a Negative Regulator of Estrogen**. American Society for Nutritional Sciences, p. 2479-2475, 2003.

AZIZ, S. et al. *A* **genetic epidemiological study of carcinoma of the fallopian tube***, v. 8,* p. 341–345, 2001.

BADAWI, A.F., et al. **Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17b-estradiol in female Sprague-Dawley rats**. Carcinogenesis, v. 21, p. 1593—1599, 2000.

BANERJEE, S. et al. **Multitargeted therapy of cancer by genistein**. Cancer Letters, n. 269, v. 2, p. 226–242, 2008.

BERN. H. A., JONES. L. A., MORI, T.. AND YOUNG, P. N. **Exposure of neonatal mice to steroids: long-term effects on the mammary gland and other reproductive structures.** J. Steroid Biochem., v. 6, p. 673-676, 1975.

BERN, H. A. **The fragile fetus. In: Colborn T, Clement C, eds. Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection**. Princeton: Princeton Scientific Publishing Co. Inc. p. 9-15, 1992.

BILLIG, H.; FURUTA, I.; HSUEH, A.J. **Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis.** Endocrinology, n. 133, p. 2204–2212, 1993.

BITTNER, J.J. **The causes and control of mammary cancer in mice**. Harvey Lect, v. 42, p.221-246, 1948.

BOOTH, M., BERAL, V. & SMITH, P. **Risk Factors For Ovarian Cancer: A Case–Control Study.** British Journal of Cancer, v. 60, p. 592–598, 1989.

BONNESEN, C., EGGLESTON, I.M., HAYES, J.D. **Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines.** Cancer Res., v. 61, p. 6120-6130, 2001.

BORGEEST, C., SYMONDS, D., MAYER, L. P., HOYER, P. B., FLAWS, J. A. Methoxychlor may cause **ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse.**Toxicol Sci, v. 68, p. 473–478, 2002.

BOYD, J. & RUBIN, S.C. **Hereditary ovarian cancer: molecular genetics and clinical implication**s. Gynecology Oncology, v. 64, p. 196–206, 1997.

BRADLOW, H. L. **Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice.** Carcinogenesis, n. 12, v. 9, p. 1571-1574, 1991.

BRADLOW, H. L., et al. **2-Hydroxyestrone: the "good" estrogen.** J. Endocrinol, n. 150, p. 259–265, 1996.

BRANDENBERGER, A. W. **Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus**. J Clin Endocrinol Metab., v. 82, n. 10, p. 3509-3512, 1997.

BROOKS, S.E., ZHAN, M., COTE, T., BAQUET, C. R. **Surveillance, epidemiology, and end results analysis of 2677 cases of uterine sarcoma 1989-1999.** Gynecol Oncol, v. 93, p.204-208, 2004.

BUTTRAM,V. C. JR., REITER, R. **Uterine leiomyoma:etiology, symptomatology and managemen**t. Fertil Steril, v. 36, p. 433-445, 1981.

CALAFAT, A. M., KUKLENYIK, Z., REIDY, J. A., CAUDILL, S. P., EKONG, J., AND NEEDHAM, L. L. **Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population**. Environmental health perspectives, v. 113, p. 391-395, 2005,

CALAFAT, A. M., YE, X., WONG, L. Y., REIDY, J. A., AND NEEDHAM, L. L. **Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004**. Environmental health perspectives, v. 116, p. 39-44, 2008.

CHEN, Y. **Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo.** Endocrinology n. 148, p. 3580–3590, 2007.

CHEN, V. W. et al. **Pathology and classification of ovarian tumors.** Cancer, v. 97, p. 2631-2642, 2003.

CHEN, I. et al. **Indole-3-carbinol and diindolylmethane as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agnosits and antagonists in T47D human breast cancer cells. Biochem. Pharmacol.,** n. 51, p. 1069—1076, 1996.

CHING-YI, H. et al. **Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells in Vitro and in Vivo.** Cancer Research, n. 58, p. 3833-3838, 1998.

CHU, S.; FULLER, P. J**. Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene.** Mol Cell Endocrinol, n. 132, p. 195–199, 1997.

CIMAFRANCA, M. A. et al. **Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice.** Biology of Reproduction, v. 83, p. 114–121, 2010.

COGLIANO, V. J. et al. **Preventable exposures associated with human cancers.** J Natl Cancer Inst. v. 103, p. 1827-1839, 2011.

COLERANGLE, J. B., AND ROY, D. **Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats**. J Steroid Biochem Mol Biol, v. 60, p.153-160, 1997.

COSER K. R. et al. **Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray**. Proc Natl Acad Sci USA, v. 100, n. 24, p. 13994–13999, 2003.

COWARD, L. **Genistein and diadzein, and their-glucoside conjugate: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asin diets**. J Agric Food Chem, n. 41, p. 1961-1967, 1993.

DELCLOS, K. B. *et al.*,Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats, Reproductive Toxicology, v. 15, p. 647–663, 2001.

CURRIE , A. J. et al. **Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus**, Infect Immun., n. 79, p. 1588-1596, 2011.

DE GROUCHY, J. **Cancer and the evolution of species: a ransom**. Biomedicine, n. 78, p. 6-8, 1973.

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

DODDS, E. C.; LAWSON, W. **Proceedings of the Royal Society of London**. Biological Sciences, v. 125, n. 839, p. 222-232, 1938.

DURANDO, M., KASS, L., PIVA, J., SONNENSCHEIN, C., SOTO, A. M., LUQUE, E. H., AND MUNOZ-DE-TORO, M.. **Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats.** Environmental health perspectives v. 115, p.80-86, 2007.

EMONS, G., FLECKENSTEIN, G., HINNEY, B., HUSCHMAND, A., HEYL, W. **Hormonal interactions in endometrial cancer.** Endocr. Relat. Cancer, n. 7, p. 227–242, 2000.

ENGEL, S. M., LEVY, B., LIU, Z., KAPLAN, D., AND WOLFF, M. S. **Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid**. *Reprod Toxicol,* v. 21, p. 110-112, 2006.

FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C., **PARKIN. Cancer incidence and mortality worldwide:** IARC Cancer Base, n. 10, 2008.

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

FORSBERG, J.G. **Estrogen, vaginal cancer, and vaginal development.** Am. J. Obstet. Gynecol.. v. 113, p. 83-87, 1972.

GAO, X. **Endocrine Disruption by Indole-3-carbinol and Tamoxifen: Blockage of Ovulation,** Toxicol Appl Pharmacol, v. 183, p. 179-188, 2002.

GINSBURG, M. et al. **Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation**. Development, 110, p. 521–8, 1990.

GLATSTEIN I. Z., YEH J. **Ontogeny of the estrogen receptor in the human fetal uterus. J Clin Endocrinol Metab**. v. 80, p. 958–964, 1995.

GRADY, D. & ERNSTER, V. L. **Endometrial Cancer**. New York: Oxford University Press p. 1058–1089, 1996.

GRASSI, T. F. et al. **Evaluation of carcinogenic potential of diuron in a rat mammary two-stage carcinogenesis model.** Toxicol Pathol, n. 39, v. 3, p. 486-95, 2011.

GRAY, G. M., COHEN, J. T., CUNHA, G., HUGHES, C., MCCONNELL, E. E., RHOMBERG, L., SIPES, I. G., MATTISON, D. **Weight of the evidence evaluation of low-dose reproductive and developmental effects of bisphenol A.** Human and ecological risk assessment, v. 10, p. 875–921, 2004.

GRUUBS, C.J. **Chemoprevention of chemically induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol**, Anticancer research, n.15, p.709-716, 1995.

GUTENDORF, B., WESTENDORF, J. **Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens**, v. 166, p. 79–89, 2001.

HAIGHTON, L. A., HLYWKA, J. J., DOULL, J., KROES, R., LYNCH, B. S., AND MUNRO, I. C. **An evaluation of the possible carcinogenicity of bisphenol A to humans**. Regul Toxicol Pharmacol, v. 35, p. 238-254, 2002.

HATCH, E. E. et al., **Cancer Risk in Women Exposed to Diethylstilbestrol In Utero**, JAMA, v. 280, n.7, p. 630-634, 1998.

HE Y. H.; SCHUT, H. A. **Inhibition of DNA adduct formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by dietary indole-3-carbinol in female rats.** J Biochem Mol Toxicol, n. 13, p. 239-47, 1999.

HONG, C. **Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells.** Biochem Pharmacol, n. 63, p. 1085-1097, 2002.

HOWDESHELL, K. L., HOTCHKISS, A. K., THAYER, K. A., VANDENBERGH, J. G., AND VOM SAAL, F. S. **Exposure to bisphenol A advances puberty.** Nature, v. 401, p. 763-764, 1999.

HERBST, A. L., ULFELDER, H., POSKANZER, D. C. **Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women**. N. Engl. J. Med., v. 284, p. 878-881, 1971.

HONMA, S., SUZUKI, A., BUCHANAN, D. L., KATSU, Y., WATANABE, H., IGUCHI, T. **Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction.** Reprod Toxicol, v. 16, p. 117–22, 2002.

HORN, T. L. et al. **Modulations of P450 mRNA in liver and mammary gland and P450 activities and metabolism of estrogen in liver by treatment of rats with indole-3-carbinol.** Biochem. Pharmacol, n. 64, p. 393—404, 2002.

HORN, L. C. **Histopathology of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma: An update,** Annals of Diagnostic Pathology n. 11, p. 297–311, 2007.

HUBER, J. **Phytoestrogens and SERMS, alternatives to classical hormone therapy?** Ther. Umsch. n. 57, p. 651–654, 2000.

HUDSON, E. A. et al. **Growth-inhibitory effects of the chemopreventive agent indole-3-carbinol are increased in combination with the polyamine putrescine in the SW480 colon tumour cell line.** Cancer, n. 3, p. 2, 2003.

IARMARCOVAI, G., BONASSI, S., BOTTA, A., BAAN, R.A., ORSIÈRE, T. **Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature.** Mutat Res, v. 658, p. 215-33, 2008.

IGUCHI, T. **Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro.** Biol Reprod, n. 43, p. 478–484, 1990.

JEFFERSON, W. N., COUSE, J. F., BANKS, E. P., KORACH, K. S., NEWBOLD, R. R. **Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice.** Biol Reprod, v. 62, p. 310–317, 2000.

JEFFERSON, W. et al**. Neonatal Genistein Treatment Alters Ovarian Differentiation in the Mouse: Inhibition of Oocyte Nest Breakdown and Increased Oocyte Survival**, Biology Of Reproduction, n. 74, p. 161–168, 2006.

JEFFERSON, W. N. et al. **Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions.** Biol Reprod, n. 67, p. 1285–1296, 2002.

JONGEN, W. **Glucosinolates in brassica: occurrence and significance as cancer-modulating agents.** Proc. Nutr. Soc., n. 55, p. 433-446, 1996.

KALUDJEROVIC, J. *et al.* **Early life exposure to genistein and daidzein disrupts structural development of reproductive organs in female mice.** Journal of Toxicology and Environmental Health, v. 75, p. 649-660 , 2012.

KANG, K.S., CHE, J.H., LEE, S. **Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level**. Food Chem. Toxicol, v. 40, p. 43–51, 2002.

KANG, J. H., KONDO, F., AND KATAYAMA, Y. **Human exposure to bisphenol A.** Toxicology v. 226, p. 79-89, 2006.

KATDARE, M. et al. **Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in preneoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals**. Oncol Rep, n. 5, p. 311-315, 1998

KATO, K., et al. **Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis.** Jpn J Cancer Res. v. 91, n. 8, 786-791, 2000.

KATO, S. et al. **Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase,** Science, n, 270, p. 1491–1494, 1995.

KAZI, A. et al. **Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein**. Biochemical Pharmacology, n. 66, v. 6, p. 965–976, 2003.

KIM, Y.S., MILNER, J.A. **Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention.** J Nutr Biochem v. 16, p.65–73, 2005.

KITAJEWSKI, J.; SASSOON, D. The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive , Bioessays, v. 22, p. 902–910, 2000.

KITAMURA, S. et al. **Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A.** Biochem Biophys Res Commun, n. 293, p. 554–559, 2002.

KOBAYASHI, K., MIYAGAWA, M., WANG, R., SEKIGUCHI, S., SUDA, M., HONMA, T. **Effects of in Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A on Somatic Growth and Anogenital Distance in F1 Rat Offspring.** Industrial Health, v. 40, p. 375–381, 2002.

KOJIMA, T., et al. **Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol.** Cancer Res., n. 54, p. 1446—1449, 1994.

KOONTZ et al., **Frequent fusion of the JAZF1 and JJAZ1 genes in endometrial stromal tumor**s, Proc Natl Acad Sci U S A, v. 98, n. 11, p. 6348–6353. 2001.

KOSARY, C. L. **FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecologic system: An analysis of 1973–87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina.** Semin Surg Oncol, v. 10, p.31, 1994.

KRISHNAN, A. V., STATHIS, P., PERMUTH, S. F., TOKES, L., AND FELDMAN, D. **Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving.** Endocrinology v. 132, p. 2279-2286, 1993.

KUIPER, G. G., LEMMEN, J. G., CARLSSON, B., CORTON, J. C., SAFE, S. H., VAN DER SAAG, P. T., VAN DER BURG, B., GUSTAFSSON, J. A. **Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta**. Endocrinology, v. 139, p. 4252–4263, 1998.

KURUTO-NIWA, R., TATEOKA, Y., USUKI, Y., AND NOZAWA, R. **Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum.** Chemosphere v. 66, p. 1160-1164, 2007.

KUSHNER, D. **Vaginal Cancer.** Glob. libr. women's med. p. 1756-2228, 2011

KWON, S., STEDMAN, D. B., ELSWICK, R. C., CATTEY, R. C., WELSCH, F. **Pubertal development and reproductive functions of Crl: CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development.** Toxicol Sci, v. 55, p. 399–406, 2000.

LAMARTINIERE, C. A., ZHANG, J. X., AND COTRONEO, M. S. **Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity.** Am J Clin Nutr, v. 68, p. 1400-1405, 1998.

LAPENSEE, E. W., TUTTLE, T. R., FOX, S. R., AND BEN-JONATHAN, N. **Bisphenol A at low nanomolar doses confers chemoresistance in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells**. Environmental health perspectives, v. 117, p. 175-180, 2009.

LARSEN-SUM S. A.; WILLIAMS, D. E. **Transplacental Exposure to Indole-3-carbinol Induces Sex-Specific Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in the Liver of Fischer 344 Neonatal Rats**, Toxicological Sciences, v. 64, p. 162–168, 2001.

LEE, J. S. et al. **Transcriptional ontogeny of the developing liver. BMC Genomics**, n. 13, p. 33 2012.

LEONG H. et al. **Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial c ancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth fator – α expression**, Carcinogenesis, v.22, n.11, p. 1809-1817, 2001.

LEMMEN, J. G., BROEKHOF, J. L. M., KUIPER, G. G. J. M., GUSTAFSSON, J. A., VAN DER SAAG, P. T., VAN DER BURG, B. **Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogensis.** Mech Dev, v. 81, p. 163–167, 1999.

LI, X., HALES, K. H., WATANABE, G., LEE, R. J., PESTELL, R. G., HALES, D. B. **The effect of tumor necrosis factor-alpha and cAMP on induction of AP-1 activity in MA-10 tumor Leydig cells**. Endocrine, v. 6, p. 317–324, 1997.

LIAN, Z., NIWA, K., TAGAMI, K., HASHIMOTO, M., GAO, J., YOKOYAMA, Y., MORI, H., TAMAYA1, T. P**reventive Effects of Isoflavones, Genistein and Daidzein, on Estradiol-17β-related Endometrial Carcinogenesis in Mice**, Jpn. J. Cancer Res. v. 92, p. 726–734, 2001.

LIEHR, J. G. **Genotoxicity of the steroidal estrogens oestrone and oestradiol: possible mechanisms of uterine and mammary cancer development.** Human Reproduction Update, v. 7, p. 273–281, 2001.

LIEHR, J.G. et al. **4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine tumorigenesis**. Proc. Natl Acad. Sci, n. 92, p. 9220—9224, 1995.

LIU. H, et al**. Indolo[3,2-b]carbazole: A dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic and estrogenic activity.** J Natl Cancer Inst, n. 86, p. 1758-1765, 1994.

LOOSE-MITCHELL, D. S. et al. **Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid.** Mol Endocrinol n. 2, p. 946–950, 1988.

LU, L.-J. W., ANDERSON. K. E., GRADY, J. J., KOHEN, F., NAGAMANI, M. **Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention**. *Cancer Res.*, v. 60, p. 4112–4121, 2000.

MANAS, E. S. **Understanding the Selectivity of Genistein for Human Estrogen Receptor-B Using X-Ray Crystallography and Computational Methods**, Structure, v. 12, p. 2197–2207, 2004.

MARKEY, C.M., MICHAELSON, C.L., SONNENSCHEIN, C., SOTO, A.M. **Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens.** Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; v. 3, p. 129–153, 2001.

MARKEY, C. M., MICHAELSON, C. L., VESON, E. C., SONNENSCHEIN, C., AND SOTO, A. M. **The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A**. Environmental health perspectives, v. 109, p. 55-60, 2001b.

MARKEY, C. M., COOMBS, M.A., SONNENSCHEIN, C., SOTO, A. M. **Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs.** Evol Dev, v. 5, p. 67–75, 2003.

MARKEY, C. M. et al. **The Mouse Uterotrophic Assay: A Reevaluation of its Validity in Assessing the Estrogenicity of Bisphenol A**, Environmental Health Perspectives, v. 109, n. 1, 2001.

MARKEY et al. **Long-Term Effects of Fetal Exposure to Low Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A in the Female Mouse Genital Tract.** Biology of Reproduction, n. 72, p. 1344–1351, 2005.

MCCORMACK, S. A.; GLASSER, S. R. **Differential response of individual uterine cell types from immature rats treated with estradiol**. Endocrinology, n. 106, p. 1634–1649, 1980.

MCLACHLAN, J. A., NEWBOLD, R. R.. AND BULLOCK, B. C. **Long-term effects on the female genital tract after prenatal exposure to diethylstilbestrol**. Cancer Res., v. 40, p. 3988-3999, 1980.

MCLAREN, A. **Mammalian germ cells: birth, sex, and immortality**. Cell Struct Funct, n. 26, p. 119–122, 2001.

MENG, Q. et al. **Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells.** J. Nutr. n. 130, p. 2927–2931, 2000a

MENG, Q. et al. **Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes**. J. Mol. Med. n.78, p. 155–165, 2000b.

MERLO, L. M. F. et al. **Cancer as an evolutionary and ecological process**. Nature Reviews, n. 6 p. 924–935, 2006.

MICHNOVICZ, J. J.; BRADLOW, H. L. **Induction of Estradiol Metabolism by Dietary Indole-3-carbinol in Humans,** JNCI J Natl Cancer Inst, n. 82, v. 11, p. 947-949, 1990.

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

MIGLIACCIO, A. et al. **Src-dependent signalling pathway regulation by sex-steroid hormones: therapeutic implications**. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, n. 39, p. 1343–1348, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (INCA), **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil,** Disponível em < www.inca.gov.br/estimativa/2012/> Acesso em: 20 de Setembro de 2012.

MORAL, R. et al. **Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature**. J Endocrinol, n. 196, p. 101-12, 2008.

MORIYAMA, K. et al. **Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist.** J Clin Endocrinol Metab, n. 87, p. 5185–5190, 2002.

MUELLER, S.O. **Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor ERα and ER?.** Toxicol Sci, n. 80, p.14-25, 2004.

MUNOZ-DE-TORO, M., MARKEY, C. M., WADIA, P. R., LUQUE, E. H., RUBIN, B. S., SONNENSCHEIN, C., AND SOTO, A. M. **Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice.** Endocrinology, v. 146, p. 4138-4147, 2005.

MURPHY, G.P., LAWRENCE, L, LENHARD, R.E. **American Cancer Society textbook of clinical oncology**. American Cancer Society, v. 2, p. 552-579, 1995.

MUTTER et al., **Allelotype Mapping of Unstable Microsatellites Establishes Direct Lineage Continuity between Endometrial Precancers and Cancer**, Cancer Res, v. 56, p. 4483-4486, 1996.

MUTTER et al., **Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers,** J Natl Cancer Inst, v. 92, n. 11, p. 924-930, 2000.

MYERS, M. et al., **Methods for quantifying follicular numbers within the mouse Ovary**, Reproduction, n.127, p. 569–580, 2004.

NAROD, S.A., MADLENSKY, L., BRADLEY, L., COLE, D., TONIN, P., ROSEN, B, RISCH, H.A. **Hereditary and familial ovarian cancer in Southern Ontario**. Cancer, v. 74, p. 2341–2346, 2004.

NACHSHON-KEDMI, M. et al. **Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells.** Food Chem Toxicol, n. 41, p. 745-752, 2003.

NEGRI-CESI, P. et al. **Presence of 5α-Reductase isozymes and aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue**, The Prostate, v. 34, p. 283–291, 1998.

NEWBOLD, R. R. & MCLACHLAN, J. A. **Vaginal Adenosis and Adenocarcinoma in Mice Exposed Prenatally or Neonatally to Diethylstilbestrol.** Cancer Research, v. 42, p. 2003-2011, 1982.

NEWBOLD R. R. et al. **Uterine carcinoma in mice treated neonatally with tamoxifen**. Carcinogenesis, n. 18, p. 2293–2298, 1998.

NEWBOLD, R. R. **Uterine adenocarcinoma in mice following developmentaltreatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis.** Cancer Research. n. 50, p. 7677–7681, 1990.

NEWBOLD R. R., HANSON R. B., JEFFERSON W. N. **Ontogeny of lactoferrin in the developing mouse uterus: a marker of early hormone response**. Biol Reprod. v. 56, p. 1147–1157, 1997.

NEWBOLD, R. R., DIAUGUSTINE, R. P., RISINGER, J. I., EVERITT, J.I., WALMER, D. K., PARROTT, E. C., DIXON, D. **Advances in Uterine Leiomyoma Research: Conference Overview, Summary, and Future Research Recommendations**. Environmental Health Perspectives, v. 108, p. 769-773, 2000.

NEWBOLD, R. R., JEFFERSON, W. N., PADILLA-BANKS, E. **Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract.** Reproductive Toxicology, v. 24, p. 253–258, 2007.

NING , X.; ISHIDA, H. **Phenolic materials via ring-opening polymerization: Synthesis and characterization of bisphenol-A based benzoxazines and their polymers**, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, v. 32, p. 1121–1129, 1994.

NIWA, K., MURASE, T., FURUI, Y., MORISHITA, S.,MORI, H.,TANAKA, T., MORI, H.,TAMAYA, T. **Enhancing Effects of Estrogens on Endometrial Carcinogenesis Initiated by N-Methyl-N-nitrosourea in ICR Mice**, v. 84, p. 951–955, 1993.

NORDIN, A. **Primary carcinoma of the fallopian tube: a 20 year literature review.** Obstet Gynecol Surv, v. 49, p. 349-61, 1994.

OKURA, A., ARAKAWA, H., OKA, H., YOSHINARI, T., AND MONDEN, Y. **Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cell**s. Biochem Biophys Res Commun, v. 157, p.183-189, 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Programme on Chemical Safety**, 2002.

PAPACONSTANTINOU, A. D. B**isphenol A-Induced Increase in Uterine Weight and Alterations in Uterine Morphology in Ovariectomized B6C3F1 Mice: Role of the Estrogen Receptor**, Toxicol. Sci.)v. 56, n. 2, p. 332-339, 2000.

PAUL, N., LAWTON, F. **Fallopian Tube Carcinoma – A review**. Ann Acad Med Singapore, v. 27, p. 693-697, 1998.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. **Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles.** Dev Biol, n. 234, p.339–351, 2001.

PEPLING, M. E**. Follicular assembly: Mechanisms of action.** Reproduction, n. 143, p. 139–149, 2012.

PERSICO, E. et al. **Activation of 'immediate-early' genes by estrogen is not sufficient to achieve stimulation of DNA synthesis in rat uterus**. Biochem Biophys Res Commun, n. 171, p. 287–292, 1990.

PIAZZA, M. J., URBANETZ, A. A., DE CARVALHO, N. S. **Molecular biology in gynecological neoplasms: genetic aspects**, FEMINA, vol 38, n. 12, 2011.

QUADE, B. J. et al., **Frequent loss of heterozygosity for chromosome 10 in uterine leiomyosarcoma in contrast to leiomyoma.** Am J Pathol., v. 154, n.3, p. 945-950, 1999.

RAHMAN, K. M. et al. **Translocation of Bax to mitochondria induces apoptotic cell death in indole-3-carbinol (I3C) treated breast cancer cells**. Oncogene, n. 19, p. 5764-5771, 2000.

RAHMAN, K. M. et al. **Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells**. Nutr Cancer, n. 45, p.101-112, 2003.

REINWALD S.; WEAVER, C. M. **Soy isoflavone and bone health: a double edge sword?** J. Nat. Prod., n. 69, p. 450-459, 2006.

RIMAN et al., **Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence**, Clinical Endocrinology, v. 49, p. 695–707, 1998.

RODRÍGUEZ, H. A. et al**. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary.** Reprod Toxicol, n. 30, p. 550–557, 2010.

ROY, S. K.; ALBEE L. **Requirement for follicle-stimulating hormone action in the formation of primordial follicles during perinatal ovarian development in the hamster**. Endocrinology, n.141, p. 4449–4456, 2000.

ROUTLEDGE, E. J. et al. **Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) a and ER b.** J Biol Chem, n. 275, p. 35986–35993, 2000.

RUBIN, B.S., MURRAY, M. K., DAMASSA, D. A., KING, J. C., SOTO, A.M. **Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels**. Environ Health Perspect, v. 109, p. 675–680, 2001.

SAITOU, M.; BARTON, S.C.; SURANI, M. A. **A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice.** Nature, n. 418, p. 293–300, 2002.

SAKUMA, Y. **Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat.** Journal of Neuroendocrinology, n. 21, p. 410–414, 2009.

SCHILDKRAUT, J.M., BASTOS, E. & BERCHUCK, A. **Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer.** Journal of the National Cancer Institute, v. 89, p. 932–938, 1997.

SCHOËNFELDER, G., FLICK, B., MAYR, E., TALSNESS, C., PAUL, M., CHAHOUD, I. **In Utero Exposure to Low Doses of Bisphenol A Lead to Long-term Deleterious Effects in the Vagina1**. Neoplasia . v. 4, n. 2, p. 98 – 102, 2002.

SHUGHRUE, P. J. **The distribution of estrogen receptor-β mRNA in the rat hypothalamus**, Steroids n. 61, p. 678–681, 1996.

SHARPE, R. M., AND SKAKKEBAEK, N. E. **Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract**?, v. 341, p. 1392-1395, 1993.

SHERMAN, M. E. **Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach.** Mod. Pathol., n.13, p. 295–308, 2000.

SIEGEL, R. et al. **Cancer Statistics**. Ca Cancer J Clin, n. 63, p. 11–30, 2013.

SINGLETON, D. W., FENG, Y., YANG, J., PUGA, A., LEE, A. V., AND KHAN, S. A. **Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-alpha-positive human cells.** Environ Res, v. 100, p. 86-92, 2006.

SOHONI, P.; SUMPTER, J. P. **Several environmental oestrogens are also anti-androgens. J Endocrinol**, n. 158, p. 327–339, 1998.

STANISIC´, V. et al. **Modulation of steroid hormone receptor activity**. Progress in Brain Research, n. 181, p. 153–176, 2010.

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

SUN, Y., IRIE, M., KISHIKAWA, N., WADA, M., KURODA, N., AND NAKASHIMA, K. **Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection.** Biomed Chromatogr, v. 18, p. 501-507, 2004.

SUSIARJO, M. et al. **Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse**. PLoS Genet, n.3, p.5, 2007.

TAKAHASHI, O., AND OISHI, S. **Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses**. Environmental health perspectives, v. 108, p. 931-935, 2000.

TAKASUGI, N. **Cytological basis for permanent vaginal changes in mice treated neonatally with steroid hormones**. Int. Rev. Cytol., v. 44, p. 193-224, 1976.

TALSNESS, C. E., SHAKIBAEI, M., KURIYAMA, S. N., GRANDE, S. W., STERNER-KOCK, A., SCHNITKER, P., DE SOUZA, C., GROTE, K., CHAHOUD, I. **Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant.** Toxicol Lett, v. 157, p. 189–202, 2005.

TELANG, N. T. et al. **Negative growth regulation of oncogene-transformed mammary epithelial cells by tumor inhibitors.** Adv. Exp. Med. Biol. n. 400 p. 409–418, 1997.

THARPA, A. P. et al. **Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland**, v. 109, n. 21, 2012.

THIAGARAJAN, D. G.; BENNINK, M. R.; BOURQUIN, F.A. **Prevention of precancerous colonic lesions in rats by soy flakes, soy flour, genistein, and calcium,** Am. J. Clin. Nutr. n. 68, p. 1394-1399, 1998.

THOMAS, P.; DONG, J. **Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens,** Endocrine Reviews, n. 30, v. 1, p. 75–95, 2006.

TOPHKHANE, C. et al. **Bcl-2 overexpression sensitizes mcf-7 cells to genistein by multiple mechanisms.** International Journal of Oncology, n. 31, v. 4, p. 867–874, 2007.

TORNQVIST, M., AND EHRENBERG, L. **On cancer risk estimation of urban air pollution**. Environmental health perspectives, v. 102 p. 173-182, 1994.

UPADHYAY, S. et al. **Differential sensitivity of normal and malignant breast epithelial cells to genistein is partly mediated by p21(waf1).** Clinical Cancer Research, n. 7, v. 6, p. 1782–1789, 2001.

VANDENBERG, L. N. et al. **BPA and the Great Divide a potential novel mechanism of endocrine disruption.** J Steroid Biochem Mol Biol, n. 102, p. 175–179, 2009.

VIEAU, D. **Perinatal programming of health and metabolic adult disease**. World J, Diabetes, n. 2, p. 133-136, 2011.

VOLLMER, G. **Endometrial cancer: experimental models useful for studies on molecular aspects of endometrial cancer and carcinogenesis.** Endocrine-Related Cancer, v. 10, p. 23–42, 2003.

VOM SAAL, F. S. et al. **Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstil bestrol and opposite effects at high doses**. Proc National Acad Sciences, n. 94, p. 2056–2061, 1997.

WANG, T. T.; SATHYAMOORTHY, N.; PHANG, J. M. **Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathway.** Carcinogenesis, v. 17, p. 271–275, 1996.

WATSON, C. S., BULAYEVA, N. N., WOZNIAK, A. L., AND FINNERTY, C. C. **Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens.** Steroids, v. 70, p. 364-371, 2005.

WATSON, C.S. et al. **Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses**, Steroids, n. 72, p. 124–134, 2007.

WEI, H. et al. **Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein.** Nutr Cancer. n. 20, p. 1–12, 1993.

WEIDERPASS, E., LABRÈCHE, F. **Cancers of the Female Reproductive System.** Saf Health Work, v. 3, p. 166-80, 2012.

WELSHONS, W. V., NAGEL, S. C., AND VOM SAAL, F. S. **Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure**. Endocrinology , v. 147, p. 56-69, 2006.

WENG, J.R., TSAI, C.H., KULP, S.K., CHEN, C.S. **Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent.** Cancer Lett, v. 262, p. 153–163, 2008.

WICKERHAM, D. L., FISHER, B., WOLMARK, N., BRYANT, J., COSTANTINO, J., BERNSTEIN, L., RUNOWICZ, C. D. **Association of tamoxifen and uterine sarcoma**. J Clin Oncol, v. 20, p. 2758-60, 2002.

WEIGEL, N. L.; MOORE, N. L. **Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions**. Molecular Endocrinology, n. 21, p.2311–2319, 2007.

WILSON,A.M., REED,G.A. **Predominant 4-hydroxylation of estradiol by constitutive cytochrome P450s in the female ACI rat liver.**Carcinogenesis, v. 22, p. 257-263, 2001.

WINUTHAYANON, W. **Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses**, PNAS, n. 107, v. 45, p.19272-19277, 2010.

WISEMAN, H. **The bioavailability of non-nutrient plant factors: dietary flavonoids and phyto-oestrogens**. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 58, p. 139–146, 1999.

WISEMAN, H.; DUFFY, R. **New advances in the understanding of the role of steroids and steroid receptors in disease.** Biochem. Soc. Trans. n. 29, p.205–2092, 2001

YAMADA, H., FURUTA, I., KATO, E. H., KATAOKA, S., USUKI, Y., KOBASHI, G., SATA, F., KISHI, R., AND FUJIMOTO, S. **Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester**. *Reprod Toxicol,* v. 16, p. 735-739, 2002.

YOSHIDA, M. **Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development inrats initiated with N-ethyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism.** Carcinogenesis, v. 25, n. 11, p. 2257--2264, 2004.

YOSHIDA, A. et al. **Effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure on morphology and growth patterns of endometrial epithelial cells in CD-1 mice**. Toxicol Pathol, n. 27, p. 325–333, 1999.

YOSHIMI, N., SATO, S., MAKITA, H., WANG, I., AINOSA, Y., TANAKA, T. AND MORI, H. **Expression of cytokines, TNF-α and IL-1α in MAM acetate and 1-hydroxyanthraquinoneinduced colon carcinogenesis of rats.** Carcinogenesis, v. 15, p. 783–785, 1994.

ZALKO, D., SOTO, A. M., DOLO, L., DORIO, C., RATHAHAO, E., DEBRAUWER, L., FAURE, R., AND CRAVEDI, J. P. **Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice.** Environmental health perspectives, v. 111, p. 309-319, 2003.

ZHANG, H. Q. et al. **Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes**. Mol Biol Rep, n. 39, p. 5651–5657, 2012.

ZHOU, J. R. **Soy and the prevention of lifestyle-related diseases. Clin Exp Pharmacol Physiol,** v. 31, p. 14-19, 2004.

ZHU, B. T.; CONNEY, A. H. **Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives.** Carcinogenesis, n. 19, p. 1—27, 1999.