



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RESPOSTA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DO METABOLISMO
INTERMEDIÁRIO DE RATOS WISTAR MACHOS TRATADOS COM
NONILFENOL ETOXILADO

EDUARDO POMPEO DE MATOS

Caxias do Sul

2018

EDUARDO POMPEO DE MATOS

RESPOSTA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DO METABOLISMO
INTERMEDIÁRIO DE RATOS WISTAR MACHOS TRATADOS COM
NONILFENOL ETOXILADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia. Orientador: Prof.
Dr. Jomar Pereira Laurino, Co-orientadores:
Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn e Prof. Dr.
Andrés Delgado Cañedo.

Caxias do Sul

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M433r Matos, Eduardo Pompeo de

Resposta do sistema imunológico e do metabolismo intermediário de ratos Wistar machos tratados com nonilfenol etoxilado / Eduardo Pompeo de Matos. – 2018.

62 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Jomar Pereira Laurino.

Coorientação: Matheus Parmegiani Jahn, Andrés Delgado Cañedo.

1. Sistema imunológico. 2. Ratos. 3. Triglicérides. I. Laurino, Jomar Pereira, orient. II. Jahn, Matheus Parmegiani, coorient. III. Delgado Cañedo, Andrés, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 612.017

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

EDUARDO POMPEO DE MATOS

RESPOSTA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DE RATOS WISTAR MACHOS TRATADOS COM NONILFENOL ETOXILADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino

Co-orientadores: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn e Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16 DE ABRIL DE 2018

Orientador: Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino

Co-orientadores: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn
e Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Profª. Dra. Valderez Bastos Valero-Lapchik (UNIFESP)

Profª. Dra. Marli Camassola

Profª. Dra. Rosane Maria Lanzer

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Jomar Pereira Laurino, e aos co-orientadores deste trabalho, professores Matheus Parmegiani Jahn e Andrés Delgado Cañedo, por aceitarem orientar em conjunto um trabalho que envolveu um projeto piloto, e ao professor Alois Eduard Shafer por também ter acreditado nesse projeto, compreendendo as dificuldades e desafios envolvidos.

À agência de fomento CAPES pelo suporte financeiro e à Universidade de Caxias do Sul pela excelente infraestrutura de pesquisa, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho e aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelas contribuições a minha formação acadêmica.

Aos amigos que a Biologia me trouxe, Keoma da Silva, Cibele Tremea e Vanessa Alves Gomes, por todo o suporte, não somente na parte da pesquisa como também no apoio emocional que tanto necessitamos.

À Simone Maria Andriolo Gross e Raquel Brandelise, do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, pelo auxílio no manuseio dos animais estudados, trabalhando com muito respeito e profissionalismo.

A todo o grupo do projeto Lagoas Costeiras 3, pelas trocas de experiências, pelos momentos de descontração e de boa convivência, tornando a rotina do mestrado mais leve.

A todos os amigos que participaram direta ou indiretamente desta fase, pela paciência, apoio e incentivo fornecidos.

Ao meu amor, Bárbara Maccagnan, que sempre esteve ao meu lado nesses anos, dando todo o suporte que eu precisava, me apoiando nas decisões difíceis e me encorajando a sempre seguir em frente. Nunca serei capaz de retribuir tudo o que tu fez e faz por mim.

A toda minha família, mãe Carla Erlo Santos de Matos, pai Luiz Alberto Pompeo de Matos, irmão Gustavo Pompeo de Matos, avó Maria Erlo, tia Cátia Maria Erlo, por terem me proporcionado a possibilidade de uma ótima formação acadêmica e pessoal e também por todo o suporte que me deram. E a minha família emprestada Wilson Maccagnan, Andréa Maccagnan e Caetano Maccagnan, por todos os momentos de alegria que tivemos juntos e por serem também meu porto seguro.

ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	13
3.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	13
3.2 NONILFENOL.....	16
3.2.1 EFEITOS DO NONILFENOL EM CÉLULAS ANIMAIS	21
3.3 EDCs E SISTEMA IMUNOLÓGICO	22
3.4 CÉLULAS TEMRA	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	53
6. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	54

RESUMO

O nonilfenol etoxilado (NPE) é um desregulador endócrino que está presente no meio ambiente devido ao seu uso como detergente nos processos de limpeza de efluentes industriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do NPE sobre o sistema imune adaptativo em ratos Wistar machos. Nestes animais foram avaliados o efeito do NPE sobre as células linfocitárias periféricas através da realização de hemograma e do perfil linfocitário adaptativo, analisando os marcadores de superfície CD4, CD8, CD28 e CD45 RA. Foi também avaliado o efeito do tratamento sobre o fígado e baço, bem como sobre o metabolismo intermediário, através das análises de glicemia, triglicerídeos e colesterol. Os dados não demonstraram diferenças significativas em relação ao índice hepático e esplênico. O nível de triglicerídeos apresentou um aumento de 50% nos grupos tratados, na avaliação dos níveis de colesterol e glicose não foi demonstrado diferenças significativas entre os grupos. Os resultados indicaram que o número de linfócitos e monócitos dos grupos tratados tiveram uma queda significativa de aproximadamente 25% e 50% em relação ao grupo controle. Foi demonstrado que o número de células fortemente marcadas quanto à presença da proteína CD45RA *High* na superfície celular dos linfócitos é maior nas células dos ratos do grupo tratado e que o tratamento aumenta a relação entre as células CD45RA *High/Dim*. Esses resultados levantam a hipótese que as células aumentadas nos grupos tratados apresentam fenótipo de membrana compatível com células T terminalmente diferenciadas (TEMRA). Este estudo forneceu dados novos sobre a ação do NPE, até onde se tem conhecimento, é a primeira pesquisa a constatar a presença elevada de células TEMRA em animais tratados com NPE, contribuindo com um novo foco para futuras pesquisas dessa substância.

Palavras-chave: Sistema imune adaptativo, triglicerídeos, citometria de fluxo, hemograma, células TEMRA.

ABSTRACT

Ethoxylated nonylphenol (NPE) is an endocrine disruptor that is present in the environment because of its use as a detergent in the industrial effluent cleaning processes. The objective of this work was to evaluate the influence of ethoxylated nonylphenol (NPE) on the adaptive immune system in male Wistar rats. In these animals, the effect of NPE on peripheral lymphocyte cells was evaluated by performing hemogram and adaptive lymphocytic profile, analyzing CD4, CD8, CD28 and CD45 RA surface markers. The effect of treatment on the liver and spleen, as well as on the intermediate metabolism, was also evaluated through glycemic, triglyceride and cholesterol analyzes. The data did not show significant differences in relation to the hepatic and splenic index. The level of triglycerides presented a 50% increase in the treated groups; in the evaluation of cholesterol and glucose levels, no significant differences between the groups were demonstrated. The results indicated that both, the number of lymphocytes and monocytes of the treated groups had a significant decrease of approximately 25% and 50% relative to the control group. The number of strongly labeled cells for the presence of the CD45RA High protein on the cell surface of the lymphocytes showed to be higher in the cells of the mice in the treated group and that the treatment increases the ratio between the CD45RA High/Dim cells. These results raise the hypothesis that enlarged cells in the treated groups exhibit terminally differentiated T cell (TEMRA). This study provided new data on the action of NPE, to the best of our knowledge, is the first research to verify the elevated presence of TEMRA cells in animals treated with NPE. In addition, these findings contribute a new focus for future research on this substance.

Keywords: Adaptive immune system, triglycerides, flow cytometry, blood count, TEMRA cells.

1 INTRODUÇÃO

O efeito de micropoluentes orgânicos presentes em ambientes aquáticos vem atraindo atenção devido ao seu impacto no meio. Os animais, mesmo estando em seus respectivos habitats naturais, vêm sofrendo alterações fisiológicas e metabólicas que podem ser consequência da exposição dos organismos aos micropoluentes do grupo dos desreguladores endócrinos, responsáveis pela maior parte das mudanças encontradas no sistema endócrino. O efeito destas substâncias é explicado pela semelhança estrutural com vários hormônios. Por este motivo, muitos estudos estão focados em investigar a interferência destes desreguladores sobre o eixo neuro-imuno endócrino.

Os desreguladores são alvos de grande discussão na comunidade científica mundial e tem interesse considerável da mídia. Estudos científicos recentes comprovaram a gravidade e a diversidade dos problemas que podem advir da exposição a essas substâncias. Nas últimas décadas, diversas agências governamentais de âmbito mundial têm considerado a problemática dos desreguladores endócrinos como uma importante área de pesquisa.

Estudos imunotoxicológicos utilizando mamíferos como animais de experimentação ainda são incipientes e os dados de toxicidade de efluentes, águas de poços, águas de consumo ou de outras fontes hídricas são escassos no que tange aos desreguladores endócrinos. Por tanto, é essencial ponderar que estudos que visem a avaliação dos efeitos toxicológicos dos desreguladores endócrinos terão impacto indiscutível à saúde, tanto em seres humanos quanto em outras espécies que utilizam os corpos d'água que recebem despejo de efluentes.

Os efluentes mesmo dentro dos padrões de toxicidade legais estabelecidos possuem diversas substâncias nocivas aos animais. É importante rever quais os tipos de

produtos que podem representar perigo à saúde. Considerando que, os efeitos tóxicos nos organismos mais complexos não se limitam à letalidade, como as observadas no caso da exposição aguda, mas a outros impactos, às vezes “silenciosos”, observados na exposição crônica.

O nonilfenol etoxilado (NPE) é considerado um desregulador endócrino, pela sua semelhança molecular estrutural com o estradiol, que pode inibir ou mimetizar o estrogênio natural se ligando aos seus receptores. É um potente desregulador com efeito estrogênico e muito utilizado no mundo como detergente industrial, sendo facilmente comercializado, também pode ser encontrado principalmente em tintas, pesticidas e em plásticos. O NPE faz parte da categoria dos alquilfenóis etoxilados (APEs) representando 85% do total dos APEs. Sabe-se hoje que o estrogênio e outros ligantes de receptores de estrogênio podem agir sobre a interação do eixo neuro-imuno endócrino, sendo necessário avaliar o papel do nonilfenol diretamente sobre o desenvolvimento e a funcionalidade da resposta imunológica em si.

No Brasil, mesmo com investimentos em sistemas de esgoto e plantas de tratamento, apenas uma pequena porção do volume de esgoto gerado pelas cidades é efetivamente tratada antes de chegar aos corpos hídricos. A liberação de esgoto em corpos de água sem nenhum tratamento é uma das principais causas de depreciação da qualidade da água e, conseqüentemente, da vida. A ausência de recursos básicos adequados para o saneamento compromete o fornecimento público e o uso primário deste recurso.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa foi constatado o uso de NPE, proveniente do Renex 95 um detergente comercial, no tratamento de peças e de efluentes de indústrias metal-mecânicas, o qual acaba sendo liberado nos corpos hídricos.

Esse contexto impõe uma necessidade contínua de encontrar novas fontes de água, tratamentos químicos mais complexos e efetivos para garantir a disponibilidade de água potável, bem como entender, por meio de estudos *in vivo*, os efeitos gerados por determinados tipos de substâncias, como o NPE, sobre diferentes funções fisiológicas, entre estas as do sistema imunológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do consumo subcrônico de nonilfenol etoxilado sobre o sistema imunológico adaptativo e metabolismo intermediário em ratos Wistar machos, visando identificar os efeitos à saúde.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito da ministração do nonilfenol etoxilado sobre a contagem de células sanguíneas de ratos.
- Avaliar a ação da administração do nonilfenol etoxilado sobre o perfil linfocitário adaptativo das amostras sanguíneas de ratos para os marcadores CD4, CD8, CD28 e CD45RA.
- Avaliar o efeito do tratamento com nonilfenol etoxilado sobre o fígado, através de ensaios de função e lesão hepática.
- Verificar a ação do tratamento com nonilfenol etoxilado sobre o metabolismo intermediário, através das análises de glicemia, triglicerídeos e colesterol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

Alguns produtos químicos, conhecidos como desreguladores endócrinos (EDCs, do inglês, *Endocrine Disrupting Chemicals*), podem ter efeitos nocivos sobre diversos sistemas do nosso corpo. Essas substâncias mimetizam a ação de hormônios naturais, inibindo-os ou alterando as funções reguladoras normais dos sistemas imunológico, nervoso e endócrino. Os desreguladores endócrinos interferem na função dos hormônios naturais, e os efeitos sobre a saúde podem aparecer muito tempo depois que a exposição parou (Monneret, 2017).

3.1 Desreguladores Endócrinos

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (1997), um desregulador endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, na secreção, no transporte, na ligação, na ação ou na eliminação de hormônios naturais dos organismos. Estas interferências podem atuar na reprodução, no desenvolvimento e/ou no comportamento, bem como na manutenção da homeostase imunológica animal.

Em geral, os desreguladores endócrinos são compostos muito estáveis e lipofílicos. A função hormonal mais afetada por estes agentes é o mecanismo de sinalização dos esteroides que determinam, principalmente, as características sexuais e comportamentais das espécies (Nogueira, 2003).

Mesmo que as concentrações desses compostos no meio aquático estejam na ordem de $\mu\text{g/L}$ ou mesmo ng/L e pg/L (conhecidos como "micropoluentes"), não podem ser excluídos os efeitos adversos à saúde animal. A consciência pública e governamental sobre os efeitos que estes coquetéis de produtos químicos têm sobre esses recursos tornaram-se um fator importante na redução dos níveis de micropoluentes no ambiente (Lepom *et al.*, 2009).

Os desreguladores endócrinos representam uma gama extensiva de substâncias que podem ser produtos naturais, como os fitoestrogênios (isoflavonas, lignanos e coumestanos) que são produzidos pelas próprias plantas e bastante comuns em produtos de origem vegetal, ou compostos químicos sintéticos (xenoestrogênios), empregados nos mais variados usos industriais, comerciais e domésticos como detergentes (surfactantes), resinas, aditivos e monômeros utilizados na produção de plásticos (Maniero, 2008).

Embora algumas moléculas naturais de origem vegetal possuam propriedades endócrinas, estas geralmente não causam tantos problemas ao homem quanto àquelas de origem xenobióticas, uma vez que essas moléculas não se ligam tão fortemente aos receptores hormonais dos animais, sendo facilmente dissociadas de seu receptor e, sobretudo, são também facilmente excretadas e não se acumulam nos tecidos corpóreos (Meyer *et al.*, 1999).

Todavia, alguns xenoestrogênios são produzidos intencionalmente, como no caso de solventes clorados e inseticidas, desenvolvidos para atuar seletivamente sobre o sistema endócrino de insetos específicos, enquanto outros são formados como subprodutos durante o processo industrial, sendo descartados em águas superficiais devido a sua incompleta remoção nas estações de tratamento de efluentes (Maniero, 2008).

Essas substâncias sintéticas com ação desreguladora são geralmente persistentes no ambiente, acumulam-se no solo e nos sedimentos, são transportadas para outras regiões pela atmosfera e podem acumular-se ao longo da cadeia trófica, expondo os animais superiores a maiores riscos. Várias destas substâncias podem ser excretadas por meio do leite materno, constituindo-se, assim, uma fonte de contaminação para mamíferos recém-nascidos (Meyer *et al.*, 1999).

Outros exemplos de desreguladores endócrinos são: o grupo dos esteroides no qual faz parte a estrona e o 17 β - estradiol, o grupo dos compostos poli- aromáticos onde se encontra a bifenila policlorada (PCB), o grupo dos compostos orgânicos oxigenados que possui os ftalatos e o bisfenol, o grupo dos pesticidas, e, o grupo dos alquifenóis onde se enquadra o nonilfenol e o nonifenol etoxilado (Birkett & Lester, 2003).

Em humanos, os hormônios esteroides (androgênios e estrogênios) regulam o processo de desenvolvimento fetal, como a diferenciação sexual. Androgênios, incluindo a testosterona, regulam o desenvolvimento do fenótipo masculino e um distúrbio no nível de esteroides pode causar feminilização de fetos masculinos, caso exista um excesso de compostos estrogênicos ou uma deficiência de androgênios. Por outro lado, fetos femininos podem se tornar masculinizados devido ao excesso de androgênio ou pela falta de estrogênio durante o período de diferenciação sexual (Waring & Harris, 2005).

Os efeitos da exposição do organismo ao desregulador endócrino vai depender de diversos fatores. Além do tempo e grau de exposição, sabe-se que durante os primeiros estágios de vida ele é extremamente mais nocivo do que quando num estado mais avançado. No primeiro caso, os defeitos ou disfunções podem se tornar permanentes, enquanto que no segundo caso, em geral, os efeitos cessam assim que se interrompe a exposição ao desregulador. É comprovado, dessa forma, que o desenvolvimento de diversas doenças envolve a exposição a estes compostos e substâncias. Acredita-se que exemplos disso estejam no câncer de mama, útero e próstata. Além disso, também é possível citar o desenvolvimento sexual anormal, alteração de algumas glândulas, distúrbios nas funções do ovário, fertilização, gravidez, efeitos neurocomportamentais e sobre o sistema imunológico (Kortenkamp & Altenburger, 1998).

3.2 Nonilfenol

Entre as substâncias consideradas desreguladoras endócrinas, está o grupo dos alquifenóis (APs). Estes são estruturalmente formados por uma cadeia carbônica ligada à um grupo fenólico e podem ser utilizados no processo de fabricação dos alquifenóis etoxilados (APEs). Entre eles, estão presentes o octilfenol (OP), nonilfenol (NP) e o nonilfenol etoxilado (NPE). Os dois últimos são mais facilmente encontrados no ambiente natural, não apenas no ar, solo e água, mas também nas plantas, sedimentos, poeira domiciliar e tecidos animais (MDPE, 2010).

Devido à rápida biodegradação do alquifenóis etoxilados, gerando metabólitos mais tóxicos com potencial de desregulação endócrina, a Comissão Européia, através da Diretiva nº 2003/53 / CE, proibiu sua utilização na União Européia, sendo reconhecido como uma das 13 substâncias perigosas prioritárias listadas na União Europeia (União Europeia, 2008).

Desde que nonilfenol foi sintetizado pela primeira vez em 1940, a sua utilização e produção teve aumento de forma quase exponencial (Manzano *et al.*, 1998). Antes da sua proibição na Europa, a produção anual de nonilfenol alcançou 154.200 toneladas nos EUA e 73.500 toneladas na Europa (HELCOM, 2002). Os efeitos do nonilfenol e do nonilfenol etoxilado no ambiente têm sido extremamente controversos. Preocupações surgiram pela primeira vez em 1983-84, quando, na Suíça, Giger *et al.* demonstraram que o nonilfenol etoxilado e produtos de degradação de nonilfenol foram mais tóxicos para a vida aquática do que seus precursores (Giger *et al.*, 1984).

Os acordos da União Europeia (UE) para a eliminação progressiva de compostos nonilfenólicos em meados de 1990 levou a Associação das Indústrias Químicas dos Estados Unidos (USCMA), juntamente com a Agência de Proteção Ambiental (USEPA), iniciarem um estudo para investigar o grau de contaminação de rios e de esgotos tratados

nos Estados Unidos. A partir desse estudo concluiu-se que os etoxilados de nonilfenol foram degradados de forma mais eficiente em esgotos tratados nos EUA do que em seus equivalentes Europeus (Naylor *et al.*, 1992).

A USEPA aceitou os riscos do nonilfenol e preparou um guia para a qualidade da água ambiental que recomenda concentrações de nonilfenol em água doce de até 6,6 µg/L, e em água salgada abaixo de 1,7 µg/L (Brooke & Thursby, 2005). Na União Europeia, o limite máximo de NP no lodo para o uso da terra é de 50 mg/kg (Comissão Europeia, 2002) e o limite em águas superficiais é de 0,3 µg/L (União Europeia, 2008). No entanto, muitos outros países, incluindo China, Índia e vários países sul-americanos, incluindo o Brasil, utilizam e produzem compostos nonilfenólicos em grandes quantidades e nenhuma ação foi tomada, por qualquer um desses países, para reduzir ou eliminar seu uso. Etoxilados de nonilfenol são substituídos por outros surfactantes na maioria dos mercados europeus, canadenses e japoneses, principalmente por etoxilados de álcoois. Estes surfactantes são menos eficientes, mas considerados ambientalmente mais seguros, pois eles degradam-se mais rapidamente (Campbell, 2002).

Os EUA e o Canadá consumiram entre 135 e 180 milhões de quilos por ano de NPE (União Europeia, 2008). O principal uso do NP é a síntese de detergentes líquidos industriais e domésticos (80% da demanda de produção), além de ser responsável pelo crescimento constante do consumo de NP (Vazquez-Duhalt, 2005).

A principal fonte de nonilfenol para o ambiente é a degradação de etoxilados de nonilfenol (Langford & Lester, 2002). Na camada superficial de águas naturais a concentração de nonilfenol pode diminuir devido a fotólise induzida por luz solar (Ahel *et al.*, 1994), mas em sedimentos tem uma meia-vida estimada de mais de 60 anos (Shang *et al.*, 1999).

O nonilfenol encontrado no meio ambiente advém de substâncias como detergentes industriais, dispersantes, emulsificantes, floculantes, tintas, plásticos, óleos e espermicidas. Além disso, também são encontrados em produtos de uso pessoal, como cosméticos e produtos para cabelo e banho (Ahel & Giger, 1985; Lee, 1998; Gerolin, 2008).

Em outros estudos, há afirmações de que o nonilfenol também pode ser encontrado na água comercializada em garrafas feitas de plástico PVC, polietileno de alta densidade (PEAD) e no leite comercializado em embalagens contendo PEAD (Loyo-Rosales *et al.*, 2004), no leite que passou por tubulações industriais constituídas por PVC (Sonnenschein & Soto, 1998), na água de consumo e em efluentes de estações de tratamento de esgoto, em concentrações suficientes para causar a feminilização de peixes (Shiraishi *et al.*, 1989; Sonnenschein & Soto, 1998).

De acordo com uma pesquisa realizada pela *US Geological Survey* investigando 139 córregos em todos os 30 estados nos Estados Unidos durante 1999 e 2000, as concentrações médias e máximas de NP foram de 0,8 e 40 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, com uma frequência de detecção de 50,6% (Kolpin *et al.*, 2002). Em um estudo de água potável de 31 grandes cidades de toda a China o NP foi encontrado em 55 de 62 amostras com concentrações média e máxima de 0,27 e 0,558 $\mu\text{g/L}$ (Fan *et al.*, 2013).

NPE e NP são compostos pouco hidrofílicos e, portanto, espera-se que sejam rapidamente adsorvidos no sedimento. Os valores da concentração para o NP em sedimentos são muito mais altos que aqueles encontrados em águas de superfície, e podem atingir concentrações até 13,7 $\mu\text{g} / \text{kg}$ (Vazquez-Duhalt, 2005).

NP acumula facilmente em animais e corpos humanos devido à sua hidrofobicidade, demonstrando sua grande toxicidade. Portanto, é importante melhorar a precisão da avaliação da exposição ao NP e monitorar seus riscos para a saúde (Zhang *et*

al., 2016). Por exemplo, de acordo com um estudo realizado em Taiwan, NP foi encontrado no leite de mulheres que têm o óleo de peixe em abundância na alimentação, atingindo uma concentração de 4,47 µg/kg (Chen *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2014).

A eficiência de Estações de Tratamento de Água (ETA) na remoção de nonilfenol é altamente variável entre 11% a 99% dependendo do tipo de processo de tratamento empregado na unidade (Berryman *et al.*, 2004). Através de análises por HPLC, um processo de tratamento composto por ozonização e subsequente filtração com carvão ativado com cloração foi capaz de remover 95% do NP (Petrovic *et al.*, 2003).

As diretrizes sobre a qualidade do consumo de água dos EUA são dadas pelo *Safe Drinking Water Act*, estabelecendo o nível máximo de contaminantes que podem ser aceitáveis na água potável. Embora não seja aplicada como uma lei, o guia regula a concentração abaixo da qual não são apresentados riscos para a saúde humana. Além disso, outro guia é a Recomendação Nacional de Critérios de Qualidade da Água (USEPA, 2015).

A regulamentação brasileira é composta basicamente de dois guias: a Resolução 357/2005 da CONAMA (Agência Nacional do Meio Ambiente) (Brasil, 2005), para avaliação de contaminação de corpos d'água e a Resolução 2914 do Ministério Nacional da Saúde, para estabelecer e garantir a utilidade na oferta pública. Em relação aos parâmetros físicos, químicos e biológicos, a legislação sobre qualidade das águas em nosso país está bem definida, quanto aos padrões de emissão no meio ambiente e eventuais problemas que podem causar à saúde dos seres vivos, em especial aos seres humanos. Com relação aos desreguladores endócrinos, os padrões de emissão destas substâncias e as formas de monitoramento ainda estão sendo discutidas, principalmente em relação à quanto e quais substâncias podem ser descartadas para a natureza, e quais

os níveis seguros, como exemplo o Brasil não tem nenhuma regulamentação para o NP em águas superficiais (Vidor & Jahn, 2015).

A Tabela 1 mostra os valores máximos permitidos de alguns EDCs de acordo com o regulamento atualmente aplicado tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos, para a água e suprimento de superfície, bem como o valor de orientação fornecido pelo Guia da Organização Mundial da Saúde de qualidade da água potável.

Tabela 1

Concentração máxima ($\mu\text{g/L}^{-1}$) de desreguladores endócrinos em água potável (1) e água de superfície (2) de acordo com leis nacionais e internacionais.

	Concentração Máxima ($\mu\text{g/L}^{-1}$)				
	Brasil		EUA		OMS
Composto	1 ^a	2 ^b	1 ^c	2 ^d	1 ^e
Benzopireno	0,7	0,018 ^c	0,2	n.m. ^f	0,7
Nonilfenol	n.m. ^f	n.m. ^f	n.m. ^f	28 ^g /7 ^h	n.m. ^f
Pentaclorofenol	9	3	1	19 ^g /13 ^h	9
Diexil-Ftalato	20	n.m. ^f	6	n.m. ^f	8

a: Portaria MS 2914/2011 (Brasil 2011); b: Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil 2005); c: *Safe Drinking Water Act*, SDWA (USEPA 2004); d: Recomendação nacional de critérios de água (USEPA, 2009); e: Organização Mundial da Saúde (OMS); f: valor não mencionado; g: Água doce; h: Água salgada. Adaptado de Araujo *et al.*, (2017).

3.2.1 Efeitos do nonilfenol em células animais

Considerando que existe um consenso geral de que altas doses de NP podem afetar o sistema imunológico, além de causar desregulação endócrina, não há consenso de que baixas doses de NP podem colocar seres humanos em risco de desregulação endócrina. No entanto, a sociedade mundial está usando a água potável com concentrações significativas de NP até 55,3 µg/L, e as consequências adversas da exposição a NP podem tomar uma variedade quase infinita de formas, incluindo as doenças mais preocupantes do desenvolvimento inicial do ser humano (Berryman *et al.*, 2004).

A atividade estrogênica do nonilfenol se deve à semelhança estrutural com o anel fenólico do 17β-estradiol (**Figura 1**). O número e a posição do grupo hidroxila na estrutura molecular são importantes fatores que contribuem para uma forte ligação no receptor de estrogênio e na resultante atividade estrogênica (Wang & Lou, 2004).

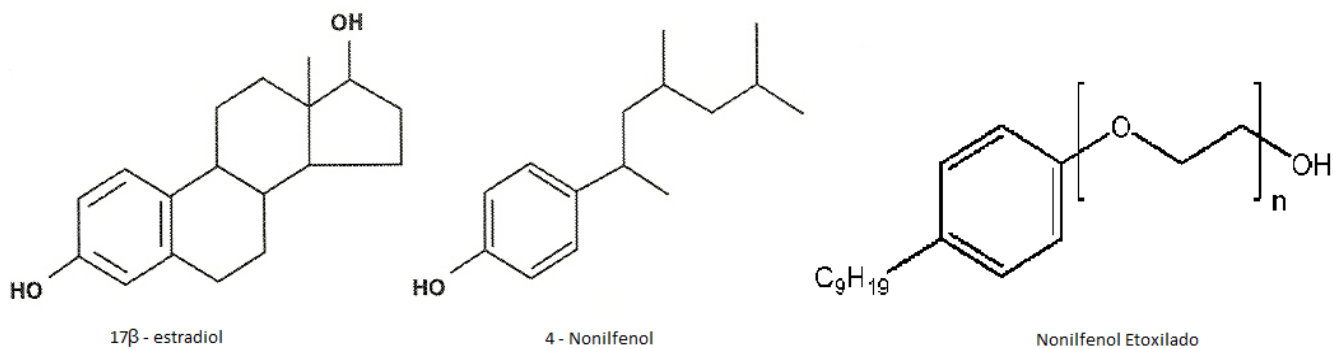


Figura 1. Semelhança dos anéis fenólicos entre 17 β-estradiol, 4 – nonilfenol e nonilfenol etoxilado.

A atividade biológica do NP se deve ao fato que este composto interage com a cavidade de ligação do receptor de estrogênio através semelhanças estruturais no anel fenólico (Witorsch, 2002).

O NP tem um efeito direto sobre a cascata de caspases e altera o ciclo celular em células neurais (Kudo *et al.*, 2004). O tratamento com NP em células-tronco neurais resultou na condensação nuclear e fragmentação do DNA, essas alterações morfológicas, são resultantes do processo de apoptose. Por outro lado, uma exposição de células a NP levou à parada do ciclo celular e resultou em níveis de expressão de proteína da ciclina A e B1 menores que os controles. Em conjunto, estes resultados indicam que, em contraste com outros desreguladores endócrinos, NP pode apresentar uma citotoxicidade elevada, levando às células para apoptose por meio da cascata de caspase e de parada do ciclo celular (Vazquez-Duhalt, 2005).

3.3 EDCs e Sistema Imunológico

Vários aspectos relativos aos efeitos de EDCs na resposta imune são dignos de atenção. Uma série de estudos demonstraram que as EDCs podem ter o potencial de afetar negativamente o sistema imunológico. Por exemplo, um desregulador endócrino, o metoxicloro, é um inseticida amplamente utilizado, descrito como estrogênico (Cummings, 1997; Jorgensen *et al.*, 2000; White *et al.*, 2005).

White *et al.* (2005) mostraram que a exposição ao metoxicloro na dieta durante o desenvolvimento e a fase adulta modula as respostas imunitárias em ratos Sprague Dawley proporcionando um aumento da resposta dos plamócitos e da atividade das células NK e por números alterados de células B e células T citotóxicas no baço. Por outro lado, a exposição ao 4-terc-octilfenol, um alquilfenol ambientalmente persistente descrito como EDC, aumenta a produção de interleucina-4, uma citocina pró-inflamatória intimamente associada a respostas imunes alérgicas, em células T via ativação de NF-AT (Lee *et al.*, 2004).

Os componentes do sistema imunológico, especialmente aqueles envolvidos no sistema imune inato, foram altamente suscetíveis à exposição ao bisfenol A, mesmo em baixas concentrações de 0,1 e 1 µg/L. Em níveis ambientais relevantes poderiam modular a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica após exposição a longo prazo (Wenhui, 2016).

As citocinas envolvidas com o sistema imunológico desempenham um papel crítico na gravidez, particularmente nos estágios iniciais, durante o implante de blastocistos e no desenvolvimento placentário; usando um modelo *in vitro*, foi mostrado que o NP, interferiu na secreção de citocinas na placenta humana no primeiro trimestre. Estes resultados suscitam preocupação com a exposição materna a este produto químico durante a gravidez e sugerem um possível envolvimento de fatores ambientais nas complicações da gravidez (Bechi *et al.*, 2010).

Os desreguladores endócrinos têm um efeito geral sobre os processos de diferenciação das células envolvidas na resposta imune, como consequência podem causar uma ativação inespecífica do sistema imune na ausência de condições patogênicas e alterações na apresentação de antígenos para as células T. Todos esses efeitos devem ser correlacionados com a capacidade de promover a proliferação celular, indicando um risco para a perturbação do equilíbrio fisiológico do sistema imunológico (Pisapia *et al.*, 2012).

Existem poucos relatos a respeito do efeito do nonilfenol sobre o sistema imunológico e é de suma importância o entendimento dos mecanismos de ação dessa substância.

A manifestação de autoimunidade ou infecção em seres humanos é a soma de vários eventos genéticos, ambientais e metabólicos sobre a resposta imune. Por exemplo: fatores de transcrição ativados por ligantes e receptores de estrogênio que regulam

programas de expressão de genes. O estrogênio ou outros ligantes de receptores de estrogênio podem influenciar sobre o desenvolvimento e a função de células do sistema imunológico. A magnitude da sinalização dos receptores de estrogênio pode ser responsável não só pela diferenciação de sexo, mas também, durante a gravidez, poderá contribuir para a indução da autoimunidade e predisposição a infecções. Todos esses efeitos somados poderão resultar em doenças inflamatórias crônicas ou em uma alteração da resposta imunológica na resolução de um processo infeccioso (Kovats, 2012).

As diferenças sexuais incluindo os níveis dos hormônios sexuais são um fator crucial que modula a sensibilidade e as respostas imunitárias à infecção por vírus (Klein *et al.*, 2011). Os receptores de hormônios esteróides estão presentes nas células imunes e podem regular as respostas inflamatórias por meio de efeitos sobre fatores transcricionais, incluindo NF- κ B, fornecendo uma via mecanicista pela qual a homeostase imunológica é diferencialmente regulada entre os sexos (McKay & Cidlowski, 1999; Biswas *et al.*, 2005; Chadwick *et al.*, 2005).

A influência marcante dos hormônios sexuais endógenos sobre a morfologia do timo e outros órgãos linfoides vem sendo demonstrada por vários autores. Por exemplo, a administração de estrogênios induz a involução do timo. Por outro lado, a remoção do timo, especialmente durante o período neonatal, pode induzir patologias nos ovários, testículos e tecidos da tireoide. Embora a base bioquímica exata para as interações bidirecionais não tenha sido completamente elucidada, hormônios e citocinas podem ter um papel importante na comunicação entre os sistemas endócrino e imune. As interações bidirecionais entre esses sistemas implicam que a modulação dos tecidos reprodutivos por estrogênios no meio ambiente também pode afetar o sistema imunológico (Ansar Ahmed, 2000). A Figura 2 esquematiza estas possíveis interações.

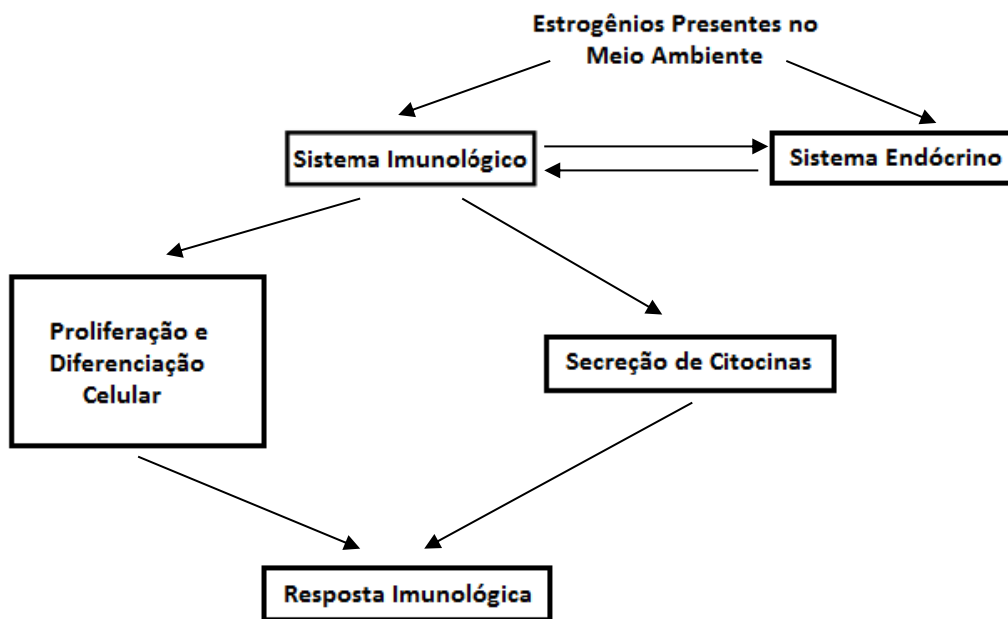


Figura 2. Interação entre o sistema imune e o sistema endócrino

Os hormônios sexuais desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças autoimunes, particularmente no lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide. Anormalidades no metabolismo dos hormônios sexuais têm sido observadas em pacientes com estas duas doenças. O curso de muitas doenças autoimunes é afetado durante os períodos de flutuações fisiológicas dos hormônios sexuais (por exemplo, gravidez ou a menopausa). Ao mesmo tempo, os hormônios sexuais também são suspeitos de serem envolvidos em condições alérgicas, tais como asma, a rinite alérgica e dermatite em humanos (Ansar Ahmed, 2000).

A partir do começo dos anos 90, o estudo do sistema imunológico ganhou uma nova estratégia extremamente robusta, a citometria de fluxo. Esta técnica possibilitou um impressionante progresso inicialmente nos estudos das moléculas de superfície, presentes nas células do sistema imune e houve um incremento bastante importante no que diz

respeito a classificação de subpopulações celulares. Utilizando a citometria de fluxo associada ao uso de um conjunto de anticorpos monoclonais torna-se possível definir as composições estruturais de proteínas específicas de membranas capazes de determinar e diferenciar subpopulações celulares. Esses antígenos de diferenciação celular reconhecidos por grupos de anticorpos monoclonais foram denominados como grupo de diferenciação celular “*cluster differentiation*” (CD) (Roitt *et al.*, 1997; Stiene-Martin *et al.*, 1998). Atualmente, são reconhecidos a partir de experimentação laboratorial, mais de 371 diferentes tipos de CD, conhecidos por CD1, CD2, CD3, CD4, etc., cujas relações entre as células identificadas e suas funções específicas também estão relacionadas (Clark *et al.*, 2016).

Outro impulso dado pela citometria de fluxo à imunologia foi ter contribuído para alavancar o estudo do perfil de secreção de citocinas das células do sistema imunológico (Kathryn *et al.*, 2001; Dorronsoro *et al.*, 2014).

3.4 Células TEMRA

As células T têm funções importantes na proteção imunológica contra patógenos infecciosos, gerando células efetoras que medeiam o controle do antígeno e formam células de memória que proporcionam imunidade protetora a longo prazo contra infecções recorrentes. As células T efetoras e de memória são diversificadas em subconjuntos distintos com funções especializadas e inúmeras moléculas foram usadas para ajudar a identificar esses subconjuntos e caracterizar a heterogeneidade das células T CD4 e CD8, seus dois principais subconjuntos (Sallusto *et al.*, 2004).

Também foi demonstrado a presença de subconjuntos fenotípicos e funcionalmente distintos de células T, analisando a expressão de CD27 e CD45RA. As células que expressam CD27, mas não CD45RA, apresentam propriedades funcionais

sugestivas de células de memória e aqueles que expressaram CD45RA, mas não CD27, apresentam propriedades funcionais sugestivas de células efetoras (Hamann *et al.*, 1997).

As células efetoras CD45RA+ TEMRA são células que representam o tipo de células de memória mais diferenciada, elas têm alta susceptibilidade à apoptose e expressam altos níveis de moléculas citotóxicas, como a perforina e o Fas-ligante. As células T, por exemplo, podem ser divididas em pelo menos quatro subconjuntos diferentes, com base em seu fenótipo (expressão de CD em sua superfície celular) e funções celulares: células Naive (T naive), (CCR7+, CD45RA+), células de memória central (TCM), (CCR7+, CD45RA-) apresentam alto potencial de proliferação e a falta de uma função efetora imediata, enquanto que, a célula de memória efetora (TEM), (CCR7-, CD45RA-) e a célula de memória efetora que reexpressa CD45RA (TEMRA), (CCR7-, CD45RA+) possuem pouca capacidade proliferativa, mas produzem citocinas e exercem atividade citotóxica, respectivamente (D'Asaro *et al.*, 2006).

Como referido, o NPE pode influenciar o sistema imune de diversas maneiras; contudo existe uma grande lacuna no que tange ao conhecimento da ação do NPE sobre esse sistema, e é de suma importância a realização de estudos que visem a compreensão dos seus mecanismos de ação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico intitulado “Resposta do sistema imunológico e do metabolismo intermediário de ratos wistar machos tratados com nonilfenol etoxilado”, o qual será submetido à revista, *Environmental Toxicology and Chemistry*.

RESPOSTA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DO METABOLISMO
INTERMEDIÁRIO DE RATOS WISTAR MACHOS TRATADOS COM
NONILFENOL ETOXILADO

Eduardo Pompeo de Matos^{a,b}, Keoma da Silva^{a,b}, Cibele Tremea^b, Viviane Ulbrich Ferreira^d, Andrés Delgado Cañedo^d, Matheus Parmegiani Jahn^{b,c}, Jomar Pereira Laurino^b.

^aPrograma de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul RS, Brazil.

^bLaboratório de Fisiologia e Toxicologia Ambiental, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul RS, Brazil.

^cLaboratório de Fisiologia e Farmacologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul RS, Brazil.

^dLaboratório de Biologia Celular, Centro Integrado de Pesquisas Biotecnológicas (CIPBiotec), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97300-000, São Gabriel RS, Brazil.

*Corresponding author at: Laboratório de Fisiologia e Toxicologia Ambiental (Bloco 57), Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. CEP: 95070-560. Caxias do Sul – RS, Brazil. Tel.: +55 54 32182678. E-mail address: mpjahn@ucs.br

RESUMO

O nonilfenol etoxilado (NPE) é um desregulador endócrino que está presente no meio ambiente devido ao seu uso como detergente nos processos de limpeza de efluentes industriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do NPE sobre o sistema imune adaptativo em ratos Wistar machos. Nestes animais foram avaliados o efeito do NPE sobre as células linfocitárias periféricas através da realização de hemograma e do perfil linfocitário adaptativo, analisando os marcadores de superfície CD4, CD8, CD28 e CD45 RA. Foi também avaliado o efeito do tratamento sobre o fígado e baço, bem como sobre o metabolismo intermediário, através das análises de glicemia, triglicerídeos e colesterol. Os dados não demonstraram diferenças significativas em relação ao índice hepático e esplênico. O nível de triglicerídeos apresentou um aumento de 50% nos grupos tratados, na avaliação dos níveis de colesterol e glicose não foi demonstrado diferenças significativas entre os grupos. Os resultados indicaram que o número de linfócitos e monócitos dos grupos tratados tiveram uma queda significativa de aproximadamente 25% e 50% em relação ao grupo controle. Foi demonstrado que o número de células fortemente marcadas quanto à presença da proteína CD45RA *High* na superfície celular dos linfócitos é maior nas células dos ratos do grupo tratado e que o tratamento aumenta a relação entre as células CD45RA *High/Dim*. Esses resultados levantam a hipótese que as células aumentadas nos grupos tratados apresentam fenótipo de membrana compatível com células T terminalmente diferenciadas (TEMRA). Este estudo forneceu dados novos sobre a ação do NPE, até onde se tem conhecimento, é a primeira pesquisa a constatar a presença elevada de células TEMRA em animais tratados com NPE, contribuindo com um novo foco para futuras pesquisas dessa substância.

Palavras-chave: Sistema imune adaptativo, triglicerídeos, citometria de fluxo, hemograma, células TEMRA.

1. INTRODUÇÃO

Desreguladores endócrinos são agentes exógenos que interferem na síntese, na secreção, no transporte, na ligação, na ação ou na eliminação de hormônios naturais no organismo, que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos (USEPA 1997). Entre as substâncias consideradas desreguladoras endócrinas, está o grupo dos alquifenóis etoxilados (APEs), estruturalmente formados por uma cadeia carbônica ligada a um grupo fenólico presente no octilfenol (OP), no nonilfenol (NP) e no nonilfenol etoxilado (NPE) (MDEP 2010). O NPE representa 85% do total dos APEs e é muito utilizado mundialmente como detergente industrial, sendo facilmente comercializado. A presença de NPE nos processos industriais e a consequente presença do mesmo no meio ambiente se deve principalmente ao seu uso como detergente nos processos de limpeza de efluentes industriais e ainda pode ser encontrado em tintas, pesticidas e plásticos. Além disso, também pode ser encontrado em produtos de uso pessoal, como cosméticos e produtos para cabelo e banho (Ahel & Giger 1985; Lee 1998; Gerolin 2008).

No que tange aos seus efeitos biológicos, o NPE é considerado um desregulador endócrino pela sua semelhança molecular estrutural com o estradiol podendo interferir na ação do estrogênio natural, a partir da sua ligação aos receptores de estrogênio (Ansar Ahmed 2000). Esta atividade se deve à semelhança estrutural com o anel fenólico do 17 β -estradiol. O número e a posição do grupo hidroxila na estrutura molecular são importantes fatores que contribuem para uma forte ligação no receptor de estrogênio e na resultante interferência na atividade estrogênica (Wang & Lou 2004).

O NPE, como desregulador endócrino, tem um efeito geral sobre os processos de diferenciação das células envolvidas na resposta imunológica; como consequência, pode causar uma ativação inespecífica do sistema imunológico na ausência de condições

patogênicas e alterações na apresentação de antígenos para as células T. Todos esses efeitos podem estar correlacionados com sua influência na proliferação celular, indicando um risco para a perturbação do equilíbrio fisiológico do sistema imunológico (Pisapia *et al.* 2012).

Devido à possibilidade da interação entre os sistemas endócrino e imunológico, e na escassez de estudos avaliando a interferência do NP sobre os mesmos, faz-se necessário avaliar o papel do NPE diretamente no desenvolvimento e na funcionalidade da resposta imunológica. Neste trabalho, foi avaliado o efeito do tratamento crônico de ratos Wistar machos com NPE através da contagem de células sanguíneas, da avaliação do efeito sobre o perfil linfocitário adaptativo das amostras sanguíneas de ratos, sobre o fígado e seus efeitos sobre o metabolismo intermediário.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Nonilfenol Etoxilado (NPE)

Para tratamento dos animais foi utilizado o NPE (CAS 9016-45-9) da marca Renex 95 (Simoquímica) principalmente usado como detergente industrial. Foi armazenado em temperatura ambiente fora da incidência direta de luz e umidade, conforme recomendado pelo fabricante.

2.2 Administração Crônica do NPE na Dieta de Ratos

Tratamento e Grupos Experimentais: Foram utilizados ratos Wistar machos, com 3 meses de idade, alojados em caixas padronizadas, a 22 ± 2 °C com ciclo claro/escuro

de 12 horas, os quais foram separados aleatoriamente em três grupos. Dois grupos de ratos (n=12 por grupo) consumiram *ad libitum* água com NPE em diferentes diluições 0,1mL/L (10 mg/kg/dia) e 1,0 mL/L (100 mg/kg/dia), durante 30 dias seguindo protocolos usados por outros autores (Fan *et al.* 2013; Han *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2003). O grupo controle recebeu água potável sem NPE.

Após o término do período total de tratamento com as duas diluições de NPE, os animais foram mortos por decapitação. O sangue troncular dos ratos foi coletado em tubo com anticoagulante com EDTA (para as análises hematológicas e imunológicas) e sem anticoagulante, nesse último foi realizada a separação do soro através da centrifugação a $2000 \times g$ durante 10 minutos, para as análises bioquímicas. Também foram retirados e pesados o fígado e o baço dos animais, para cálculo do índice hepático e do índice esplênico (peso do órgão / peso do animal $\times 100$).

2.3 Análises Bioquímicas

O metabolismo intermediário foi avaliado através da análise das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos e glicose. A análise da função hepática foi realizada por meio da dosagem das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT). Estes parâmetros foram determinados utilizando-se “kits” enzimáticos comerciais (LABTEST Diagnóstica, Brasil), e a leitura em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK) seguindo as instruções do fabricante.

2.4 Hemograma

O sangue dos animais foi submetido a realização de hemograma no final do tratamento. Análises hematológicas foram realizadas em amostras de 50 microlitros de sangue total coletado em tubos contendo EDTA, utilizando um analisador automatizado hematológico (SDH-3, Labtest, Brasil). Foram avaliados os seguintes parâmetros: hemácias, hematócrito, leucócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas.

2.5 Análise da Imunidade Adquirida

As subpopulações linfocitárias foram analisadas por imunofenotipagem por citometria de fluxo, onde foram utilizados os seguintes anticorpos:

Ac mono anti-rato CD4 camundongo (PE) código MR5104,

Ac mono anti-rato CD8 camundongo (FITC), código MR5201,

Ac mono anti-rato CD28 camundongo (FITC) código A161184,

Ac mono anti-rato CD28 camundongo (PE) código A16199 e

Ac mono anti-rato CD45 RA camundongo (PE) código MR6404.

Todos os anticorpos foram incubados de acordo com a recomendação do fabricante, Thermo Fisher Scientific. As análises foram realizadas em citômetro Accuri C6 (Accuri, USA) e analisadas no programa CFlow software (Accuri Citometers, USA).

2.6 Análise Estatística

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias e o erro padrão da média (EPM) para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos foi aplicada análise de variância (ANOVA)

de uma via, complementada com o teste de *Dunnet*. As diferenças foram consideradas significativas em relação ao controle quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$. Para o tratamento estatístico foi utilizado o software *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 17.0.

2.7 Bioética

Todo o experimento seguiu o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” desenvolvido pelo *Institute of Laboratory Animal Research* (National Academic Press: Washington, 2011) e está de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UCS (no. 001/13).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da Função e Lesão Hepática

Não foram observadas diferenças significativas nas dosagens das enzimas AST e ALT entre os grupos (Tabela 1), o que define que, para as diluições e tempo aplicados nesse estudo, o tratamento não demonstrou efeito hepatotóxico, nem interferiu na função hepática. Em relação aos níveis de albumina, também não foram constatadas alterações significativas entre os três grupos estudados.

Tabela 1. Dosagens da concentração sérica das enzimas AST, ALT, albumina e fosfatase alcalina após tratamento de ratos Wistar machos com nonilfenol etoxilado (mL/L).

	Nonilfenol etoxilado (mL/L)		
	Controle	0,1	1,0
AST (U/L)	103,18 ± 17,67	96,7 ± 10,88	113,76 ± 17,78
ALT (U/L)	81 ± 3,70	81,66 ± 5,45	74,66 ± 4,50
Fosfatase Alcalina (U/L)	157,16 ± 14,48	152,83 ± 16,26	167,33 ± 23,29
Albumina (g/dL)	3,23 ± 0,053	3,17 ± 0,039	3,305 ± 0,050

Os valores representam a média ± erro padrão médio. n= 6 animais por grupo. Os dados dos animais tratados não apresentaram diferença significativa em relação ao Grupo Controle ($p \leq 0,05$, ANOVA, Dunnet).

Enquanto nos estudos de Korkmas *et al.* (2010), foi relatado um aumento de 100% da AST e ALT em ratos após exposição ao nonilfenol, Woo *et al.* (2007) não evidenciaram alterações nos níveis séricos destas enzimas, mesmo em doses altas de 250 mg/kg/dia. As discrepâncias de resultados pode residir no fato dos estudos terem seguido diferentes protocolos experimentais para desenvolver a intoxicação, como gavagem e administração *ad libitum*.

3.2 Metabolismo intermediário e índices hepático e esplênico

A avaliação dos níveis de colesterol e glicose em sangue não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 2). No entanto, na dosagem de triglicérides, os

grupos na concentração de 0,1 mL/L e 1,0 mL/L apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Tabela 2. Dosagens da concentração sérica de glicose, colesterol e triglicerídeos e os índices hepático e esplênico após tratamento de ratos Wistar machos com nonilfenol etoxilado (mL/L).

	Nonilfenol etoxilado (mL/L)		
	Controle	0,1	1,0
Glicose (mg/dL)	111,66 ± 4,28	111,66 ± 3,81	121,66 ± 4,51
Triglicerídeos (mg/dL)	100,16 ± 11,27	146,16 ± 6,44 *	151,66 ± 15,82 *
Colesterol (mg/dL)	65,33 ± 2,65	64 ± 2	72,16 ± 5,56
Índice Hepático (%)	2,94 ± 0,10	2,88 ± 0,05	2,99 ± 0,09
Índice Esplênico (%)	0,20 ± 0,0069	0,21 ± 0,0093	0,19 ± 0,0063

Os valores representam a média ± erro padrão médio. n= 6 animais por grupo. (*) $p \leq 0,05$, ANOVA, Dunnet.

O aumento de triglicerídeos no tratamento de roedores com desreguladores endócrinos foi previamente relatado por Brulport *et al.* (2017). Estes autores demonstraram que a administração por gavagem de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um desregulador endócrino pertencente as dioxinas, durante 8 meses induziu um aumento de peso significativo, o qual foi correlacionado com o aumento da massa de gordura em camundongos macho e fêmea sem que houvesse qualquer alteração na ingestão de alimentos destes animais. No que diz respeito ao fígado, o tratamento com TCDD teve um efeito maior no peso do fígado do que o ganho de peso corporal,

independentemente do sexo, mas este efeito foi significativo apenas nos machos e em contraste, o teor de triglicerídeos hepáticos aumentou significativamente nas fêmeas.

A presença de receptor de estrogênio nas células do córtex adrenal e a propriedade estrogênica do nonilfenol sugerem efeitos diretos sob a secreção e produção de corticosterona, e, conseqüentemente sobre os triglicerídeos (Chang *et al.* 2010). O fornecimento subcrônico de corticosterona na água potável de ratos resultou em aumento de peso rápido e dramático, aumento da adiposidade e elevação dos níveis plasmáticos de leptina, insulina e triglicerídeos (Karatosoreos *et al.* 2010).

Os dados obtidos neste trabalho não demonstraram diferenças significativas em relação ao índice hepático e índice esplênico, mostrando que, no tempo de exposição deste estudo, não ocorre danos maiores no fígado ou no baço.

3.3 Avaliação Hematológica

A avaliação hematológica revelou que tanto o número de linfócitos quanto monócitos dos grupos tratados apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo controle. Granulócitos, hemácias, plaquetas e o hematócrito não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem de leucócitos (linfócitos, monócitos e granulócitos), hemácias, plaquetas e hematócrito após tratamento de ratos Wistar machos com nonilfenol etoxilado (mL/L).

	Nonilfenol etoxilado (mL/L)		
	Controle	0,1	1,0
Leucócitos (10⁹/L)	8,26 ± 0,90	6,20 ± 0,40 *	6,08 ± 0,34 *
Linfócitos	6,14 ± 0,65	4,65 ± 0,30 *	4,58 ± 0,26 *
Monócitos	0,91 ± 0,14	0,45 ± 0,09 *	0,54 ± 0,08 *
Granulócitos	1,28 ± 0,16	1,14 ± 0,09	0,99 ± 0,08
Hemácias (10¹²/L)	9,18 ± 0,30	9,17 ± 0,06	9,01 ± 0,13
Plaquetas (10⁹/L)	699,6 ± 61,78	615,33 ± 21,23	725,66 ± 28,08
Hematócrito (%)	46,65 ± 1,57	46,02 ± 0,50	45,37 ± 0,63

Os valores representam a média ± erro padrão médio. n= 12 animais por grupo.

(*) $p \leq 0,05$, ANOVA, Dunnet.

Receptores de estrogênio foram encontrados em certas subpopulações de linfócitos, podendo atuar na regulação natural da função destas células, como na redução da produção de fatores imunorreguladores, na limitação da expressão de antígenos e diminuição da capacidade dos linfócitos de reagir com outras células. Assim, a ligação dos desreguladores estrogênicos como o NPE a estes receptores, poderiam causar mudanças tanto no número total de linfócitos como nos seus diferentes subtipos, como já relatado por alguns autores (Cohen *et al.* 1983; Myers *et al.* 1986; Stimson 1988; Le *et al.* 2003; Karrow *et al.* 2004; Medeiros *et al.* 2007).

Os glicocorticoides (GCs) atuam como moduladores do sistema imunológico, sendo que tanto sua liberação excessiva como sua deficiência estão associadas a diversas patologias. A hiperestimulação do eixo neuro-imuno endócrino, com excessiva secreção

de GCs, resulta em imunossupressão intensa e suscetibilidade aumentada à infecção; já a insuficiente secreção dos GCs leva a enfermidades inflamatórias e autoimunes (Palma *et al.* 2007)

Com um possível aumento da produção da corticosterona devido a presença de receptor de estrogênio nas células do córtex adrenal, dado corroborado pelo aumento das taxas de triglicérides nos ratos tratados com NPE, ocorre conseqüentemente uma queda no número de linfócitos, gerando impacto direto sobre o sistema imunológico. Além disso, a corticosterona é reconhecida como uma droga anti-inflamatória e supressora da resposta imune (de Cremoux *et al.* 2008; Chang *et al.* 2010).

O nonilfenol por possuir uma elevada afinidade com receptores de estrogênio tende a suprimir a mitogênese dos linfócitos em concentrações relativamente menores do que outros produtos químicos (Nishikawa *et al.* 1999; Nakamuro *et al.* 2000; Sakakazi *et al.* 2002). Por outro lado, além de causar diminuição da proliferação celular, alguns desreguladores endócrinos, como o Bisfenol A, podem estar positivamente correlacionados com a necrose e a apoptose de monócitos (Neri *et al.* 2015).

Assim, a diminuição dos leucócitos observados no nosso estudo poderia ser explicada pelo efeito do NPE sobre a proliferação de monócitos e linfócitos e/ou pelo aumento da morte destas células ou pelo efeito sobre o eixo neuro-imuno endócrino a partir do aumento na produção de corticosterona, previamente relatado por Chang *et al.* (2010).

3.4 Imunofenotipagem de populações linfocitárias

Para ampliar o entendimento das diferenças observadas na contagem de linfócitos, também alguma das subpopulações linfocitárias foram avaliadas através de imunofenotipagem em citometria de fluxo. Esta análise demonstrou que o número de células fortemente marcadas quanto à presença da proteína CD45RA (CD45RA^{High}) na superfície celular dos linfócitos é maior nas células dos ratos do grupo tratado, em relação às células do grupo controle e que o tratamento com NPE aumentou também a relação entre as células CD45RA^{High} e as células CD45RA^{dim} (aquelas que apresentam baixa expressão da proteína CD45RA na membrana plasmática) (Figura 1). Porém, o número de células CD45RA^{dim} não variou com o tratamento. Também foi demonstrado que as células CD45RA^{High} não apresentam marcação para CD8 (Figura 2) e CD28 (Figura 3). Esses resultados levantam a hipótese que as células aumentadas nos grupos tratados apresentam fenótipo de membrana CD45RA^{bright}, CD28⁻ compatível com células T terminalmente diferenciadas (TEMRA). Estas células são terminalmente diferenciadas, representam o tipo de células de memória mais diferenciada, têm alta susceptibilidade à apoptose e expressam altos níveis de moléculas citotóxicas (D'Asaro *et al.* 2006).

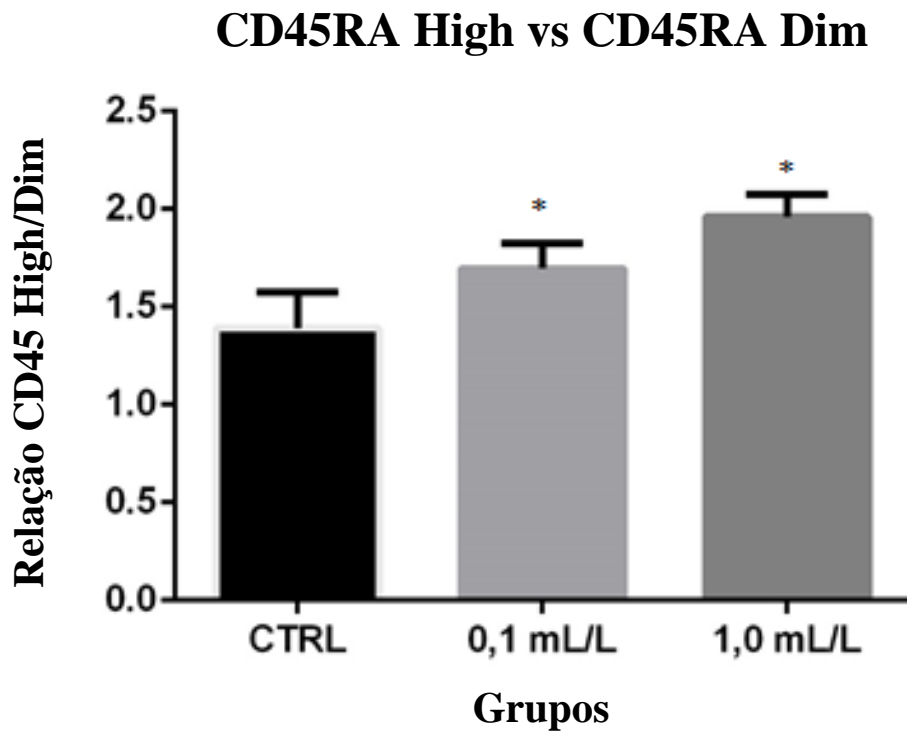


Figura 1. Histograma mostrando a diferença na relação de CD45RA High/Dim entre os linfócitos dos ratos dos grupos tratados e não tratados. Os valores representam a média ± EPM. (*) $p \leq 0,05$, ANOVA, Dunnet.

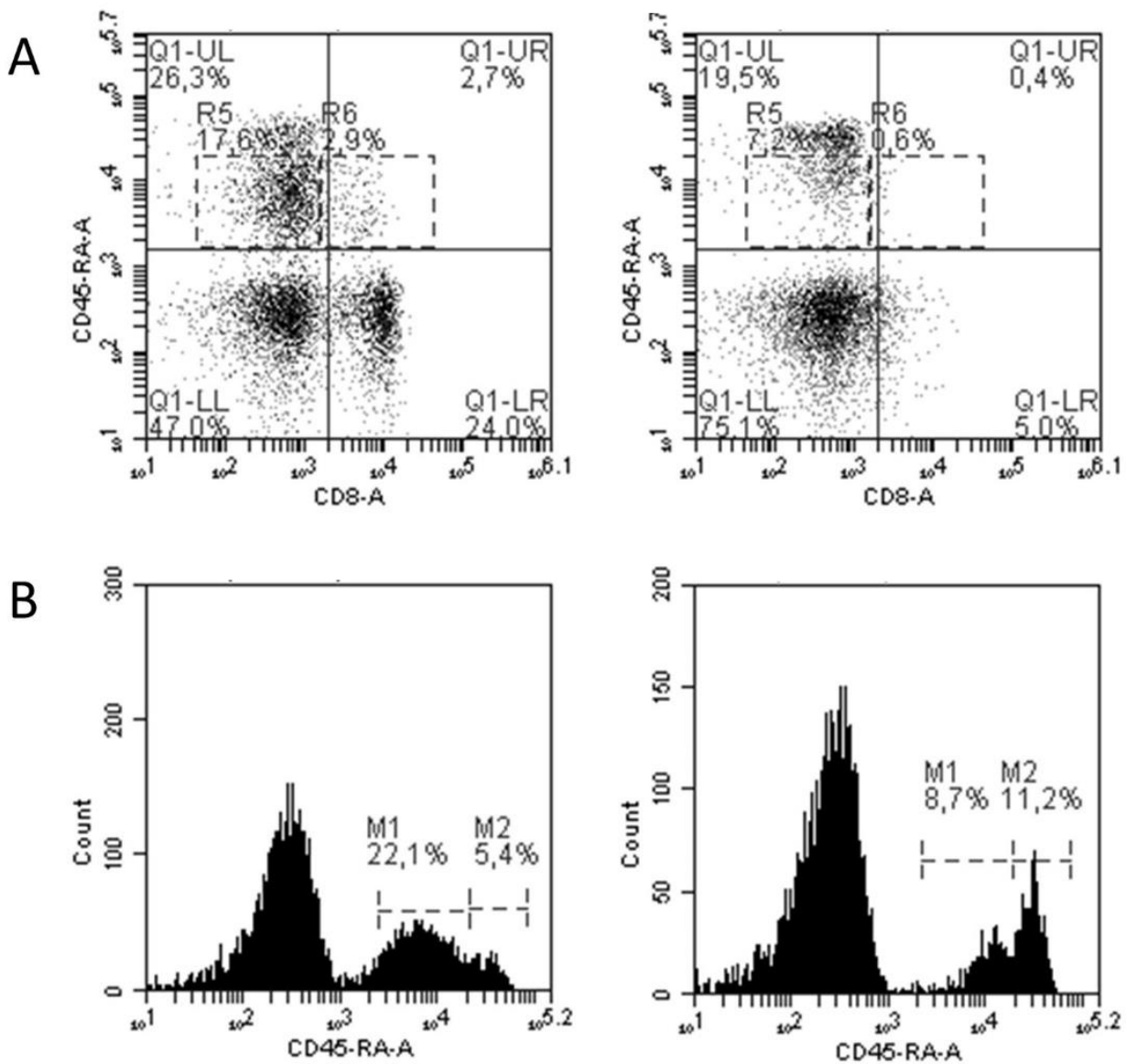


Figura 2. Citometria de fluxo (dot plot) da dupla marcação CD45RA e CD8 entre ratos dos grupos tratados e não tratados, demonstrando que as células CD45RA^{High} não apresentam marcação para o marcador CD8. A – Grupo Controle; B – Grupo Tratado (NPE).

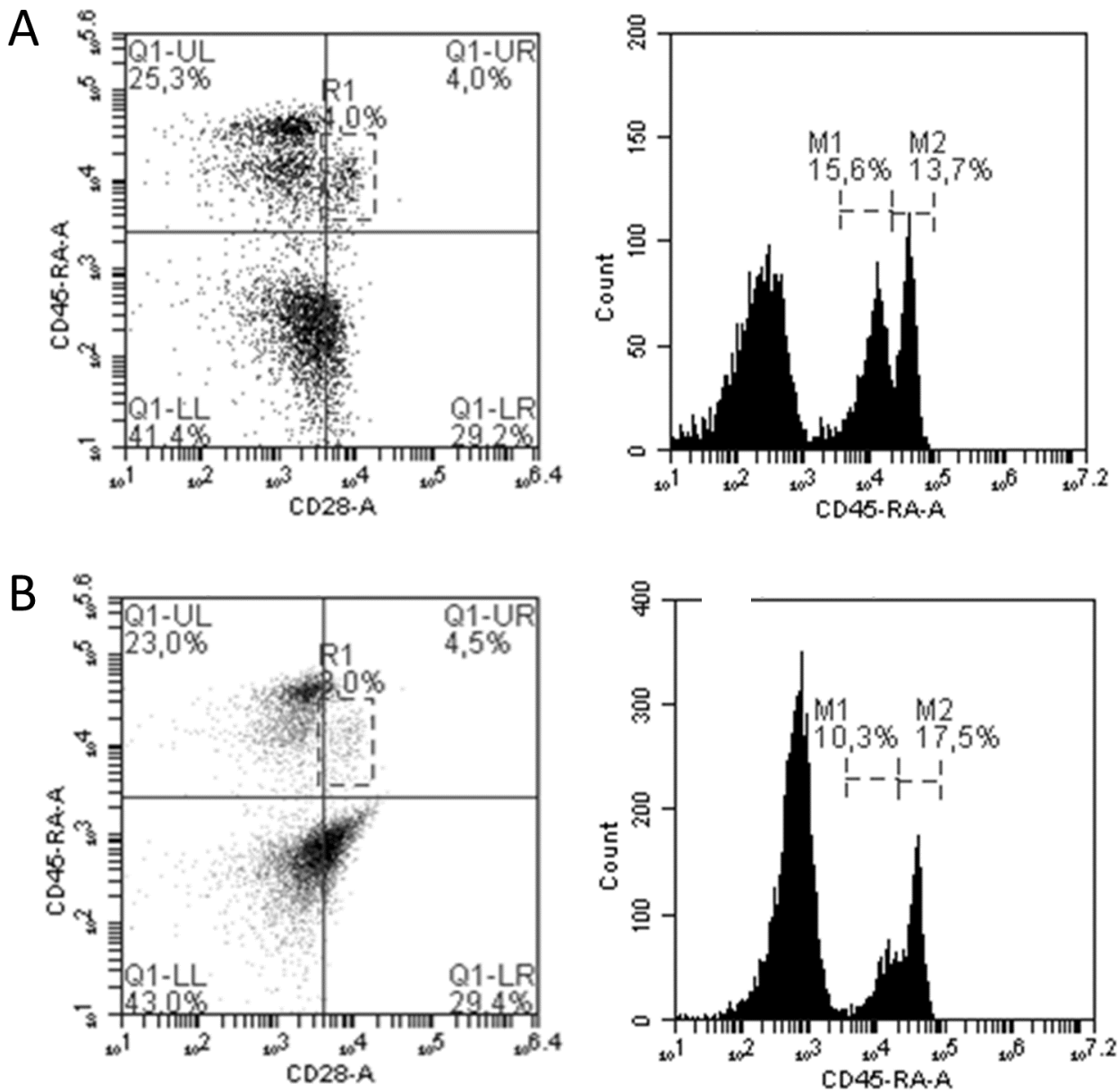


Figura 3. Citometria de fluxo (dot plot) da dupla marcação CD45RA e CD28 entre ratos dos grupos tratados e não tratados, demonstrando que as células CD45RA High não apresentam marcação para o marcador CD28. A – Grupo Controle; B – Grupo Tratado (NPE).

Taxas elevadas de células TEMRA estão associadas com doenças nas quais o sistema imunológico está intimamente relacionado (Åkesson *et al.* 2015), a porcentagem de células TEMRA (CD4⁺ CD27⁻ CD28⁻ CD45RA⁺ CCR7⁻) na população de linfócitos CD4⁺ de crianças com diagnóstico combinado de diabetes do tipo I e doença celíaca foi maior em comparação com o nível destas células em controles saudáveis. A acumulação considerável de células TEMRA em pacientes com diabetes do tipo I, sugere que houve uma estimulação ao longo da vida por exposição prolongada a algum antígeno (vírus, outros agentes ou auto-antígenos residuais) ou um defeito homeostático na regulação das respostas imunes (Matteucci *et al.* 2011).

A involução do timo no envelhecimento leva a uma diminuição na frequência e no número de células T naive (células CCR7⁺ CD45RA⁺). Isso também se traduz em um aumento na frequência e no número de células de memória. A frequência de células T CD28⁻, muitas vezes associada ao envelhecimento do sistema imunológico, engloba tanto a memória efetora quanto as células TEMRA (Appay *et al.* 2008). Ao mesmo tempo, em comparação com os jovens, as células T de sangue periférico dos idosos contêm porcentagens reduzidas de células CD8⁺ naive e número elevado de células TEMRA, enquanto as células CD4⁺ apresentam tendências semelhantes, porém menos acentuadas (Koch *et al.* 2008).

A partir da relação dos dados obtidos com os dados relatados na bibliografia podemos supor que o tratamento com o nonifenol etoxilado está induzindo os linfócitos para um estado possivelmente “envelhecido” no que se refere às células CD8⁻; contudo, a incompatibilidade de fluorescências nos anticorpos disponíveis não permitiu confirmar que as mesmas são células CD4⁺.

Assim, várias consequências negativas podem estar sendo geradas aos seres vivos que entrarem em contato com o NPE. Estudos que avaliem as concentrações de NPE nos recursos hídricos naturais deveriam ser estimulados e a análise de NPE no efluente de empresas que usam este tipo de substância deveriam ser obrigatórias para regulamentar seu uso em países em que ainda é utilizado, visto que em alguns países da Europa já existem regulamentações proibitivas.

4. CONCLUSÕES

Nossa pesquisa demonstrou um aumento no número de triglicédeos:

- O aumento do nível de corticosterona devido a ação estrogênica do NPE. Leva a uma hiperatividade do eixo neuro-imuno endócrino que pode causar diabetes, imunossupressão e problemas reprodutivos, todos efeitos já documentados como efeitos da ingestão do nonilfenol.

O estudo demonstra que possivelmente o nonilfenol causa a queda no número de células do sistema imunológico:

- 50 % nos números de monócitos e 25% de linfócitos.

Um possível aumento das células TEMRA que poderia levar à senescência do sistema imunológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahel M, Giger W. 1985. Determination of alkyphenol and alkyphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 57(8): 1577-1583.
- Åkesson K, Tompa A, Rydén A, & Faresjö M. 2015. Low expression of CD39⁺/CD45RA⁺ on regulatory T cells (T_{reg}) cells in type 1 diabetic children in contrast to high expression of CD101⁺/CD129⁺ on T_{reg} cells in children with coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 180(1), 70–82. <http://doi.org/10.1111/cei.12559>.
- Ansar Ahmed S. 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): A new emerging field. *Toxicology*. 150, 191-206.
- Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry Part A*. 73(11), 975–983.
- Brulport A, Le Corre L, Chagnon MC. 2017. Chronic exposure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces an obesogenic effect in C57BL/6J mice fed a high fat diet. *Toxicology*. 390:43-52.
- Chang LL, Alfred Wun WS, Wang PS. 2010. Effects and Mechanisms of Nonylphenol on Corticosterone Release in Rat Zona Fasciculata-Reticularis Cells. *Toxicology Science*. 118(2),411.
- Cohen JHM, Daniel L, Cordier G, Saez S, Revillard JP. 1983. Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8 positive cells. *Journal of Immunology*. 131(6), 2767.

- D`Asaro M, Dieli F, Caccamo N, Mussa M, Porretto F, Salerno A. 2006. Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (TEMRA) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia*. 20(3):545–7. doi:10.1038/sj.leu.2404079.
- de Cremoux P, Rosenberg D, Goussard J, Bre´mont-Weil C, Tissier F, Tran-Perennou C, Groussin L, Bertagna X, Bertherat J, Raffin-Sanson ML. 2008. Expression of progesterone and estradiol receptors in normal adrenal cortex, adrenocortical tumors, and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocrine-Related Cancer*. 15, 465.
- Fan Z, Hu J, An W, Yang M. 2013. Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A, nonylphenol, and estrogens in drinking water of China: comparison to the parent compounds. *Environmental Science & Technology*. 47(19):10841–50.
- Gerolin ERR. 2008. Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré. *Tese de doutoramento*. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Campinas, SP.
- Han XD, Tu ZG, Gong Y, Shen SN, Wang XY, Kang LN, Hou YY, Chen JX. 2004. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reproductive Toxicology*. 19: 215–221.
- Institute of Laboratory Animal Research. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *National Academic Press*, Washington D.C.
- Jacob MHVM, Janner DR, Araújo ASR, Jahn MP, Kucharski LCR, Moraes, TB, Filho CSD, Ribeiro MFM, Belló-Klein A. 2010. Redox imbalance influence in the myocardial Akt activation in aged rats treated with DHEA. *Experimental Gerontology*. 45: 957-963.

- Jahn MP, Gomes, LF, Jacob MH, da Rocha Janner D, Araújo AS, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Kucharski LC. 2011. The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on renal function and metabolism in diabetic rats. *Steroids*.76: 564-570.
- Karatosoreos IN, Bhagat SM, Bowles NP, Weil ZM, Pfaff DW, McEwen BS. 2010. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology*. 151, 2117–2127.
- Karrow NA, Guo TL, Declos KB, Newbold RR, Weis C, Germolec DR, White KL, McCay JA. 2004. Nonylphenol alters the activity of splenic NK cells and the numbers of leukocyte subpopulations in Sprague-Dawley rats: A two-generation feeding study. *Toxicology*. 196, 237.
- Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. 2008. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immunity & Ageing*. 5, 6.
- Korkmaz A, Ahabab MA, Kolankaya D, Barlas N. 2010. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food Chemical Toxicology*. 48, 2865.
- Lee MH, Chung SW, Kang BY, Park J, Lee CH, Hwang SY, Kim TS. 2003. Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²⁺. *Immunology*. 109,76.
- Lee PC. 1998. Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male new-born rats. *Endocrine*. 9(1), 105.

- Matteucci E, Ghimenti M, Di Beo S, Giampietro O. 2011. Altered proportions of naïve, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Immunology*. vol. 31, no. 6, pp. 977–984.
- MDEP. Maine Department of Environmental Protection. 2010. Basis statement for chapter 883, designation of the chemical class nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as a priority chemical and safer chemicals program support document for the designation as a priority chemical of nonylphenol ethoxylates. Disponível (Online).
http://www.maine.gov/dep/oc/safechem/nonylphenol%20support_document_final.pdf. (13 de Março de 2018).
- Medeiros SF, Maitelli A, Nince APB. 2007. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 29(11), 593.
- Myers MJ, Heim MC, Hirsch KS, Queener SF, Petersen BH. 1986. Translocatable estrogen receptors in rat splenocytes. *Life Science*. 39, 313.
- Nakamuro K, Ueno H, Okuno T, Kawai H. 2000. Evaluation of endocrine disruptors in environmental water using yeast two-hybrid system. *Japanese Journal of Clinical Medicine*. 58 (12), 2477.
- Neri M, Virzì G, M, Brocca A, Garzotto F, Kim J, C, Ramponi F, de Cal M, Lorenzin A, Brendolan A, Nalesso F, Zanella M, Ronco C. 2015. In vitro Cytotoxicity of Bisphenol A in Monocytes Cell Line. *Blood Purification*. 40:180-186.
- Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dakeyama F, Matsuo M, Nishihara T. 1999. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of

nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 154 (1), 76.

- Palma BD, Tiba PA, Machado RB, Tufik S, Suchecki D. 2007. Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 29 (Suppl. 1), s33-s38. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462007000500007>.
- Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, Caputo L, Mita L, Viggiano E, Russo GL, Nicolucci C, Rossi S, Bencivenga U, Mita DG, Diano N. 2012. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *General and Comparative Endocrinology*. Volume 178. Issue 1. Pages 54-63.
- Sakazaki H, Ueno H, Nakamuro K. 2002. Estrogen receptor alpha in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicology Letters*. 133,221.
- Stimson WH. 1988. Oestrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset. *Journal of Immunology*. 28, 345.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: an Effects Assessment and Analysis. n. EPA/630/R-96/012, *Washington D.C.*
- Wang ZQ, Lou YJ. 2004. Proliferation-Stimulating Effects Of Icaritin And Desmethylcaritin In MCF-7 Cells. *European Journal of Pharmacology*. 504: 147– 153.
- Woo GH, Shibutani M, Ichiki T, Hamamura M, Lee KY, Inoue K, Hirose M. 2007. A repeated 28-day oral dose toxicity study of nonylphenol in rats, based on

the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals. *Archives of Toxicology*. 81, 77.

- Zhang H, Zeng X, Cheng W, Wu D. 2003. Adverse effects of nonylphenol on the reproductive function of adult male SD rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 34(2): 295-297.

5 CONCLUSÕES

Nossa pesquisa demonstrou um aumento na concentração de triglicérides no plasma de ratos tratados com nonilfenol, o que pode indicar um aumento do nível de corticosterona devido a ação estrogênica do nonilfenol etoxilado, que aumenta sua secreção. Esse efeito leva a uma hiperatividade do eixo neuro-imuno endócrino que pode causar diabetes, imunossupressão e problemas reprodutivos, todos efeitos já documentados como efeitos da ingestão do nonilfenol.

O estudo demonstra que possivelmente o nonilfenol causa diminuição no número de células do sistema imunológico, desregulando a sua função, entre as células afetadas relatamos a diminuição de aproximadamente 50 % nos números de monócitos e 25% de linfócitos. Além disso, foi demonstrado um possível aumento das células TEMRA que, em conjunto, poderia levar à senescência do sistema imunológico.

Sendo um estudo piloto, ele abre caminho para muitas outras pesquisas. Como por exemplo, a confirmação que o aumento encontrado foi realmente de células TEMRA e também um estudo mostrando uma alteração do ciclo circadiano, confirmando a alteração na secreção de corticosterona e alteração do eixo neuro-imuno endócrino.

Faz-se também necessária uma reavaliação dos parâmetros obrigatórios das análises de efluentes na Legislação Brasileira, assim como a proibição ou restrição do uso do nonilfenol.

6 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Ahel, M.; Giger, W. (1985). Determination of alkyphenol and alkyphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**. 57(8): 1577-1583.
- Ahel, M.; Scully, F.E.; Hoigné, J.; Giger, W. (1994). Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. **Chemosphere**. 28: 1361-1368.
- Ansar Ahmed, S. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): A new emerging field. **Toxicology**. 150, 191-206.
- Araujo, F.G.; Bauerfeldt, G.F.; Cid, Y.P. (2017). Nonylphenol: Properties, legislation, toxicity and determination. Anais da Academia Brasileira de Ciências. **Disponível (Online)**.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000137652017005017103&lng=en&nrm=iso. (13 de Março de 2018).
- Bechi, N.; Ietta, F.; Romagnoli, R.; Jantra, S.; Cencini, M.; Galassi, G. (2010). Environmental levels of para-nonylphenol are able to affect cytokine secretion in human placenta. **Environmental Health Perspectives** 118(3):427–31.
- Berryman, D.; Houde, F.; DeBlois, C.; O’Shea, M. (2004). Nonylphenol compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. **Chemosphere**. 56: 247-255.
- Berryman, D.; Houde, F.; DeBlois, C.; O’Shea, M. (2004). Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp

and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. **Chemosphere**. 56:247–55.

- Birkett, J.W.; Lester, J.N. (2003). Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. 1st ed. USA: **IWA Publishing**. Lewis Publishers CRC Press LLC.
- Biswas, T.; Aihara, H.; Radman-Livaja, M.; Filman, D.; Landy, A.; Ellenberger, T. (2005). A structural basis for allosteric control of DNA recombination by λ integrase. **Nature**. 435, 1059–1066.
- Brasil. (2005). Conama Resolução nº 357, Diário Oficial da União. **Disponível (Online)**. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. (10 de setembro de 2017).
- Brooke, L.; Thursby, G. (2005). Aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Washington DC, USA: **Report for the United States EPA**, Office of Water, Office of Science and Technology.
- Campbell, P. (2002). Alternatives to nonylphenol ethoxylates. Review of toxicity, biodegradation & technical-economic aspects. **Toxicology - Environmental Consulting**, Vancouver, B.C., Canada. Report for Environment Canada.
- Chadwick, P.; Newman-Taylor, K.N.; Abba, N. (2005). Mindfulness groups for people with psychosis. **Behavioural and Cognitive Psychotherapy**. 33(03):351–359.
- Chen, G.W.; Ding, W.H.; Ku, H.Y.; Chao, H.R.; Chen, H.Y.; Huang, M.C.; Wang, S.L. (2010). Alkylphenols in human milk and their relations to dietary habits in central Taiwan. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 1939–1944.
- Clark, G.; Stockinger, H.; Balderas, R.; van Zelm, M. C.; Zola, H.; Hart, D.; Engel, P. (2016). Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human

Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. **Clinical & Translational Immunology**, 5(1), e57–. <http://doi.org/10.1038/cti.2015.38>.

- Cummings, A.M. (1997). Methoxychlor as a model for environmental estrogens. **Critical Reviews in Toxicology**. 27:367-79.
- D`Asaro, M.; Dieli, F.; Caccamo, N.; Mussa, M.; Porretto, F.; Salerno, A. (2006). Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (TEMRA) in chronic graft-versus-host disease. **Leukemia**. 20(3):545–7. doi:10.1038/sj.leu.2404079.
- Dorronsoro, A.; Ferrin, I.; Salcedo, J. M.; Jakobsson, E.; Fernández-Rueda, J.; Lang, V.; Sepulveda, P.; Fechter, K.; Pennington, D.; Trigueros, C. (2014). Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- α -mediated activation of NF- κ B. **European Journal of Immunology**. 44: 480–488. doi:10.1002/eji.201343668.
- European Commission. (2002). Risk assessment report: 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. **Disponível (Online)**. http://www.bfr.bund.de/cm/343/4_nonylphenol_und_nonylphenol.pdf. (15 de março de 2018).
- European Union. (2008). Environmental Quality Standards Directive. **Disponível (Online)**. <http://www.fao.org/faolex/results/details/en/?details=LEX-FAOC084568>. (15 de março de 2018).
- Fan, Z.; Hu, J.; An, W.; Yang, M. (2013). Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A, nonylphenol, and estrogens in drinking water of China: comparison to the parent compounds. **Environmental Science Technology**. 47(19):10841–50.
- Gerolin, E.R.R. (2008). Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré. **Tese de**

doutoramento. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Campinas, SP.

- Giger, W.; Brunner, P.H.; Schaffner, C. (1984). 4-Nonylphenol in sewage-sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. **Science**. 225:623–5.
- Hamann, D.P.A.; Baars, M.H.G.; Rep, B.; Hooibrink, S.R.; Kerkhof-Garde, M.R.; Klein, R.A.W.; van Lier. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8T cells. **The Journal of Experimental Medicine**. 186: 1407–1418.
- HELCOM (Helsinki Commission). (2002). Guidance document on nonylphenol/nonylphenol ethoxylates (Np/NPEs). **Baltic Marine Environment Protection Commission**. Finland: Helsinki.
- Jorgensen, M.; Vendelbo, B.; Skakkebaek, N.E.; Leffers, H. (2000). Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes. **Environmental Health Perspectives**. 108:403-12.
- Kathryn, L.K.; Rizwan, R.K.; Kimberly, A.D.; Dennis Crouse, W.D.; Chafin, B.E.K. (2001). Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. **Cytometry**. doi: 10.1002/1097-0320(20010901)45:1<27::aid-cyto1141>3.0.co;2-i.
- Klein, S.L.; Hodgson, A.; Robinson, D.P. (2011). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**. 92(1):67-73. doi:10.1189/jlb.0811427.
- Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater

- contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. **Environmental Science Technology**. 36(6):1202–11.
- Kortenkamp, A.; Altenburger, R. (1998). Synergisms with Mixtures of Xenoestrogens: A Reevaluation Using the Method of Isoboles. **The Science of the Total Environment**. 221: 59-73.
 - Kovats, S. (2012). Estrogen receptors regulate an inflammatory pathway of dendritic cell differentiation: mechanisms and implications for immunity. **Hormones and Behavior**. 62, 254–262.
 - Kudo, C.; Wada, K.; Masuda, T.; Yonemura, T.; Shibuya, A.; Fujimoto, Y.; Nakajima A, Niwa H, Kamisaki Y. (2004): Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. **Journal of Neurochemistry**. 88: 1416-1423.
 - Langford, K.H.; Lester, J.N. (2002). **Fate and behaviour of endocrine disrupters in wastewater treatment processes**. In: Brikett JW, Lester JN, editors. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton, USA: CRC Press Inc.
 - Lee, M.H.; Kim, E.; Kim, T.S. (2004). Exposure to 4-tert-octylphenol, an environmentally persistent alkylphenol, enhances interleukin-4 production in T cells via NF-AT activation. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 197:19-28.
 - Lee, P.C. (1998). Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male new-born rats. **Endocrine**. 9(1), 105.
 - Lepom, P.; Brown, B.; Hanke, G.; Loos, R.; Quevauviller, P.; Wollgast, J. (2009). Needs for reliable analytical methods for monitoring chemical pollutants in

surface water under the European Water Framework Directive. **Journal of Chromatography A**. 1216, 302–315.

- Loyo-Rosales, J.E.; Rosales-Rivera, G.C.; Lynch, A.M.; Rice, C.P.; Torrents, A. (2004). Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 2016-2020.
- Maniero, M, G. (2008). Remoção da atividade estrogênica de 17 beta-estradiol e 17 alfa-etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂. **Tese de doutoramento**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Engenharia Química, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Manzano, M.A.; Perales, J.A.; Sales, D; Quiroga, J.M. (1998). Effect of concentration on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**. 61:489–96.
- McKay, L.I.; Cidlowski, J.A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-Kappa B and steroid receptor-signaling pathways. **Endocrine Reviews**. 20: 435-459.
- MDEP. Maine Department of Environmental Protection. (2010). Basis statement for chapter 883, designation of the chemical class nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as a priority chemical and safer chemicals program support document for the designation as a priority chemical of nonylphenol ethoxylates. **Disponível (Online)**.
http://www.maine.gov/dep/oc/safechem/nonylphenol%20_support_document_final.pdf. (13 de março de 2018).

- Meyer, A.; Sarcinelli, P.N.; Moreira, J.C. (1999). Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? **Cadernos de Saúde Pública**. 15(4): 845-850.
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**. Volume 340, Issues 9–10, 2017, Pages 403-405, ISSN 1631-0691.
- Naylor, C.G.; Mieure, J.P.; Adams W.J.; Weeks, J.A.; Castaldi, F.J.; Ogle, L.D. (1992). Alkylphenol ethoxylates in the environment. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 69:695–703.
- Nogueira, J. M. F. (2003). Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitoração dos Sistemas Aquáticos. **Química**. 88: 65-71.
- Petrovic, M.; Barcelo, D.; Diaz, A.; Ventura, F. (2003). Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. 14:516–27.
- Pisapia, L.; Del Pozzo, G.; Barba, P.; Caputo, L.; Mita, L.; Viggiano, E.; Russo, G.L.; Nicolucci, C.; Rossi, S.; Bencivenga, U.; Mita, D.G.; Diano, N. (2012). Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. **General and Comparative Endocrinology**. Volume 178. Issue 1. Pages 54-63.
- Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. (1997). **Imunologia**. Editora Manole Ltda, São Paulo.
- Rust, D. & Wildes, S. (2008). Surfactants: a market opportunity study update, United soybean board, **Omni Tech International**, Ltd., Midland.

- Sallusto, F.; Geginat, J. & Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annual Review Immunology**. 22, 745–763.
- Shang, D.Y.; Macdonald, R.W.; Ikonou, M.G. (1999). Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. **Environmental Science Technology**. 33:1366–72.
- Shiraishi, H.; Carter, D.S.; Hites, R. A. (1989). Identification and determination of tert-alkylphenols in carp from the Trenton Channel of the Detroit River, Michigan, USA. **Biomedical & Environmental Mass Spectrometry**. 18: 478-483.
- Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 65: 143-150.
- Stiene-Martin, A.E.; Lotspeich-Steininger, C.A.; Koepke, J.A. (1998). **Clinical Haematology**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Tao, M.S.; Chang, C.H.; Lin, C.L.; Hou, J.W. (2014). The association between nonylphenols and sexual hormones levels among pregnant women: A cohort study in Taiwan. **PLOS ONE**. 9, E104245.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1997). **Special Report on Environmental Endocrine Disruption: an Effects Assessment and Analysis**. n. EPA/630/R- 96/012, Washington D.C.
- USEPA. (2015). National Primary Drinking Water Regulations. United States Environ. Prot. Agency. **Disponível (Online)**. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>. (10 de setembro de 2017).

- Vazquez-Duhalt, Rafael & Marquez-Rocha, F & Ponce Rivas, Elizabeth & Licea, Alexei & Viana, Maria Teresa. (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. **Applied Ecology and Environmental Research**. 4. 1-25.
- Vidor, T.F.; Jahn, M. P. (2015). Regulamentação com relação à disposição de substâncias com potencial de desregulação endócrina em águas superficiais: uma revisão da literatura. **Direito Ambiental**. vol. 80. p. 321-343. São Paulo: Ed. RT, out-dez.
- Wang, Z.Q.; Lou, Y.J. (2004). Proliferation-Stimulating Effects Of Icaritin And Desmethylcaritin In MCF-7 Cells. **European Journal of Pharmacology**. 504: 147– 153.
- Waring, R. H.; Harris, R. M. (2005). Endocrine disrupters: A human risk? **Molecular and Cellular Endocrinology**. 244: 2–9.
- Wenhui Qiu, Yang Shen, Chenyuan Pan, Shuai Liu, Minghong Wu, Ming Yang, Ke-Jian Wang. (2016). The potential immune modulatory effect of chronic bisphenol A exposure on gene regulation in male medaka (*Oryzias latipes*) liver. **In Ecotoxicology and Environmental Safety**. Volume 130, Pages 146-154.
- White, K.L Jr.; Germolec, D.R.; Booker, C.D. (2005). Dietary methoxychlor exposure modulates splenic natural killer cell activity, antibody-forming cell response and phenotypic marker expression in F0 and F1 generations of Sprague Dawley rats. **Toxicology**. 207:271-81.
- Witorsch, R.J. (2002). Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risk be predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 36: 118-130.

- Zhang, Y.-X.; Yang, X.; Zou, P.; Du, P.-F.; Wang, J.; Jin, F.; Jin, M.-J.; She, Y.-X. (2016). Nonylphenol Toxicity Evaluation and Discovery of Biomarkers in Rat Urine by a Metabolomics Strategy through HPLC-QTOF-MS. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. *13*, 501.