

LUCIANA MATEUS GONÇALVES

AÇÃO DO BISFENOL A SOBRE ILHOTAS DE NEONATOS
DE CAMUNDONGOS

CAMPINAS
2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

LUCIANA MATEUS GONÇALVES

**AÇÃO DO BISFENOL A SOBRE ILHOTAS DE NEONATOS
DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra
em Biologia Funcional e Molecular na área de
FISIOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'E. Magalhães Carneiro'.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LUCIANA
MATEUS GONÇALVES, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO

CAMPINAS
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G586a Gonçalves, Luciana Mateus, 1988-
Ação do bisfenol A sobre ilhotas de neonatos de camundongos / Luciana Mateus Gonçalves. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Bisfenol A. 2. Ilhotas pancreáticas. 3. Insulina - Secreção. 4. Neonatos. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of bisphenol A in islets from newborn mice

Palavras-chave em inglês:

Bisphenol A

Islets of Langerhans

Insulin - Secretion

Neonates

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Ângelo Rafael Carpinelli

Data de defesa: 29-01-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de janeiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

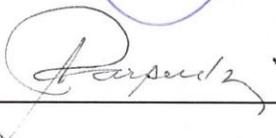
Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
(Orientador)



Prof. Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio



Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli



Prof. Dra. Fernanda Ortis

Prof. Dr. Rui Curi

RESUMO

A incidência do diabetes mellitus tipo 2 vem crescendo em todo o mundo, e a estimativa para os próximos anos é que continue aumentando. Dentro desse panorama, destacamos estudos relacionados com substâncias classificadas como desreguladores endócrinos, caracterizados tanto por alterar a síntese, liberação e ação de hormônios bem como atuar sobre receptores hormonais. Dentre os desreguladores endócrinos, alguns apresentam potencial obesogênico e diabetogênico, como é o caso do Bisfenol A (BPA). Estudos demonstram que o BPA, substância utilizada na manufatura do plástico policarbonato e resina epóxi, possui ação sobre receptores de estrogênio. Devido sua ampla aplicação em itens utilizados cotidianamente, estamos constantemente expostos ao BPA desde o desenvolvimento fetal. O objetivo desse estudo foi investigar o efeito da exposição de ilhotas pancreáticas de camundongos neonatos ao BPA. Foram utilizadas ilhotas de neonatos (4 a 6 dias de vida) cultivadas por 48 horas com 0,1nM de BPA para avaliar: 1) secreção de insulina; 2) expressão gênica; 3) conteúdo proteico. Os resultados foram analisados pelo teste *t-Student*, com nível de significância $p < 0,05$. A secreção de insulina induzida por glicose ou solução de KCl 40 mM foi prejudicada nas ilhotas tratadas com BPA. O conteúdo total de insulina, assim como a expressão dos genes da insulina não foram alterados. Houve redução tanto da expressão gênica como do conteúdo proteico de conexina 36 nas ilhotas tratadas. O BPA reduziu a expressão gênica da subunidade beta 2 do canal de cálcio do tipo L e o conteúdo proteico das subunidades kir6.2 e sur1 do canal de potássio ATP-dependente. O conteúdo de vamp2 e syntaxina 1A também foi menor nas ilhotas tratadas. Concluímos que a exposição das ilhotas de neonatos ao BPA na concentração e tempo utilizados promove alterações dos mecanismos moleculares envolvidos na secreção de insulina.

ABSTRACT

Type 2 diabetes is increasing worldwide. Recently, studies have shown the diabetogenic effects of some chemical components used in packages of food and beverages. An obesogenic and diabetogenic substance is the bisphenol A (BPA), used in manufacture of polycarbonate plastic and epoxy resin. Our exposure to this substance may begin during fetal development and in the first hours of life still in hospital. The aim of this study was to investigate the effects of BPA in islets from newborn mice. Neonate pancreatic islets (4-6 days) were isolate by collagenase method and were cultured with BPA (0.1 nM) for 48 hours, and then used to evaluate: 1) insulin secretion; 2) gene expression; 3) protein content. The results were analyzed by Student t-test, $p < 0.05$. We observed a reduced insulin secretion in response to both glucose and 40 mM KCl solution. However, total insulin content and *Ins1/Ins2* gene expression was not altered. On the other hand, connexin 36 gene and protein expression were decreased. Another genes involved with b-cell maturation were unchanged. Furthermore, BPA decreased gene expression of beta 2 subunit of L-type calcium channel. Protein content of K-ATP channel (kir6.2 and sur1), vamp2 and syntaxin 1A were also reduced. We concluded that 0.1 nM BPA exposure for 48 h alters molecular mechanisms involved with insulin secretion from newborn islets in culture.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
INTRODUÇÃO	1
Pâncreas endócrino.....	2
Maturação da célula beta pancreática.....	3
Síntese e secreção da insulina.....	5
Extrusão do grânulo de insulina.....	8
O papel da conexina 36 (cx36) na secreção de insulina.....	10
Bisfenol A (BPA).....	11
OBJETIVO	16
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Animais.....	19
Isolamento de ilhotas e cultura.....	19
Secreção de Insulina e conteúdo total.....	20
RT-PCR em tempo real.....	21
Western Blot.....	23
Análise estatística.....	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	68

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me incentivaram e nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar à frente de tudo que eu faço sempre me guiando.

Aos meus pais que sempre me incentivaram a continuar os estudos em busca de um futuro melhor. Agradeço ao meu irmão que esteve ao meu lado auxiliando no que eu precisei. Agradeço ao meu namorado que desde a faculdade sempre compreendeu meus projetos e me ajudou muito.

Aos alunos que idealizaram e organizaram, em 2011, o I Curso de Inverno em Fisiologia (IB-Unicamp) que possibilitou meu primeiro contato com o mundo da pesquisa.

Ao professor Everardo que generosamente me aceitou como aluna especial de sua disciplina, depois como estagiária e finalmente como sua aluna de mestrado, e me ensinou bastante nesses 3 anos de laboratório. Aos professores Boschero e Helena Oliveira que sempre foram muito receptivos e contribuíram para meu crescimento como estudante e pessoa. À professora Ana Paula que contribuiu com esse trabalho.

Ao Claudio e a Emerielle por me ajudarem durante o desenvolvimento do meu trabalho, sempre com paciência e atenção, me ensinando aspectos fundamentais para me tornar uma boa pesquisadora.

À amiga Sandra Mara que me ajudou quando eu cheguei ao laboratório, bem como Junia, me ensinando muito até hoje, pessoas com quem posso contar.

Às amigas Tarlliza e Juliana pelas conversas e desabafos.

Aos amigos Jane, Adriene, Gustavo, José Maria, André, Jean, Camila, Nayara e Miriam pelos momentos descontraídos.

Aos demais colegas de laboratório (14 e 15) que de algum modo contribuíram com o meu aprendizado.

Aos colegas Jamaira e Igor do laboratório 4.

À Marise que possui papel fundamental para o bom andamento do laboratório.

Aos funcionários do departamento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proteínas SNARE, acoplamento do grânulo de insulina e exocitose. Adaptado de Rorsman e Restrom, 2003.....	9
Figura 2. Efeitos potenciais da exposição ao BPA durante diferentes estágios do desenvolvimento. Adaptado de Nadal, A. Nat. Rev. Endocrinol. 9, 9–10 (2013).....	15
Figura 3. Protocolo experimental.....	20
Figura 4. Curva dose resposta ao BPA – IC50.....	26
Figura 5. Exposição <i>in vitro</i> ao BPA prejudica a secreção de insulina de ilhotas de neonatos.....	28
Figura 6. Efeito do tratamento com BPA sobre a expressão de genes envolvidos nos processos de maturação da célula beta de ilhotas de neonatos em cultura.	29
Figura 7. Exposição <i>in vitro</i> ao BPA não altera o conteúdo total de insulina de ilhotas de neonatos.	30
Figura 8. BPA reduz a expressão gênica e conteúdo proteico da conexina 36 de ilhotas de neonatos.....	32
Figura 9. BPA induz aumento da expressão gênica de <i>Cdc42</i> mas não altera <i>Ccnd2</i> em ilhotas de neonatos.	33
Figura 10. BPA altera secreção de insulina induzida por potássio 40 mM e a expressão gênica da subunidade 2 do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L.....	35
Figura 11. BPA altera o conteúdo proteico das subunidades do canal de potássio em ilhotas de neonatos tratadas <i>in vitro</i>	37
Figura 12. BPA reduz o conteúdo proteico das proteínas SNARE de ilhotas de neonatos.. ..	39

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma

µm – micrometro

36B4 – proteína ribossomal P0

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

ATPCI – ATP citrato liase

BPA – Bisfenol A

Cacna1c – Ca_v1.2 - subunidade que forma o poro do canal de Ca²⁺ voltagem dependente do tipo L

Cacnb2 - CaVβ2 - subunidade regulatória intracelular do canal de Ca²⁺ voltagem dependente do tipo L

Cacnb3 – CaVβ3 - subunidade regulatória intracelular do canal de Ca²⁺ voltagem dependente do tipo L

Ccnd2 – ciclina D2

Cdc42 – proteína controladora de divisão celular 42

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório

CEUA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

Cx36 – Conexina 36 ou Gjd2

Ca²⁺ - íons cálcio

DMSO – sulfóxido de dimetil

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDCs - Químicos Desreguladores Endócrinos

EFSA - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

ER – receptor de estrógeno

Gck – glicoquinase

DG – dia de gestação

Gjd2 – gene da conexina 36

Glut – proteína transportadora de glicose

GSIS – secreção de insulina estimulada por glicose

GTP – guanosina trifosfato

G6pc – glicose 6 fosfatase

Hnf4a - *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*

K_{ATP} – canal de potássio sensível ao ATP

KCl – cloreto de potássio

Kcnj11 – gene do Kir6.2

Kir6.2 – canal de potássio, subfamília J, membro 11

K_m - constante de Michaelis

M – molar

Mafa – *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (avian)*

mM – milimolar

MUNC – família de proteínas envolvidas no tráfego da membrana intracelular

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Ngn3 - neurogenina 3

Nkx 2.2 - NK2 homeobox 2

Nkx6.1 – NK6 homeobox 1

nM – nanomolar

Pdx - *pancreatic duodenal homeobox factor 1*

P65 – subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa

PND – dia após o nascimento

RNA – ácido ribonucleico

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa

Sec1 – secretório 1

Slc2a2 – gene do glut 2

Snap – proteína associada a sinaptossoma

SNARE - *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*

Stx1a – syntaxina 1A

Sur1 – subunidade regulatória do canal de K_{ATP}

Syt7 – sinaptotagmina VII

v/v – fração volumétrica

Vamp – proteína de membrana associada a vesícula

VDCC – canal de cálcio dependente de voltagem

INTRODUÇÃO

Pâncreas endócrino

O pâncreas é uma glândula anexa ao sistema digestório localizada posteriormente ao estômago, descrito pela primeira vez por Andreas Vesalius no século XVI, sendo composta por duas porções: exócrina e endócrina. A porção exócrina tem função no sistema digestivo e é desempenhada pelos ácinos pancreáticos que secretam, para o ducto pancreático, o suco pancreático, constituído por múltiplas enzimas digestivas (amilase pancreática – digestão de carboidratos; tripsinogênio, quimotripsinogênio e procarboxipolipeptidase – digestão de proteínas; lipase pancreática – emulsificação de gordura) (Romo & Borgstein, 1999). Por outro lado, a porção endócrina do pâncreas é responsável pela secreção de pelo menos 5 hormônios: insulina, glucagon, somatostatina, polipeptídeo pancreático e grelina, pelas células beta, alfa, delta, PP e epsilon, respectivamente. Conjuntos dessas células ficam agrupados em estruturas que recebem o nome de ilhotas pancreáticas ou de Langerhans (Larsson *et al.*, 1974; Orci e Unger, 1975; Brelje, Scharp e Sorenson, 1989; Bosco *et al.*, 2010).

Apesar de possuir vários tipos celulares, as células beta e alfa são as mais presentes nas ilhotas, constituindo cerca de 53% e 34% da ilhota em humanos e 75% e 18% em roedores, respectivamente (Brissova *et al.*, 2005). As ilhotas se encontram em torno de pequenos capilares, local onde os hormônios são secretados. Além de sua ação endócrina, estes hormônios também atuam de modo parácrino e autócrino (Bosco *et al.*, 2010).

Diferentemente do glucagon, que é um dentre os hormônios hiperglicemiantes ou contrarreguladores da ação da insulina do organismo (Unger e Orci, 1975; Quesada *et al.*, 2008), a insulina é o único hormônio hipoglicemiante, e portanto, defeitos na sua secreção ou ação acarretam prejuízos que levam a complicações que contribuem para o

desenvolvimento do diabetes melito (Kubota *et al.*, 2011; Fu, Gilbert e Liu, 2013; Meier e Bonadonna, 2013).

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, existem 347 milhões de pessoas acometidas pelo diabetes, e a expectativa é que esse número dobre até 2030 e o diabetes se torne a 7^a causa de morte no mundo. Estima-se que 1,5 milhões de mortes foram causadas diretamente pelo diabetes em 2012 (WHO,2015). Esta doença é caracterizada por uma hiperglicemia crônica relacionada a distúrbios do metabolismo de carboidratos, ácidos graxos e proteínas que resultam na deficiência da secreção e/ou ação da insulina. Seus efeitos incluem danos a longo prazo consequentes da toxicidade da glicose em excesso sobre alguns tecidos, favorecendo o desenvolvimento de retinopatia, nefropatia, neuropatia e doenças cardiovasculares (Kussman, Goldstein e Gleason, 1976; Palmberg *et al.*, 1981); (Kannel e Mcgee, 1979; Nathan, 1993). Por trazer consigo várias morbidades, o diabetes torna-se uma doença de alto custo para o sistema público de saúde justamente em decorrência de suas complicações associadas.

Maturação da célula beta pancreática

Um modo de avaliar a capacidade secretória das células beta frente a um estímulo se dá através da secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS). Apesar da insulina ser expressa nas células beta pancreáticas de fetos entre a 8^a e 9^a semana de gestação em humanos e 13,5 dia em camundongos (E13.5), a maturação da capacidade secretória ocorre somente alguns dias após o nascimento (Blum *et al.*, 2012).

Existem vários genes que são considerados marcadores de maturação, como Neurogenina 3 (*Ngn3*), *Nk6 homeobox 1 (Nkx6.1)*, *Pancreatic duodenal homeobox factor 1 (Pdx1)*, Insulina (*Ins*), Transportador de glicose 2 (*Slc2a2*), etc (Slack, 1995; Sander *et al.*,

2000; Zhang *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 2007; Blum *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Taylor, Liu e Sander, 2013).

Durante o desenvolvimento embrionário, após a diferenciação das células que irão compor o pâncreas, nova diferenciação induzida pelo fator de transcrição determinará quais destas irão compor o pâncreas endócrino (Gradwohl *et al.*, 2000; Sander *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Um estudo demonstrou que camundongos deficientes de *Ngn3* desenvolveram diabetes e morreram entre 1 a 3 dias após o nascimento por não possuírem ilhotas de Langerhans em seu pâncreas (Gradwohl *et al.*, 2000).

Outro fator de transcrição, o Nk2 homeobox 2 (*Nkx 2.2*), irá determinar quais dessas células endócrinas serão diferenciadas em células alfa e beta. O *Nkx 2.2* também é importante para manutenção da função e da arquitetura das células beta maduras, juntamente com outros genes como *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (avian) (MafA)* e o *Slc2a2* (Sander *et al.*, 2000; Doyle e Sussel, 2007).

Finalmente, a presença do fator de transcrição *Nkx6.1* determinará quais células se tornarão células beta (Sander *et al.*, 2000). Estudos demonstram que a redução na expressão desse gene está associada a conversão das células beta em outros tipos celulares, indicando seu papel central em outros processos relacionados a função e identidade da célula beta (Sander *et al.*, 2000; Talchai *et al.*, 2012; Taylor, Liu e Sander, 2013). Isso se dá pelo fato do *Nkx6.1* regular genes relacionados à biossíntese da insulina, do *glut2*, e do *pdx-1*, sendo que alterações em seu nível podem modular a expressão de diversos genes relacionados a função da célula beta (Taylor, Liu e Sander, 2013).

Outro fator de transcrição importante não só para a maturação da resposta da célula beta à glicose, mas também para a maturação do pâncreas endócrino e o direcionamento

das células que serão precursoras de células beta (Oliver-Krasinski *et al.*, 2009), é o *Pdx-1* que também regula genes específicos da célula beta, como o já citado *Slc2a2*, a *Glicocquinase (Gck)*, *Ins1* e *Ins2* (Slack, 1995; Al-Quobaili e Montenarh, 2008; Guo *et al.*, 2013). O *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (Hnf4a)*, assim como o *Pdx-1*, também possui papel importante em relação a manutenção da estrutura da ilhota e função das células beta (Odom *et al.*, 2004).

Apesar de se conhecer alguns fatores de transcrição envolvidos na maturação da célula beta, como o descrito acima, pouco se sabe sobre os mecanismos que coordenam esse processo de maturação (Blum *et al.*, 2012).

Síntese e secreção da insulina

Como dito anteriormente, a insulina é o único hormônio hipoglicemiante do nosso organismo, possuindo papel fundamental na manutenção da homeostase glicêmica.

Sintetizada nas células beta pancreáticas, a preproinsulina (precursora biologicamente inativa da insulina) após ser traduzida no ribossomo é direcionada até o retículo endoplasmático rugoso onde é clivada a um pró-hormônio, a proinsulina, pela ação de enzimas pro-hormônio convertase PC1 e PC2. A proinsulina, que também é inativa, é transportada para o complexo de Golgi, onde será estocada em grânulos. Nos grânulos, a proinsulina sofrerá ação de peptidases que darão origem à insulina (molécula biologicamente ativa) e ao peptídeo C. Esses grânulos ficam armazenados em vesículas secretórias localizadas tanto no citoplasma como ancoradas a membrana celular onde permanecem até que seja necessária sua utilização (Fu, Gilbert e Liu, 2013).

A secreção de insulina é estimulada por vários agentes insulíntrópicos (glicose, aminoácidos, ácidos graxos, etc) (Floyd *et al.*, 1966; Itoh *et al.*, 2003) porém a glicose é o

agente insulíntrópico mais importante. O transporte da glicose ocorre principalmente através de uma proteína transportadora de glicose (glut), presente em todas as células do organismo em diferentes isoformas dependendo do tecido (Thorens e Mueckler, 2010).

As células beta pancreáticas expressam o glut2, cuja constante de Michaelis (K_m) para glicose é alto, garantindo um equilíbrio entre a glicose no espaço extracelular e no citosol (Thorens *et al.*, 1988), impedindo que a célula beta fique secretando insulina constantemente e garantindo que a secreção de insulina ocorra apenas em situações onde ela seja realmente necessária para reduzir a glicemia a seu nível normal, basal, evitando uma hipoglicemia.

A célula beta regula a secreção de insulina não apenas pela alteração de nutrientes circulantes, em especial pelo aumento da concentração de glicose plasmática, mas também pela influência de hormônios (Sharma e Prossnitz, 2011), neurotransmissores (Begg e Woods, 2013) e agentes farmacológicos (Proks *et al.*, 2002). Isso permite que haja manutenção da homeostase glicêmica em situações diversas como gravidez, jejum, exercício, refeição, velhice, entre outros.

Uma vez no interior da célula, a glicose passa por uma série de reações e sua fosforilação (primeira reação) realizada pela enzima glicoquinase (hexoquinase IV) é limitante nesse processo. Essa reação é considerada limitante por ser irreversível e por impedir que a glicose volte para o meio extracelular, favorecendo o fluxo glicolítico. O produto final da metabolização da glicose no citosol é o piruvato (2 moléculas de piruvato para cada molécula de glicose) (Wiederkehr e Wollheim, 2012).

O piruvato, por sua vez, é convertido à acetil-CoA ou oxaloacetato na matriz mitocondrial e metabolizado no ciclo do ácido cítrico (fosforilação oxidativa), resultando no aumento da razão ATP/ADP. Esse aumento da razão ATP/ADP promove o fechamento de

canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), acumulando potássio no meio intracelular, provocando despolarização da membrana celular. A despolarização leva a abertura de canais de cálcio dependente de voltagem (VDCC) permitindo o influxo de cálcio do meio extracelular para o intracelular de modo pulsátil (Wiederkehr e Wollheim, 2012). Esse influxo de cálcio irá promover a exocitose dos grânulos de insulina (Nevins e Thurmond, 2003).

A secreção de insulina ocorre de modo bifásico, onde a primeira fase é mais rápida (cerca de 5 minutos) (Rorsman *et al.*, 2000; Straub e Sharp, 2004; Henquin, 2009; Huang e Joseph, 2014) e o cálcio proveniente da abertura dos VDCC mobiliza grânulos de insulina que estão localizados mais próximos a membrana. Já a segunda fase é mais duradoura e robusta, até que se obtenha a normalização da glicemia. Essa segunda fase é predominantemente independente dos canais K_{ATP} (Seghers *et al.*, 2000; Jitrapakdee *et al.*, 2010) e está principalmente envolvida com os fatores de acoplamento metabólico (ATP, NADPH, malonil-CoA, GTP, glutamato, entre outros) e lançadeiras como malato-asparato e glicerol-fosfato, que são as chamadas vias de amplificação da secreção de insulina (Prentki, Matschinsky e Madiraju, 2013; Patterson *et al.*, 2014).

Após ser secretada, a insulina é transportada pela circulação sanguínea até as células alvo onde irá se ligar ao seu receptor, presente na membrana plasmática. Em células musculares e adiposas, a ativação do receptor de insulina resulta no aumento da captação de glicose em segundos (Klip *et al.*, 2014). Além de sua ação sobre a captação de glicose, a insulina também modifica a atividade de várias enzimas envolvidas no metabolismo celular, promovendo mudanças na taxa de transcrição de DNA e tradução de RNAs mensageiros, resultando no remodelamento da maquinaria celular de acordo com a necessidade metabólica das células (Dimitriadis *et al.*, 2011).

Extrusão do grânulo de insulina

Para que os grânulos de insulina cheguem até a membrana ocorre um remodelamento do citoesqueleto (filamentos de actina) (Kalwat e Thurmond, 2013) e posterior acoplamento e fusão com a membrana plasmática da célula beta.

O grupo de proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*) é um grupo de proteínas que possuem um papel importante na fusão dos grânulos. As proteínas vamp (*vesicle-associated membrane protein*) (também conhecidas como sinaptobrevinas), snap (*synaptosome-associated protein*) 25 e syntaxina são proteínas SNARE que formam um complexo responsável pela união do grânulo à membrana plasmática de modo análogo ao de um zíper (Rorsman e Renström, 2003).

As proteínas SNARE possuem também um papel relevante em relação ao cálcio, que é importante no processo de secreção de insulina (Rorsman e Renström, 2003). A subunidade alfa 1C do canal de cálcio interage com a syntaxina, snap25 e p65 que realizam um arranjo do complexo secretório, garantindo que ocorra o contato do cálcio intracelular com os grânulos, restringindo-o à área da membrana onde alguns grânulos se encontram (Barg *et al.*, 2002; Rorsman e Renström, 2003).

Ainda, sinaptotagmina, snap-25 e syntaxina se ligam à subunidades beta 2 e 3 do VDCC e os grânulos de insulina vão sendo liberados graças a essa exposição imediata à elevação do cálcio, demonstrando a importância do estado do canal de cálcio (aberto ou fechado) para a exocitose (Rorsman e Renström, 2003) (Fig.1). A sinaptotagmina (I, II, III, VII), que possui dois sítios de ligação de cálcio, também é importante para a fusão das vesículas (Rorsman e Renström, 2003), bem como a proteína GTPase Rab3, que é considerada uma controladora do acoplamento e fusão da vesícula com a membrana

plasmática (Iezzi *et al.*, 1999; Rorsman e Renström, 2003).

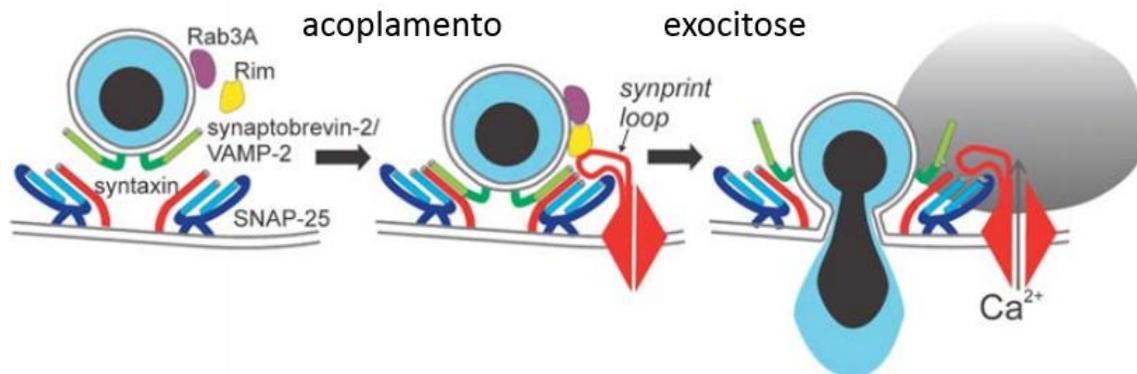


Figura 1. **Proteínas SNARE, acoplamento do grânulo de insulina e exocitose.**
Adaptado de Rorsman e Restrom, 2003.

A proteína sec1 (secretório 1) / munc-18 (*mammalian uncoordinated-18*) também regula a exocitose através da interação com a syntaxina. Estudos demonstram que a proteína munc-18 acelera a fusão de vesículas e sua ligação à syntaxina pode estar relacionada ao aumento das SNARE *in vivo* (Dulubova *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado em ilhotas de ratos a importância de munc18b na secreção de insulina, onde sua superexpressão potencializou a secreção bifásica de insulina e, quando silenciada, houve redução significativa da secreção de insulina principalmente na primeira fase, por sua interação com proteínas SNARE (Lam *et al.*, 2013).

O papel da conexina 36 (cx36) na secreção de insulina

Como já foi dito, a secreção de insulina ocorre de modo pulsátil, e isso se deve ao padrão oscilatório de cálcio intracelular. A sincronização da distribuição desse cálcio entre as células beta da ilhota ocorre através de junções comunicantes. Nas células beta, a cx36 é importante na formação destes poros (Holder, Elmore e Barrett, 1993). Os quais são permeáveis à diversos íons e metabólitos (Bavamian *et al.*, 2007; Charpantier, Cancela e Meda, 2007; Serre-Beinier *et al.*, 2009), o que permite um sincronismo da atividade elétrica em toda a ilhota (Meda *et al.*, 1984). Além de realizar a comunicação célula-célula, transporte de moléculas e sincronização elétrica e mecânica, a cx36 ainda possui várias funções na diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, morfogênese, proliferação (Collares-Buzato *et al.*, 1998; Nlend *et al.*, 2006; Bavamian *et al.*, 2007) e morte celular (Collares-Buzato *et al.*, 1998). A cx36 ainda é importante para uma regulação fina da biossíntese, estocagem e liberação da insulina sob condições basais e estimulatórias. Assim, a cx36 está relacionada com a expressão e secreção de insulina estimulada por glicose e possui forte relação com o acoplamento estímulo secreção (Bavamian *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2010). Camundongos *knockout* para cx36 apresentam alterações na tolerância à glicose e suas ilhotas quando isoladas não apresentam sincronia na oscilação de cálcio intracelular, perdendo o perfil pulsátil que coordena a primeira e segunda fase da secreção de insulina (Head *et al.*, 2012). Ainda, animais pré diabéticos apresentam diminuição na expressão de cx36, indicando que a comunicação célula-célula desempenha um papel vital na função secretora da célula beta e, mostrando que a cx36 é importante no desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Carvalho *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* também demonstram que células beta dispersas em cultura primária apresentam alteração na secreção de insulina, mas assim que é realizada a reagregação dessas células, há

uma normalização da secreção de insulina, confirmando que os mecanismos de secreção são dependentes da interação entre as células da ilhota (Halban *et al.*, 1982).

Logo após o nascimento, a cx 36 possui papel fundamental na maturação da resposta secretória das células beta neonatais frente ao estímulo com glicose. Esse fato é evidenciado ao se observar que a expressão de cx36 ocorre de forma crescente e diretamente proporcional com a maturação da resposta secretória ao longo do tempo (Leite *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que a correlação entre insulina e cx36 é baixa no período fetal e vai aumentando conforme o animal vai se tornando jovem e adulto, na mesma medida que vai acontecendo o processo de maturação dos mecanismos secretórios de insulina (Carvalho *et al.*, 2010).

Bisfenol A (BPA)

O BPA é um composto orgânico, $C_{15}H_{16}O_2$, reconhecido por sua estabilidade e resistência a altas temperaturas, produzido pela condensação do fenol com acetona em pH ácido. Muito utilizado na forma de monômero na fabricação do plástico policarbonato e também da resina epóxi, se encontra presente em garrafas plásticas, revestimento de enlatados, potes plásticos em geral. O BPA é uma molécula que está na classe dos Químicos Desreguladores Endócrinos (EDCs) e com potencial obesogênico e diabetogênico. É considerado EDC qualquer substância química, natural ou sintética, que promova alterações no sistema endócrino através da modificação da síntese ou do efeito dos hormônios, ou ainda, atue sobre o receptor hormonal (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Apesar de existirem mais de 800 EDCs, o BPA está entre os mais estudados (Zoeller *et al.*, 2012), visto sua ampla presença no ambiente e nosso contato contínuo e inevitável com esta substância.

Estamos expostos ao BPA tanto por via oral como via cutânea e respiratória. Em contato com papel térmico utilizado na emissão de cupom fiscal e extrato bancário, por exemplo, estima-se que absorvemos cerca de 46% do BPA existente em tais cupons (Zalko *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos relacionam níveis elevados de BPA no plasma à obesidade e diabetes tipo 2. (Melzer *et al.*, 2010; Shankar e Teppala, 2011; Silver *et al.*, 2011). Além disso, infarto do miocárdio e prevalência de doenças arteriais periféricas também foram associados a níveis elevados de BPA na urina (Melzer *et al.*, 2010; Shankar, Teppala e Sabanayagam, 2012).

De acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), o consumo diário tolerável seguro de BPA é de até 4µg/kg de peso/dia (EFSA, 2015). Ainda, em 2013 estimou-se que a exposição via oral de crianças entre 6 meses a 3 anos de idade foi de 375 ng/kg/dia, e de pessoas acima de 18 anos foi de 132 ng/kg/dia (EFSA, 2013). Já foi demonstrado que a quantidade de BPA encontrada no ambiente é em torno de 2,4 µg/Kg, e que uma dose baixa em relação a encontrada no meio ambiente, 0,23 ng/L, tem efeito tanto no desenvolvimento embrionário quanto no desenvolvimento pós natal em camundongos. Ainda, cerca de 2,2 ng/ml de BPA foi encontrado tanto no soro fetal como fluido amniótico em humanos (Ikezuki *et al.*, 2002). Também foi demonstrado, em uma população adulta de chineses, que a concentração urinária e sanguínea de BPA, foi em média 0,87 µg/L e 0,18 µg/L respectivamente (He *et al.*, 2009). De modo similar, outro levantamento demonstrou a média de 0,81ng/ml de BPA na urina de chineses (Ning *et al.*, 2011). Um estudo realizado em gestantes encontrou 3,1 ng/ml no plasma da mãe, 2,3 ng/ml no plasma fetal e 12,7 ng/g na placenta (Schönfelder *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que o BPA (e outros EDCs) age em vários tecidos: cérebro, tecido adiposo, pâncreas, músculo esquelético, fígado, etc. Dentre seus efeitos fisiopatológicos

estão: obesidade, resistência à insulina, diabetes, hipertensão e dislipidemia, todos envolvidos com a síndrome metabólica (Neel e Sargis, 2011).

O BPA pode atuar no organismo através dos receptores de estrógeno (ER - ER α , ER β - GPR30, ncmERs) pela via clássica (genômica) e por vias alternativas (não genômica). Estes receptores estão envolvidos no balanço energético e controle da homeostase glicêmica. Evidências indicam o ER α como principal mediador do balanço energético (Ropero *et al.*, 2008). Em humanos já foi demonstrado que polimorfismo no ER α está associado ao diabetes tipo 2 e à síndrome metabólica (Gallagher *et al.*, 2007). Ainda, estudos com animais *knockout* para ER α demonstraram que esses animais apresentam redução de GLUT4 no músculo esquelético, e concomitantemente, apresentam resistência à insulina (Barros *et al.*, 2006), bem como obesidade (Barros, Machado e Gustafsson, 2006) e severa resistência hepática à insulina (Bryzgalova *et al.*, 2006). Os estrógenos também podem regular a quantidade de tecido adiposo branco bem como sua distribuição, via ER α e β . Quando foi observada a razão ER α < ER β no tecido adiposo visceral, houve associação entre obesidade e aumento no nível de leptina em mulheres (Ropero *et al.*, 2008).

Em relação à célula beta pancreática, estudos mostram que o BPA possui um efeito mais potente que os estrógenos sobre os ERs. Estudos *in vitro* demonstraram que o BPA, via ER β , promove a probabilidade de uma menor abertura dos canais de K_{ATP}, o que leva à despolarização da membrana que promove a abertura de VCCD e o influxo de Ca²⁺ potencializando assim a secreção de insulina (Soriano *et al.*, 2012). Via ER α , o BPA promove a rápida ativação de *extracelular signal regulated kinases* (ERK)1/2 que regulam a expressão do gene da insulina, aumentando assim sua biossíntese (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008).

Estudos que tratam com BPA o animal em idade adulta por alguns dias, seja via oral ou injeção subcutânea, demonstram que esses animais desenvolvem alterações metabólicas como a resistência à insulina tanto em músculo como tecido adiposo, tornando-se então hiperinsulinêmicos (Batista *et al.*, 2012). Em relação às alterações hepáticas, a exposição ao BPA influencia a síntese *de novo* de ácidos graxos através do aumento da expressão de genes lipogênicos, contribuindo para o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica (Marmugi *et al.*, 2012). Ainda o BPA promove diminuição da atividade da glicoquinase hepática (Perreault *et al.*, 2013).

Um modelo também estudado tem sido a exposição perinatal da prole ao BPA via mãe, uma vez que o BPA atravessa a barreira placentária (Balakrishnan *et al.*, 2010; Nishikawa *et al.*, 2010) e também é encontrado no leite materno (Mendonca *et al.*, 2014). Por ser obesogênico, a prole exposta ao BPA apresenta aumento da adipogênese (Somm *et al.*, 2009). Quando submetidos a dieta normal, a prole apresentou prejuízo na tolerância à glicose, e com dieta hiperlipídica houve aumento da predisposição à síndrome metabólica. (Wei *et al.*, 2011). Além disso, apresentaram alterações na homeostase glicêmica, decorrentes de alterações na célula beta pancreática (Wei *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013). Pode-se dizer que a exposição ao BPA no período perinatal é crítico podendo provocar diversas alterações (Liu *et al.*, 2013) que vão se desenvolvendo à medida que a prole vai se tornando adulta e hábitos de vida vão sendo incorporados, podendo acentuar os prejuízos provocados pela exposição precoce ao BPA.

Apesar dos vários estudos investigando as alterações sobre o metabolismo da glicose provocadas pela exposição ao BPA em diferentes períodos da vida, ainda não estão esclarecidos seus efeitos quando esta se inicia durante a infância ou puberdade (Fig.2) (Nadal, 2013).

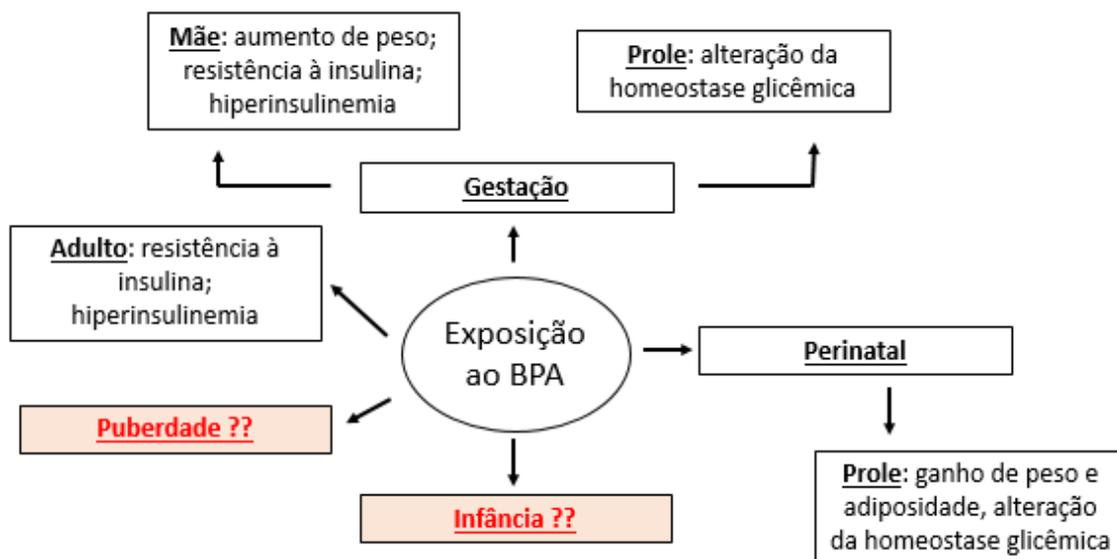


Figura 2. Efeitos potenciais da exposição ao BPA durante diferentes estágios do desenvolvimento. Adaptado de Nadal, A. Nat. Rev. Endocrinol. 9, 9–10 (2013)

Quando não iniciada já no período intrauterino (Nishikawa *et al.*, 2010), é grande a probabilidade da exposição ao BPA se iniciar logo após o nascimento ou durante o período de amamentação (Ye *et al.*, 2006), seja por contato com artigos hospitalares contendo BPA ou através do leite materno (Calafat *et al.*, 2009; Duty *et al.*, 2013). Tendo em vista o acima exposto, acreditamos ser fundamental esclarecer os efeitos do BPA sobre o metabolismo da glicose, e mais especificamente sobre a função das células beta-pancreáticas, durante o período neonatal.

OBJETIVOS

Como o início da vida é um período crítico para o desenvolvimento e já está bem estabelecido que a exposição ao BPA promove diversas alterações em diferentes órgãos em função da dose, do período de início e duração da exposição, investigamos o efeito do BPA sobre ilhotas pancreáticas de camundongos neonatos em 48h de cultura.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a secreção de insulina induzida por glicose e solução de cloreto de potássio (KCl) 40 mM em ilhotas pancreáticas de animais neonatos expostas ao BPA;
- b) Verificar a expressão gênica de marcadores de maturação de célula beta, comunicação célula-célula, canais de cálcio e potássio e de extrusão de grânulos;
- c) Verificar a expressão proteica de cx36, proteínas de extrusão de grânulos e subunidades do canal de potássio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Neonatos machos e fêmeas (de 4 a 6 dias) de camundongo C57BL6 foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade de Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, aprovada pelo protocolo nº 3313-1 (Anexo Autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal).

Isolamento de ilhotas e cultura

Os camundongos foram sacrificados por decapitação e os pâncreas removidos em fluxo laminar, colocados em solução Hanks (NaCl 136,8 mmol/L; KCl 5,3 mmol/L; CaCl₂ 1,22 mmol/L; MgSO₄ 0,81 mmol/L; Na₂HPO₂ 0,34 mmol/L; KH₂PO₄ 0,44 mmol/L; NaHCO₃ 4,16 mmol/L, com pH corrigido para 7,4) contendo albumina (1%) e glicose à 5,6mM, picotados e digeridos por colagenase (0,66 mg/ml; tipo V, Sigma, C9263, USA) em banho-maria à 37°C por 5 minutos. Para cada amostra (n) foram utilizados 2 pâncreas.

As ilhotas isoladas foram lavadas com solução Hanks 3 vezes, divididas entre os grupos Ctl e BPA e cultivadas em meio RPMI-1640, sem fenol vermelho, suplementado com 5% de soro fetal bovino tratado com carvão e dextrano (Hyclone, USA), 10 mM de glicose e 1% penicilina/ estreptozotocina à 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ por 16 horas. Em seguida, o meio foi trocado por meio contendo veículo no mesmo volume de DMSO (sulfóxido de dimetilo, v/v; Sigma, France) utilizado no grupo BPA (4,4'-isopropylidene diphenol - MP Biomedicals, LLC, France), por 48 horas.

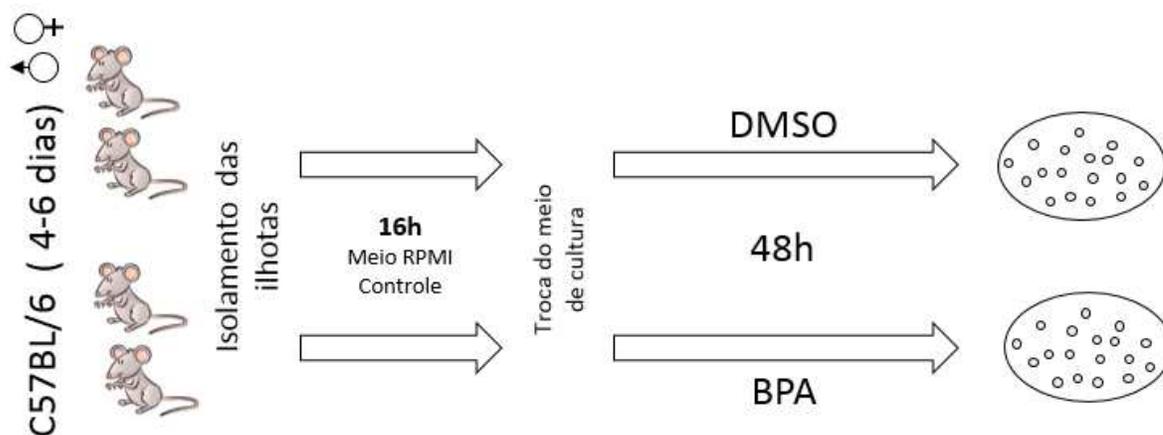


Figura 3. Protocolo experimental

Para determinação da dose a ser utilizada, foi realizada uma curva dose- resposta ao BPA onde foram feitas culturas com 5 concentrações de BPA – 0,001; 0,003, 0,01; 0,1 e 1 nM – e calculado o IC50.

Secreção de Insulina e conteúdo total

Grupos de 15 ilhotas foram pré-incubadas em solução de Krebs-bicarbonato (NaCl 115 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl₂ 2,56 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, NaHCO₃ 24 mmol/L) com 2,8mM de glicose e albumina bovina (3g/L) à 37°C por 40 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por Krebs contendo 2,8 mM de glicose, 2,8 mM de glicose + 40 mM de KCl ou 16,7 mM de glicose por 1 hora. O sobrenadante foi removido e guardado à -20°C e usado para quantificação da insulina. Grupos de 15 ilhotas também foram utilizados para extração do conteúdo total de insulina através do método de álcool ácido (concentração final de 70% de etanol e 30% de HCl 0,2 mmol/L). A insulina das amostras foi dosada radioimunoensaio (Scott, Atwater e Rojas, 1981).

RT-PCR em tempo real

Grupos de ilhotas (aproximadamente 600) foram lisadas em 500µl de solução Trizol (Ambion by Life Technologies, USA), e o RNA total foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria (razão 260/ 280nm). O cDNA foi sintetizado com 3µg de RNA de ilhota, usando a reação da transcriptase reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, USA). PCR em tempo real foi realizado utilizando Fast SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), na 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com primers específicos para as reações de PCR (Tabela 1). O gene 36B4 foi utilizado com controle interno. Os valores foram normalizados pelo próprio controle.

Tabela 1. Lista de primers

Gene	GeneBank	Sequência 5' – 3'	Amplicon (pb)
<i>36B4</i>	NM_007475.5	F: GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA R: AAGCAGGCTGACTTGGTTGC	72
<i>Cacna1c</i>	NM_001256000.2	F: AGGCGGTAGTGGAAAGCAG R: AGTGGTTCTTGCTCCCTTCG	83
<i>Cacnb2</i>	NM_001252533.1	F: CACTATTTCTCTGGCGTTCTGT R: CTGAGAAGACACCAACTGCCT	74
<i>Cacnb3</i>	NM_001044741.2	F: CGCTAACCCGGTCTATGTCT R: GTGTAGGAGTCGGCTGAACC	76
<i>Cdc42</i>	NM_009861.3	F: ACGTGTCCCCACCTGGTCCT R: GCGAGACAGCGTCCACCCAC	147
<i>Gjd2</i>	NM_010290.2	F: GGAGGGAGCAAACGAGAAGATAA R: TTACTGGTGGTCTCTGTGTTCTG	80

<i>Ccnd2</i>	XM_006505460.1	F: TAGGAGGCCCAAGTTGAATG R: ACACCCGAGACCACAGAAAC	74
<i>Hnf4a</i>	NM_008261.2	F: AACTCTCTCTGGTCCTTGTCTTTC R: CAACATTACCTACTCCTCTCCTGA	78
<i>Ins1</i>	NM_008386.3	F: TTGGACTATAAAGCTGGTGGGC R: TGCTTGCTGATGGTCTCTGATTAT	78
<i>Ins2</i>	NM_001185084.1	F: CCAGCTAAGACCTCAGGGACT R: CTGGAAGATAGGCTGGGTTGAG	88
<i>Kcnj11</i>	NM_010602.3	F: TGAGCGGTAGAGCACAAGC R: TTTATACTACTAGCCTCAGATGCCG	81
<i>Mafa</i>	NM_194350.1	F: CCAGCTGGTATCCATGTCCGT R: GATGACCTCCTCCTTGCTGAAG	70
<i>Nkx6.1</i>	NM_144955.2	F: CTTGTTGCAAACCTCTCTGGGTC R:CTCTGCTTCTCATCTTCTCCACC	79
<i>Pdx-1</i>	NM_008814.3	F: GAACCCGAGGAAAACAAGAGG R: GTTCAACATCACTGCCAGCTC	129
<i>Slc2a2</i>	NM_031197.2	F:TTACAGTCACACCAGCATAACACA R:AGTGACTIONATGTGAGCAGATCCTTC	77
<i>Snap25</i>	NM_001291056.1	F: CCATGAGAGAAGCATGAAGGA R: ATGGAGAAGGCTGATTCCAAC	148
<i>Syt7</i>	XM_006527211.1	F:CTTAGCGTCACTATCGTCCTCTG R:GTAGCCAACACTGAACTGGATTTC	354
<i>Stx1a</i>	NM_016801.3	F: GTGAGGAATTGGAAGACATGC R: GCCTTGCTCTGGTACTTGACG	298
<i>Vamp2</i>	NM_009497.3	F: CCCACACACCAGGTTTTCTGT R: GCAGGGGACACTGGGATAATA	130

Western Blot

Grupos de ilhotas (aproximadamente 600) foram lavadas 1 vez em PBS 1X e lisadas em coquetel inibidor de protease (ureia 7 M; tiourea 2 M; EDTA 5 mM; fluoreto de sódio 1 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; pirofosfato de sódio 1 mM; Fluoreto de *Fenilmetilsulfonil* 2 mM; aprotinina 0,01% v/v) por sonicação, e incubadas em Triton X-100 1% (v/v) por 40 minutos. O conteúdo proteico do lisado foi mensurado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Solução de Laemmli foi adicionada (1x) nas amostras, seguido por aquecimento à 100°C por 5 minutos. 30 µg do lisado de proteínas foi colocado em gel de SDS-poliacrilamida 10% ou 12% seguido por separação por eletroforese. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0.22 µm) e bloqueadas durante a noite (Tris 10mM, NaCl 150 mM e solução Tween-20 0.05% com albumina bovina 5%). Depois, as membranas foram encubadas com anticorpos primários contra VAMP2 (36-56, Colbioche), MUNC-18 (M4438, Sigma), Sintaxina 1 (sc-12736, Santa Cruz), SNAP-25 (S5187, Sigma), SUR-1 (sc-25683, Santa Cruz), Kir 6.2 (ab81121, Abcam), Conexina 36 (51-6300, Invitrogen), cacna1C (4332, Cell Signaling) ou α -Tubulina (T5168, Sigma). Depois da incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano (1:10000; Invitrogen, Brasil). A quimioluminescência foi detectada por um sistema de imagem digital sensível (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare, USA). A densidade ótica das bandas foi quantificada utilizando o software ImageQuant TL (GE Healthcare, USA). Os valores foram normalizados pela α -Tubulina e expressos em % do próprio controle.

Análise estatística

Os resultados foram expressos com a média \pm SEM. Para comparação entre os grupos, a significância estatística foi avaliada utilizando teste t de *Student* não pareado bicaudal. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

O primeiro passo do estudo foi definir qual a concentração de BPA a ser utilizada em ilhotas de neonatos. Para isto foi realizada uma curva dose resposta que contemplou 5 concentrações diferentes de BPA, sendo elas 0,001; 0,003; 0,01; 0,1 e 1 nM ou 10^{-12} ; $10^{-11,3}$; 10^{-11} ; 10^{-10} e 10^{-9} M, respectivamente. O IC50 encontrado foi $10^{-10,47}$ M, que corresponde à aproximadamente 0,05 nM (Fig.3).

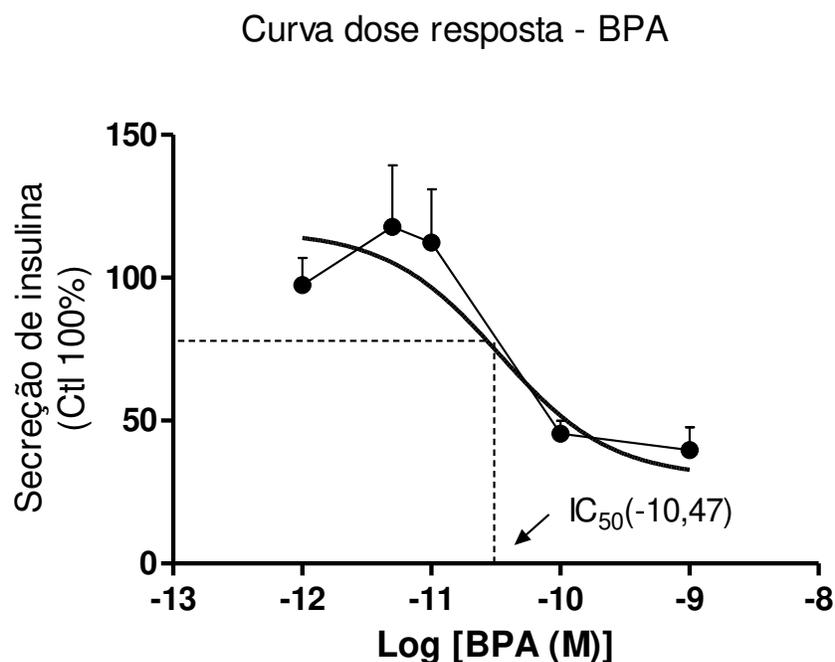


Figura 4. Curva dose resposta ao BPA – IC50. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com 5 concentrações de BPA (0,001; 0,003; 0,01; 0,1 e 1 nM) ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. Após o período de cultura, grupos de 15 ilhotas foram pré-incubadas em solução Krebs com glicose à 2,8 mM à 37°C por 40 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por Krebs contendo 2,8 e 16,7 mM de glicose por 1 hora. Para cálculo do IC50 as secreções foram normalizadas em % de resposta ao estímulo com 16,7 mM de glicose, comparando a secreção das ilhotas tratadas com seu respectivo controle. A insulina foi mensurada por radioimunoensaio. n=4-16 (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n, e a secreção de insulina de cada n foi realizada em triplicata).

A partir do resultado do IC50, optamos por uma concentração intermediária, 0,1 nM, que é uma dose 2 vezes maior que a dose do IC50, entretanto é uma dose 10 vezes menor do que a concentração normalmente utilizada em estudos com ilhotas de animais adultos (1 nM).

Após definida a dose, para observar se o BPA poderia modular a maturação e função da célula beta, primeiramente nós analisamos a secreção de insulina das ilhotas em resposta a glicose. 16,7 mM de glicose induziu aumento na secreção de insulina em ilhotas de neonatos tratadas com DMSO (Ctl) quando comparada à condição basal (2,8 mM de glicose). Já a secreção de insulina das ilhotas expostas a 0,1 nM de BPA foi prejudicada quando estimulada com glicose (16,7 mM) em comparação às ilhotas Ctl (Fig.4).

Secreção de insulina

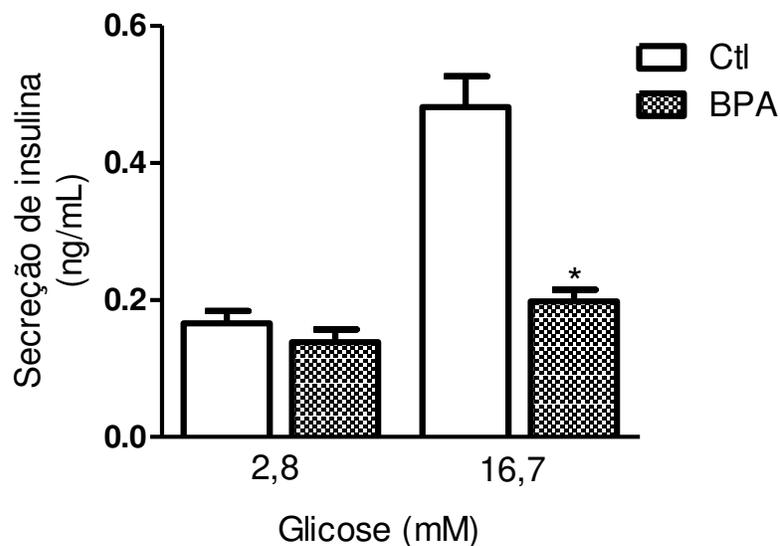


Figura 5. Exposição *in vitro* ao BPA prejudica a secreção de insulina de ilhotas de neonatos. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1 nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. Após o período de cultura, grupos de 15 ilhotas foram pré-incubadas em solução Krebs com glicose à 2,8 mM à 37°C por 40 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por Krebs contendo 2,8 e 16,7 mM de glicose por 1 hora. O gráfico representa a média \pm SEM. n= 10-11 (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n, e a secreção de insulina de cada n foi realizada em triplicata). Teste t não pareado bicaudal; *p<0,05.

Após observarmos que o tratamento com BPA diminuiu a resposta funcional de ilhotas de neonatos, investigamos primeiramente se o BPA altera o processo de maturação de células beta pancreáticas. Para isso analisamos a expressão de uma série de marcadores de maturação nessas ilhotas e observamos que o BPA não promoveu alteração dos genes *Pdx-1*, *Nkx6-1*, *Mafa*, *Hnf4a* e *Slc2a2* quando comparados com o Ctl (Fig.5). Também analisamos a expressão dos genes da insulina, *Ins1* e *Ins2*, e não encontramos diferença entre os grupos (Fig. 6A). Corroborando com esse achado, o conteúdo total de insulina também não foi alterado pelo tratamento com BPA (Fig. 6B).

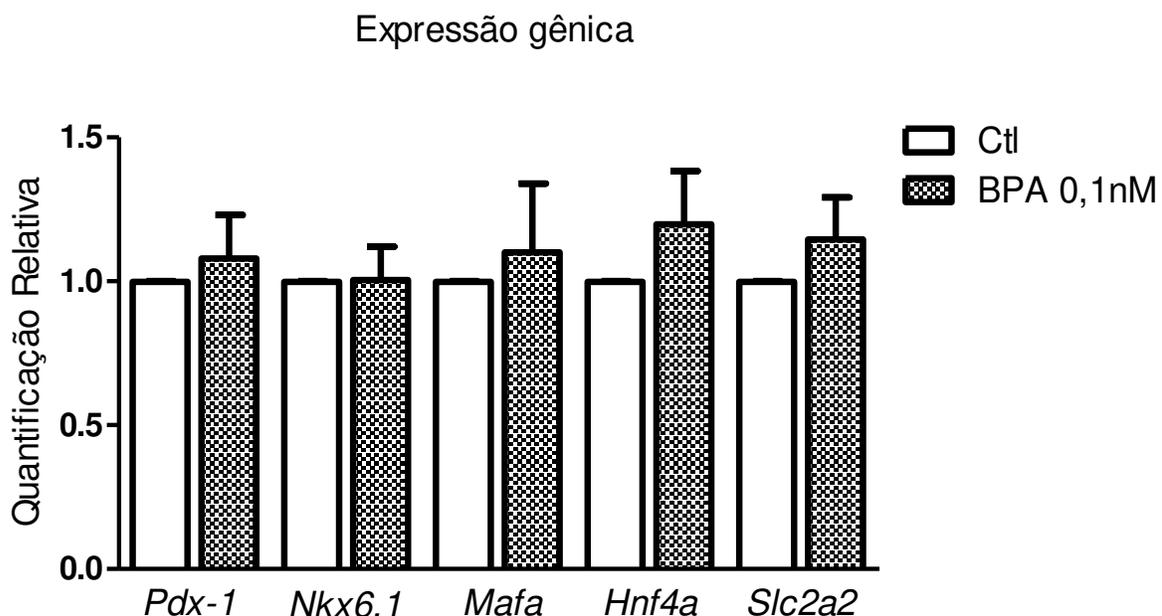
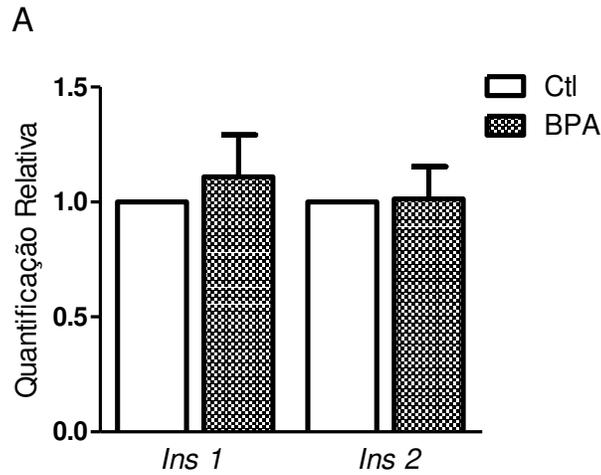


Figura 6. Efeito do tratamento com BPA sobre a expressão de genes envolvidos nos processos de maturação da célula beta de ilhotas de neonatos em cultura. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1 nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. cDNA foi sintetizado com 3µg do RNA total e usado para a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão de marcadores de maturação de célula beta: *Pdx-1*, *Nkx6-1*, *Mafa*, *Hnf4a*, *Slc2a2*. Os valores foram expressos relativo ao próprio controle. Os gráficos representam a média \pm SEM. n=5-9 (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n). Teste t não pareado bicaudal; *p<0,05.

Expressão gênica *Insulina*



Conteúdo total de insulina

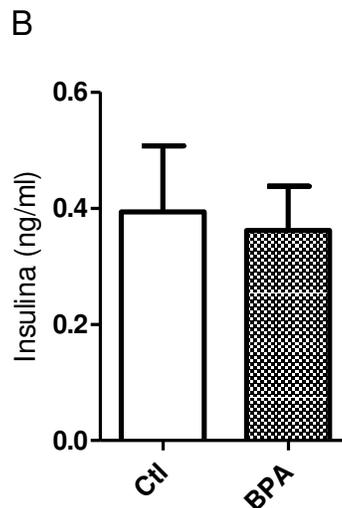
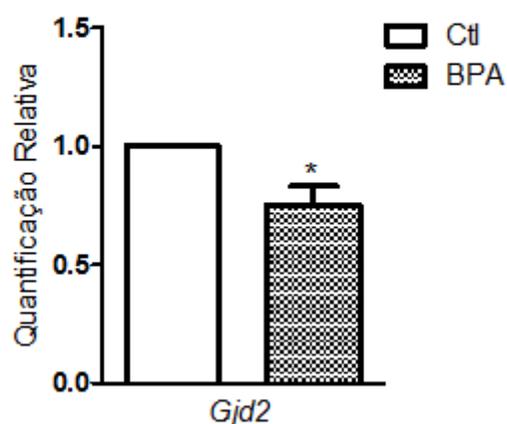


Figura 7. Exposição *in vitro* ao BPA não altera o conteúdo total de insulina de ilhotas de neonatos. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1 nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. (A) cDNA foi sintetizado com 3µg do RNA total e usado para a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão dos genes da insulina. (B) Grupos de 15 ilhotas foram colocadas em álcool ácido e posteriormente a insulina foi mensurada por radioimunoensaio. Os gráficos representam a média \pm SEM. (A) Os valores foram expressos relativo ao próprio controle. n=5-9 (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n); (B)n= 4 (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n, e o conteúdo total de insulina de cada n foi realizado em triplicata). Teste t não pareado bicaudal; *p<0,05.

Ao observar a expressão do gene que codifica a cx36, *Gjd2*, que além de ser um marcador de maturação, possui papel fundamental na reposição secretória das células beta, encontramos que a expressão do mesmo estava diminuída (Fig. 7A), bem como seu conteúdo proteico (Fig. 7B). A expressão gênica de *Cdc42* (proteína de controle de divisão celular 42) também aumentou nas ilhotas tratadas com BPA (Fig.8A) enquanto a expressão de *Ccnd2* (ciclina D2) não foi diferente entre os grupos (Fig.8B).

Expressão gênica cx36

A



Conteúdo proteico cx36

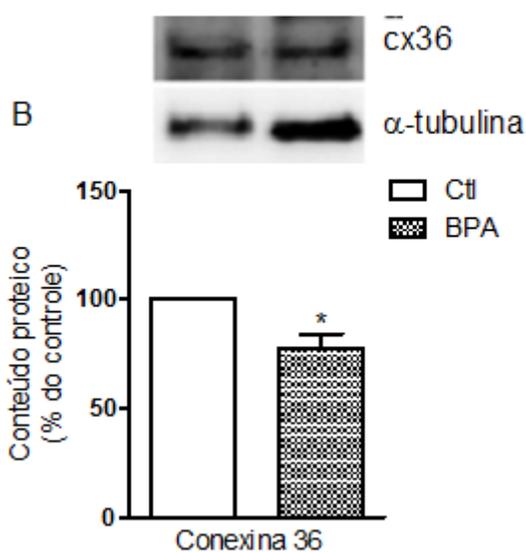
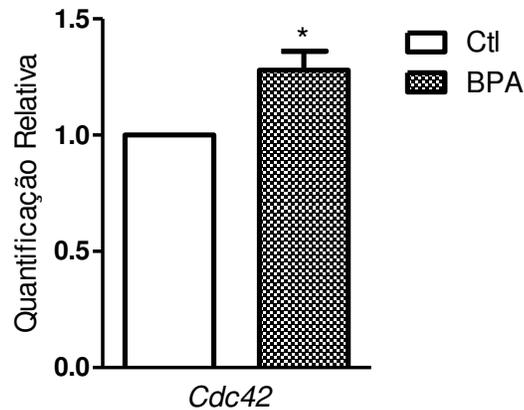


Figura 8. BPA reduz a expressão gênica e conteúdo proteico da conexina 36 de ilhotas de neonatos. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1 nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. (A) cDNA foi sintetizado com 3 μ g do RNA total e usado para a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão do gene da cx36, *Gjd2*. Os valores foram expressos relativo ao próprio controle (B) Os valores foram normalizados pela proteína α -tubulina e expressos como % do próprio Ctl. Os gráficos são a média \pm SEM. (A) n=6, (B) n=3 experimentos independentes (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n). Teste t não pareado bicaudal; *p<0,05.

Expressão gênica *Cdc42*

A



Expressão gênica *Ccnd2*

B

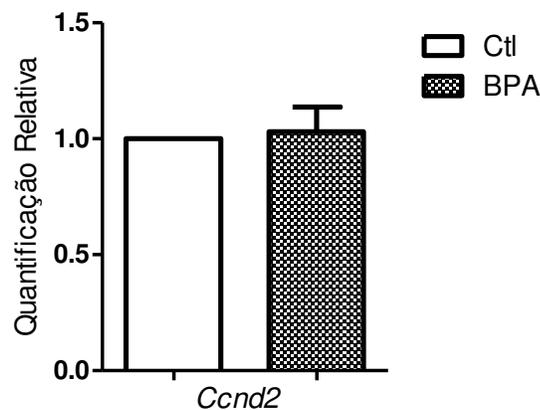
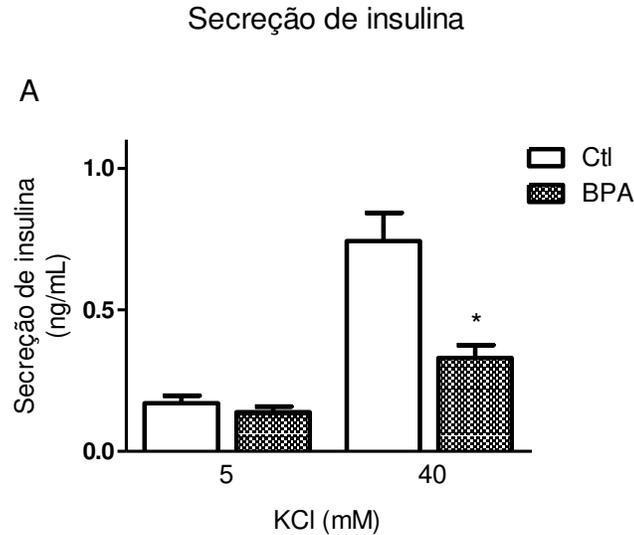


Figura 9. BPA induz aumento da expressão gênica de *Cdc42* mas não altera *Ccnd2* em ilhotas de neonatos. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de collagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1 nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. cDNA foi sintetizado com 3µg do RNA total e usado para a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão de *Cdc42* e *Ccnd2*. Os valores foram expressos relativo ao próprio controle. Os gráficos são a média \pm SEM. n=6 (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n). Teste t não pareado bicaudal; *p<0,05.

Uma etapa fundamental no processo de secreção de insulina é governada pela atividade de canais iônicos na membrana da célula beta pancreática, e que culmina com o influxo de Ca^{2+} e extrusão dos grânulos de insulina. Como observamos que a secreção de insulina das ilhotas de neonatos tratadas com BPA estava reduzida na presença de 16,7 mM de glicose, um potente agente insulínico metabolizável, decidimos observar como estava a secreção de insulina em resposta a um estímulo despolarizante independente de metabolização, alta concentração extracelular de potássio. Observamos que o tratamento com BPA também reduziu a secreção de insulina na presença de 40 mM KCl (Fig.9A).

A partir disso, investigamos a expressão dos canais de cálcio e K_{ATP} , envolvidos com a secreção de insulina. A expressão gênica de *Cacnb2* ($\text{Ca}_v\beta 2$ – subunidade regulatória intracelular do canal de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L) foi reduzida nas ilhotas tratadas quando comparadas com o Ctl (Fig. 9B). O tratamento com BPA não alterou a expressão gênica de *Cacnb3* ($\text{Ca}_v\beta 3$) e *Cacna1c* ($\text{Ca}_v 1.2$ – subunidade que forma poro do canal de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L) (Fig. 9B).



Expressão gênica canal de cálcio

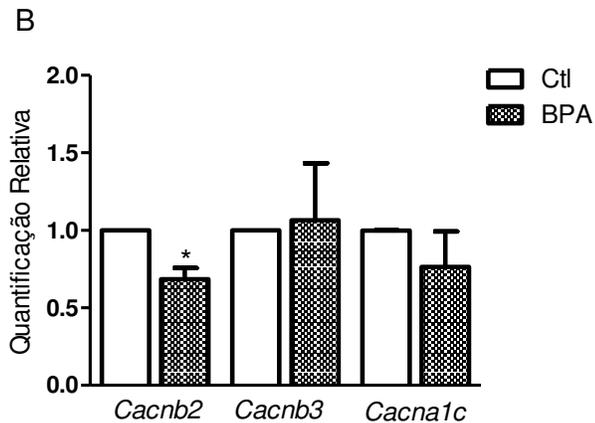
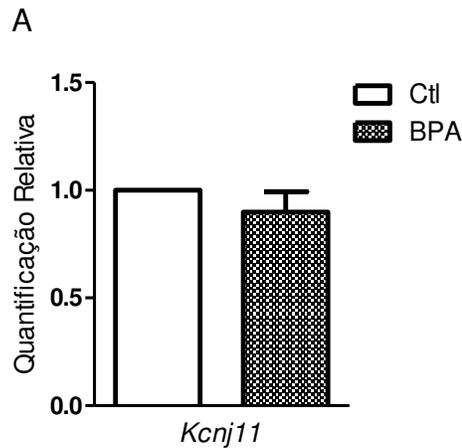


Figura 10. BPA altera secreção de insulina induzida por potássio 40 mM e a expressão gênica da subunidade 2 do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1 nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. (A) Após o período de cultura, grupos de 15 ilhotas foram pré-incubadas em solução Krebs com glicose à 2,8 mM à 37°C por 40 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por Krebs contendo 5 mM ou 40 mM de KCl na presença de 2,8 mM de glicose por 1 hora. (B) cDNA foi sintetizado com 3µg do RNA total e usado para a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão dos genes das subunidades do canal de cálcio voltagem dependente do tipo L. (B) Os valores foram expressos relativo ao próprio controle. Os gráficos representam a média ±SEM. (A) n= 6-7; (B) n=4-5 (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n, e a secreção de insulina de cada n foi realizada em triplicata) Teste t não pareado bicaudal; *p<0,05.

O BPA não alterou a expressão gênica de *Kcnj11* (Kir 6.2 – subunidade que forma o poro do canal K_{ATP}) (Fig.10A), entretanto o conteúdo proteico de kir6.2 e sur1 (subunidades regulatórias do canal de K_{ATP}) foi reduzido nas ilhotas tratadas com BPA quando comparadas ao Ctl (Fig.10B), e essa redução possivelmente contribui com o prejuízo na secreção de insulina.

Expressão gênica *Kcnj11*



Conteúdo proteico canal K_{ATP}

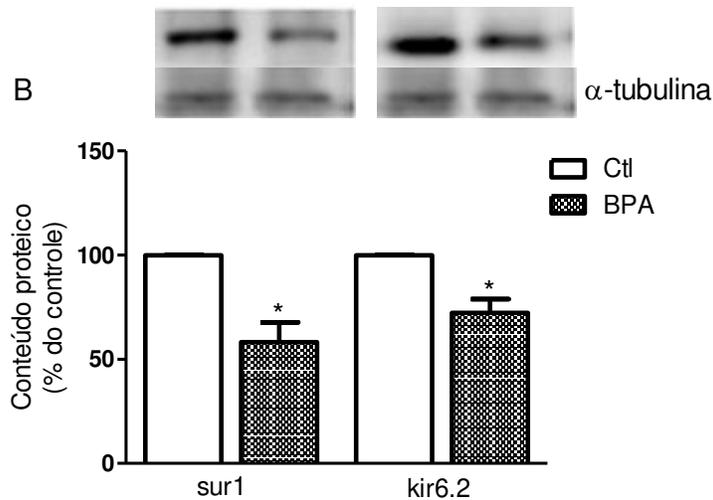
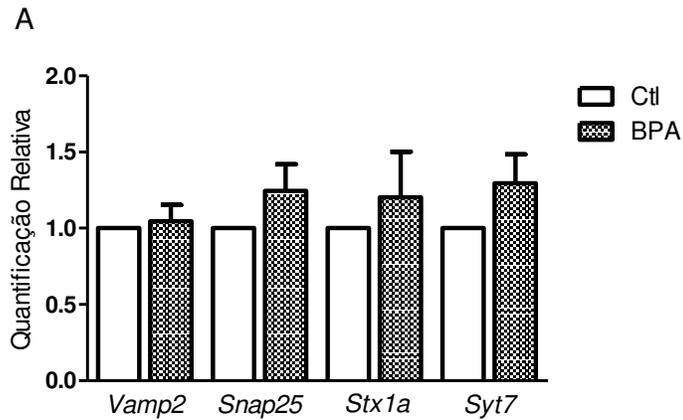


Figura 11. BPA altera o conteúdo proteico das subunidades do canal de potássio em ilhotas de neonatos tratadas *in vitro*. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. (A) cDNA foi sintetizado com 3µg do RNA total e usado para a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão de *Kcnj11*. Os valores foram expressos relativos ao próprio controle. (B) Os valores foram normalizados pela proteína α -tubulina e expressos como % do próprio Ctl. Os gráficos representam a média \pm SEM. (A) n= 7; (B) n= 3 experimentos independentes (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n). Teste t não pareado bicaudal; * $p < 0,05$.

Analizamos também proteínas envolvidas na exocitose do grânulo de insulina, haja visto a diminuição da secreção de insulina. Ao avaliarmos a expressão de genes envolvidos com a extrusão de grânulos, *Vamp2*, *Syntaxina 1A*, *Snap25* e *Syt7*, não encontramos diferença entre os grupos (Fig.11 A). Entretanto, ao observarmos o conteúdo de algumas proteínas de extrusão encontramos que o tratamento com BPA reduziu o conteúdo proteico de *vamp2* e *syntaxina1A* apesar de não alterar *snap25* e *munc18* (Fig.11 B). A redução de proteínas envolvidas com a extrusão de grânulos possivelmente contribuiu com a diminuição da secreção de insulina das ilhotas de neonatos tratadas com BPA.

Expressão de genes envolvidos
com a extrusão de grânulos



Conteúdo de proteínas envolvidas
com a extrusão de grânulos

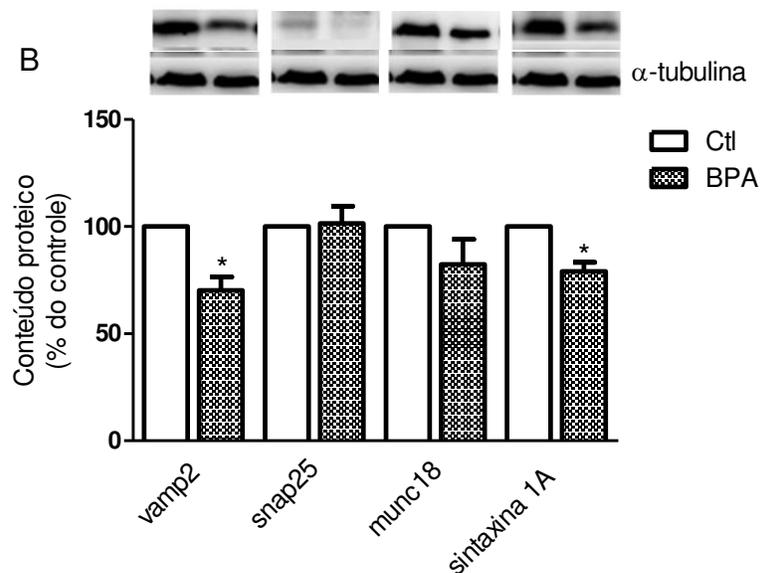


Figura 12. BPA reduz o conteúdo proteico das proteínas SNARE de ilhotas de neonatos. Ilhotas de camundongos de 4-6 dias de idade isoladas pelo método de colagenase foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem fenol vermelho e tratadas em cultura com BPA 0,1nM ou veículo (Ctl; DMSO na mesma diluição que o BPA) por 48 horas. (A) cDNA foi sintetizado com 3µg do RNA total e usado para a reação de RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão de genes envolvidos na extrusão de grânulos. Os valores foram expressos relativo ao próprio controle (B) Os valores foram normalizados pela proteína α -tubulina e expressos como % do próprio Ctl. Os gráficos representam a média \pm SEM. (A)n= 6-9; (B) n=3-4 experimentos independentes (foram utilizados 2 pâncreas para compor cada n). Teste t não pareado bicaudal; *p<0,05.

DISCUSSÃO

Alguns estudos demonstram que o ambiente intrauterino influencia na predisposição da prole ao desenvolvimento de síndrome metabólica durante a fase adulta, apresentando, por exemplo, alterações na sensibilidade à insulina ou dislipidemia (Hales e Barker, 1992; Gluckman e Hanson, 2004). Dados consistentes da literatura demonstram que a exposição ao BPA no período perinatal é crítico podendo provocar o desenvolvimento de alterações em diversos parâmetros na vida adulta da prole, como no peso corporal, sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, proliferação e morte de célula beta, além de alterações na secreção de insulina, entre outros (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; García-Arevalo *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014).

Tendo em vista as alterações que podem ser provocadas pelo BPA, decidimos investigar quais seriam os efeitos da exposição ao BPA especificamente sobre as ilhotas de animais neonatos. Primeiramente, realizamos uma curva dose resposta do BPA para encontrar o IC50 dessa substância sobre ilhotas neonatais. Encontramos o IC50 que equivale a 0,05 nM. Optamos em utilizar uma dose 2 vezes mais elevada que o IC50 encontrado, 0,1 nM, ou 0,02 ng/ml, entretanto essa concentração ainda é infra fisiológica, cerca de 100 vezes menor do que concentrações de BPA já reportadas tanto no plasma materno, 3,1 ng/ml, como no plasma fetal, 2,3 ng/ml (Schönfelder *et al.*, 2002) e no plasma de adultos, 0,18 µg/L (He *et al.*, 2009). Como queríamos observar qual o efeito do BPA em 48 horas de cultura, período bastante usado em estudos com ilhotas e BPA, não utilizamos 0,05 nM por se tratar de uma concentração muito baixa, e acreditarmos que esta dose poderia não produzir tantos efeitos nesse período de tratamento. Justamente por se tratar de uma dose tão baixa, nosso estudo é uma ferramenta que pode contribuir para que a dose considerada segura atualmente seja revista, diminuindo a quantidade de

consumo tolerável diário e, reforçando a necessidade de se buscar alternativas ao uso do BPA na manufatura de diversos produtos atualmente.

Após determinar a dose a ser utilizada, o próximo passo foi observar a função da célula beta através da secreção de insulina. Nossos dados mostram que o tratamento com BPA (0,1 nM) nas ilhotas de neonatos provocou diminuição da secreção de insulina. De forma similar, um estudo com células INS-1 expostas ao BPA (2 nM por 48h) também apresentou redução da secreção de insulina (Lin *et al.*, 2013). No estudo de Lin e colaboradores (2013), a secreção de insulina apresentou um padrão de dose resposta já caracterizado, que é em forma de U invertido onde baixas doses apresentam uma resposta significativamente diferente do controle e doses mais elevadas não apresentam efeito (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008).

Em contraste com o resultado obtido em nosso trabalho, estudos *in vitro* utilizando ilhotas de camundongos e de humanos incubadas por 1 hora com 1 nM de BPA apresentaram aumento da secreção de insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008; Soriano *et al.*, 2012), e esse efeito se deu via ER-beta visto que a utilização de ilhotas de animais *knockout* para esse receptor não apresentaram a mesma resposta frente ao BPA. Consistente com a observação anterior, camundongos machos adultos tratados com BPA (100 µg/kg/dia por 4 dias via injeção subcutânea) apresentaram aumento da secreção de insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). Ainda ilustrando o efeito do hormônio sobre seu receptor, quando ilhotas foram tratadas com 17β-estradiol *in vitro* (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2012) foi reportado aumento da secreção de insulina.

Em concordância com nosso resultado de diminuição na secreção de insulina, observou-se esse mesmo efeito em prole exposta ao BPA durante o período perinatal através do tratamento da mãe (subcutâneo – 100 µg/kg/dia) durante a gestação à partir do

dia 6 (GD – dia de gestação) até o dia 0 do nascimento (PND – dia após o nascimento); de GD6 até PND21; e de PND0 até PND21 (Liu *et al.*, 2013). Esse efeito ocorreu aos 3 meses de idade tanto em machos quanto em fêmeas, e no caso das fêmeas apenas as tratadas de GD6 à PND0. No entanto, ao 8 meses de idade a alteração na secreção de insulina desapareceu, retornando ao nível do controle (Liu *et al.*, 2013).

Um estudo recente que avaliou o efeito da exposição da prole ao BPA através do tratamento da mãe (subcutâneo - 10 µg/kg/dia) de GD9 até GD16 (García-Arevalo *et al.*, 2014) ilustra bem a interação entre a exposição ao BPA em período crítico e a incorporação de hábito alimentar inadequado, no caso o consumo de dieta hiperlipídica. Nesse estudo *in vivo* de García-Arevalo e colaboradores (2014), semelhantemente ao nosso achado foi observada diminuição na secreção de insulina em ilhotas isoladas desses animais tanto em 17 como 28 semanas de idade.

Nesse sentido, um outro estudo, *in vivo*, que avaliou a prole tratada via mãe (gavagem – 50 µg/kg/dia) de GD0 à PND21, e foi submetida após o desmame à dieta hiperlipídica, também observou diminuição da secreção de insulina nos machos (Wei *et al.*, 2011). Por outro lado, essa mesma prole, tanto fêmeas (em dieta controle e hiperlipídica) como machos (em dieta controle), apresentam aumento da secreção de insulina (Wei *et al.*, 2011). O aumento na secreção de insulina também ocorreu em prole de machos exposta ao BPA (subcutâneo -10 µg/kg/dia) de GD9 à GD16 (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010; García-Arevalo *et al.*, 2014). Ainda fêmeas da prole exposta ao BPA (subcutâneo – 100 µg/kg/dia) de GD1 à GD6 também apresentaram aumento da secreção de insulina aos 3 meses de idade (Liu *et al.*, 2013).

Também foi demonstrado que a exposição da prole ao BPA de GD6 à PND21 promoveu aumento da insulinemia tanto na puberdade (50 dias de vida) como na vida

adulta (100 dias de vida) em machos, corroborando possível aumento na secreção de insulina em decorrência dessa exposição ao BPA (Song *et al.*, 2014).

Assim, podemos dizer, baseados nos estudos *in vivo*, que a exposição ao BPA durante fases críticas do desenvolvimento leva a efeitos que são dependentes do período da vida, via de administração, dose e tempo de exposição, haja visto dados da literatura que demonstram tanto diminuição como aumento da secreção de insulina das proles expostas ao BPA.

Tendo em vista as alterações na secreção de insulina observadas em nossos resultados, investigamos parâmetros funcionais e moleculares que pudessem evidenciar possíveis mecanismos responsáveis por essa resposta das ilhotas de neonatos ao BPA. Assim, investigamos a expressão de genes relacionados à maturação de células beta, à comunicação célula-célula ou à proliferação celular, bem como o conteúdo de insulina, e a expressão gênica e conteúdo de proteínas envolvidas com os canais de cálcio e K_{ATP} , e com a extrusão de grânulos de insulina.

A maturação das células beta termina durante os primeiros dias neonatais e este processo é fundamental para que essas células executem adequadamente sua função (Asplund, 1973; Hole, Pian-Smith e Sharp, 1988; Otonkoski *et al.*, 1988). Avaliamos a expressão gênica de *Pdx-1*, *Nkx6.1*, *Mafa*, *Hnf4a*, *Slc2a2* e não observamos diferença entre os grupos. Um estudo *in vitro* observou que doses mais elevadas de BPA (200 nM e 2 mM) promoveram diminuição da expressão gênica de *Slc2a2* em células INS-1 (Lin *et al.*, 2013). Ainda, *in vivo* foi demonstrado que ilhotas da prole exposta ao BPA de GD0 à PND21 apresentaram, após 28 semanas de idade, redução na expressão gênica de *Pdx1*, *Nkx6.1* e *Slc2a2*, contribuindo muito provavelmente com a diminuição do número de grânulos de insulina cheios e aumento no número de grânulos vazios nas ilhotas desses

animais (Wei *et al.*, 2011). A partir de nossos achados, podemos concluir que a alteração da secreção de insulina em nosso modelo não foi decorrente de alterações na maturação de célula beta.

Ao avaliarmos os genes da insulina (*Ins1* e *Ins2*), que também são marcadores de maturação, não encontramos alteração em sua expressão. Já foi reportado que células INS-1 tratadas com uma dose de BPA mais elevada que a utilizada em nosso estudo apresentaram redução da expressão gênica e do conteúdo proteico de insulina (Lin *et al.*, 2013). Por outro lado, um estudo onde ilhotas de animais adultos foram tratadas com estradiol em cultura, observou-se aumento na expressão gênica da insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008).

Corroborando com a expressão gênica da insulina, quando avaliamos o conteúdo total de insulina também não encontramos alteração. Assim verificamos que a diminuição da secreção de insulina também não estava associada à alteração na sua biossíntese, em nosso modelo. Por outro lado, estudos que trataram animais (100µg/kg de BPA por 4 dias), bem como ilhotas de animais adultos, em cultura com 1nM de BPA mostraram aumento do conteúdo total de insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006) através do aumento de sua biossíntese, via ER alfa (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). Ainda, a prole exposta ao BPA de GD9 à GD16 também apresentou aumento no conteúdo total de insulina (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010).

Avaliamos também se o BPA estaria promovendo alguma alteração na cx36, que está relacionada tanto ao processo de maturação de célula beta bem como na comunicação célula-célula, já que esse efeito do BPA foi reportado anteriormente em outras linhagens celulares (Lee e Rhee, 2007). A cx36 é importante para o desempenho da função da célula beta pois é a principal proteína que permite a comunicação entre as células da

ilhota, possibilitando que a mesma funcione como um sincício frente a um estímulo para a secreção de insulina. Em nosso estudo observamos que o BPA promoveu diminuição tanto da expressão gênica como conteúdo proteico de cx36. De forma similar a nosso achado, estudos *in vitro* demonstraram que a exposição ao BPA reduziu a atividade ou expressão de conexina em células mamárias de ratas (Lee e Rhee, 2007), em células do testículo de ratos (Salian, Doshi e Vanage, 2009; Li *et al.*, 2010; Pointis *et al.*, 2011) e células endoteliais de vasos sanguíneos (Andersson e Brittebo, 2012). Essa alteração na cx36 é uma evidência que pode explicar, em parte, o prejuízo reportado aqui, na secreção de insulina.

Em seguida, investigamos a possibilidade do BPA alterar a proliferação celular através da avaliação da ciclina D2 (gene *Ccnd2*), e não encontramos diferença na sua expressão gênica, embora um estudo onde a prole exposta ao BPA via tratamento da mãe de GD6 à PND0, GD6 à PND21 e PND0 à PND21 mostrou que, aos 3 meses de idade, os animais apresentavam diminuição de ciclina D1, proliferação celular, apoptose, e caspase 3 clivada (Liu *et al.*, 2013). Contrário aos achados de Liu e colaboradores (2013), células INS-1 tratadas com BPA (que tiveram a secreção de insulina reduzida) apresentaram diminuição da viabilidade celular, acompanhada do aumento de apoptose (avaliada através de anexina), aumento de proteína pró apoptótica Bax, caspase 9 e caspase 3 clivada e aumento da liberação de citocromo c (Lin *et al.*, 2013). Não avaliamos um parâmetro específico de viabilidade celular ou apoptose, entretanto, baseado nos dados da literatura, podemos especular que esses processos podem estar alterados em nosso modelo.

Detectamos aumento na expressão de *Cdc42*, que está envolvida tanto no ciclo celular quanto na extrusão de grânulos de insulina e rearranjo do citoesqueleto (Hong-Geller e

Cerione, 2000; Nevins e Thurmond, 2003; 2005). Resposta semelhante já foi reportada em neurônios do hipocampo tratados com BPA por 24h, onde foi observado aumento de Rac1/Cdc42 e diminuição de RhoA (Xu *et al.*, 2014). Entretanto acreditamos que esse aumento não esteja relacionado a proliferação celular, mas seja um mecanismo compensatório às alterações discutidas mais à frente.

Como a secreção de insulina está relacionada a atividade tanto do canal K_{ATP} como do VDCC, avaliamos se o prejuízo da secreção de insulina estava associado a alterações nesses canais, visto que não encontramos alteração na expressão gênica de *Slc2a2*, nem no conteúdo proteico de proteínas envolvidas na metabolização da glicose como fosfofrutoquinase, ATPCI, piruvato desidrogenase e piruvato carboxilase (dados não mostrados), observado em ilhotas de neonatos tratadas com 1 nM de BPA.

Observamos que a secreção de insulina frente a um agente não metabolizável, alta concentração extracelular de KCl, estava diminuída, indicando que poderia haver alguma alteração dos canais envolvidos com o processo secretório. Encontramos que a exposição ao BPA promoveu diminuição na expressão gênica da subunidade beta 2 do canal de cálcio, cuja atividade depende de alterações no potencial de membrana (Braun *et al.*, 2008). E ao avaliar o conteúdo proteico das subunidades kir6.2 e sur1 do canal K_{ATP} , cuja atividade é controlada pela razão ATP/ADP e contribui para a abertura dos canais VDCC, encontramos que este estava diminuído (Tarasov, Dusonchet e Ashcroft, 2004). Um estudo *in vivo* já demonstrou que o BPA promove diminuição da atividade do canal K_{ATP} (em ilhotas de animais adultos) (Soriano *et al.*, 2012), sugerindo que a diminuição da atividade do canal pode ser decorrente da menor expressão destas subunidades.

Em adição, células INS-1 quando tratadas com BPA apresentaram diminuição da expressão gênica das subunidades do canal K_{ATP} (Lin *et al.*, 2013). Além disso, alguns

estudos com diferentes tipos de linhagem celular e BPA também demonstram a inibição ou diminuição da atividade de alguns tipos de canais de cálcio (Derouiche *et al.*, 2013; Deutschmann *et al.*, 2013) bem como inibição dos canais de potássio (Posnack *et al.*, 2014).

Assim, de acordo com estas evidências, podemos atribuir parcialmente as alterações dos canais de cálcio e potássio pela diminuição da secreção de insulina das ilhotas de neonatos tratadas com BPA.

Ainda investigamos possíveis efeitos do BPA em proteínas que atuam na extrusão de grânulos de insulina. Corroborando com a diminuição da secreção de insulina observada, nossos dados evidenciam diminuição do conteúdo proteico de vamp2 e syntaxina 1A após exposição ao BPA. Já foi demonstrado que o BPA reduz a expressão de marcadores sinápticos, como sinaptofisina e espinofilina, relacionados ao processo de extrusão das vesículas sinápticas em células do hipocampo de animais expostos ao BPA, através do tratamento da mãe durante a gestação com 0,5, 5 e 50 mg/kg/dia (Wang *et al.*, 2014).

Sabe-se que o BPA age sobre os ERs e possui efeito semelhante ao estrógeno sobre esse receptor, já que a exposição *in vitro* ao estradiol alterou a expressão gênica e conteúdo proteico de snap25 e munc18 em células gonadotróficas (Weiss *et al.*, 2007). *In vivo*, a administração de estradiol, a longo prazo, promoveu também a diminuição de Snap25, sinaptobrevina, sinaptotagmina I, syntaxina 1, Rab3a e celubrevina em células da glândula pituitária de ratas (Majó *et al.*, 1999).

A cdc42 é uma proteína que está relacionada ao controle da maquinaria secretória, rearranjo do citoesqueleto através do remodelamento da actina e conseqüentemente mobilização dos grânulos de insulina, possuindo papel importante no processo de secreção juntamente com outras pequenas GTPases (Wang, Oh e Thurmond, 2007)

(Leblanc *et al.*, 2011) (Nevins e Thurmond, 2003; 2005). A partir disso, o aumento da expressão de *Cdc42* observado nas ilhotas tratadas com BPA poderia ser justificado pela tentativa de reestabelecer a maquinaria secretória adequada devido à redução de *vamp2* e *syntaxina 1A*.

Possivelmente, o BPA promoveu alteração na maquinaria secretória das ilhotas de neonatos tratadas, o que possivelmente contribuiu também com o prejuízo na secreção de insulina.

Tendo em vista dados da literatura e os obtidos em nosso trabalho, as alterações induzidas pelo BPA sobre a função das células beta pancreáticas são complexas e seus efeitos podem ser opostos ao longo da vida. Essa resposta parece ser dependente do tempo e período da vida onde ocorreu a exposição, dose e via de exposição ao BPA.

Em nosso estudo utilizamos uma faixa etária ainda não explorada para avaliar os efeitos do BPA, onde foi caracterizada sua ação sobre as ilhotas no período neonatal, e possíveis mecanismos funcionais e moleculares envolvidos nesse processo, apresentando uma nova abordagem ao avaliar alguns parâmetros, comunicação célula-célula e extrusão de grânulos, antes não observados em outros estudos com ilhotas pancreáticas.

CONCLUSÕES

Após o tratamento de ilhotas de neonatos com 0,1 nM de BPA em cultura por 48h, nós observamos que o BPA promoveu:

- Redução de aproximadamente 60% na secreção de insulina tanto frente a glicose (16,7 mM) como ao KCl (40 mM);
- Alteração dos canais iônicos relacionados com a secreção de insulina, sendo que houve redução de aproximadamente 30% na expressão gênica da subunidade do canal de cálcio (*Cacnb2*), e redução de aproximadamente 40% no conteúdo proteico de *sur1* e 30% de *kir6.2*;
- Alteração na maquinaria de extrusão de insulina observado através de redução de 30% no conteúdo proteico de *vamp2* e 20% de *syntaxina 1A*.
- Um possível prejuízo na comunicação célula-célula, devido redução de 25% na expressão gênica e 20% no conteúdo proteico de *cx36*;

Podemos concluir que o tratamento com BPA, na dose e tempo utilizados, promoveu um conjunto de alterações nos mecanismos moleculares envolvidos no processo de secreção de insulina de ilhotas neonatais em cultura, resultando na diminuição da resposta secretória.

Nossos achados indicam que a exposição ao BPA deve prejudicar o processo de maturação da ilhota em camundongos neonatais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA – American Diabetes Association, 2014. Disponível em: < <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/?loc=db-slabnav> >.

AL-QUOBAILI, F.; MONTENARH, M. Pancreatic duodenal homeobox factor-1 and diabetes mellitus type 2 (review). **Int J Mol Med**, v. 21, n. 4, p. 399-404, Apr 2008. ISSN 1107-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360684> >.

ALONSO-MAGDALENA, P. et al. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 1, p. 106-12, Jan 2006. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393666> >.

_____. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e2069, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446233> >.

_____. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 9, p. 1243-50, Sep 2010. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488778> >.

ANDERSSON, H.; BRITTEBO, E. Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells. **Arch Toxicol**, v. 86, n. 3, p. 465-74, Mar 2012. ISSN 1432-0738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045264> >.

ASPLUND, K. Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas. **Eur J Clin Invest**, v. 3, n. 4, p. 338-44, Jul 1973. ISSN 0014-2972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4760055> >.

BALAKRISHNAN, B. et al. Transfer of bisphenol A across the human placenta. **Am J Obstet Gynecol**, v. 202, n. 4, p. 393.e1-7, Apr 2010. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350650> >.

BARG, S. et al. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. **Diabetes**, v. 51 Suppl 1, p. S74-82, Feb 2002. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815462> >.

BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 425-31, Sep 2006. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890492> >.

BARROS, R. P. et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1605-8, Jan 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423895> >.

BATISTA, T. M. et al. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33814, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22470480> >.

BAVAMIAN, S. et al. Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion. **Diabetes Obes Metab**, v. 9 Suppl 2, p. 118-32, Nov 2007. ISSN 1462-8902. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919186> >.

BEGG, D. P.; WOODS, S. C. Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. **Adv Physiol Educ**, v. 37, n. 1, p. 53-60, Mar 2013. ISSN 1522-1229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471249> >.

BLUM, B. et al. Functional beta-cell maturation is marked by an increased glucose threshold and by expression of urocortin 3. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 3, p. 261-4, Mar 2012. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22371083> >.

BOSCO, D. et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. **Diabetes**, v. 59, n. 5, p. 1202-10, May 2010. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20185817> >.

BRAUN, M. et al. Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1618-28, Jun 2008. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390794> >.

BRELJE, T. C.; SCHARP, D. W.; SORENSON, R. L. Three-dimensional imaging of intact isolated islets of Langerhans with confocal microscopy. **Diabetes**, v. 38, n. 6, p. 808-14, Jun 1989. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2656348> >.

BRISSOVA, M. et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 9, p. 1087-97, Sep 2005. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923354> >.

BRYZGALOVA, G. et al. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. **Diabetologia**, v. 49, n. 3, p. 588-97, Mar 2006. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463047> >.

CALAFAT, A. M. et al. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 4, p. 639-44, Apr 2009. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440505> >.

CARVALHO, C. P. et al. Beta cell coupling and connexin expression change during the functional maturation of rat pancreatic islets. **Diabetologia**, v. 53, n. 7, p. 1428-37, Jul 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20361177> >.

_____. Impaired β -cell- β -cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 1, p. E144-51, Jul 2012. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569071> >.

CHARPANTIER, E.; CANCELA, J.; MEDA, P. Beta cells preferentially exchange cationic molecules via connexin 36 gap junction channels. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2332-41, Nov 2007. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828386> >.

COLLARES-BUZATO, C. B. et al. Co-culture of two MDCK strains with distinct junctional protein expression: a model for intercellular junction rearrangement and cell sorting. **Cell Tissue Res**, v. 291, n. 2, p. 267-76, Feb 1998. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426313> >.

DEROUICHE, S. et al. Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signalling. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 54, Dec 2013. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450760> >.

DEUTSCHMANN, A. et al. Bisphenol A inhibits voltage-activated Ca(2+) channels in vitro: mechanisms and structural requirements. **Mol Pharmacol**, v. 83, n. 2, p. 501-11, Feb 2013. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197648> >.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr Rev**, v. 30, n. 4, p. 293-342, Jun 2009. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502515> >.

DIMITRIADIS, G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 93 Suppl 1, p. S52-9, Aug 2011. ISSN 1872-8227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864752> >.

DOYLE, M. J.; SUSSEL, L. Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1999-2007, Aug 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456846> >.

DULUBOVA, I. et al. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 8, p. 2697-702, Feb 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301226> >.

DUTY, S. M. et al. Potential sources of bisphenol A in the neonatal intensive care unit. **Pediatrics**, v. 131, n. 3, p. 483-9, Mar 2013. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420909> >.

EFSA - European Food Safety Authority, 2013. Disponível em: < <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130725.htm> >

EFSA - European Food Safety Authority, 2015. Disponível em: < <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3978.htm> >

FLOYD, J. C. et al. Stimulation of insulin secretion by amino acids. **J Clin Invest**, v. 45, n. 9, p. 1487-502, Sep 1966. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5919350> >.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Curr Diabetes Rev**, v. 9, n. 1, p. 25-53, Jan 2013. ISSN 1875-6417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974359> >.

GALLAGHER, C. J. et al. Association of the estrogen receptor-alpha gene with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2135-41, Aug 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513703> >.

GARCÍA-AREVALO, M. et al. Exposure to Bisphenol-A during Pregnancy Partially Mimics the Effects of a High-Fat Diet Altering Glucose Homeostasis and Gene Expression in Adult Male Mice. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100214, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959901> >.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab**, v. 15, n. 4, p. 183-7, 2004 May-Jun 2004. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109618> >.

GRADWOHL, G. et al. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 4, p. 1607-11, Feb 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677506> >.

GUO, L. et al. PDX1 in ducts is not required for postnatal formation of β -cells but is necessary for their subsequent maturation. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3459-68, Oct 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775765> >.

HALBAN, P. A. et al. The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. **Endocrinology**, v. 111, n. 1, p. 86-94, Jul 1982. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6123433> >.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644236> >.

HE, Y. et al. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. **Environ Res**, v. 109, n. 5, p. 629-33, Jul 2009. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426969> >.

HEAD, W. S. et al. Connexin-36 gap junctions regulate in vivo first- and second-phase insulin secretion dynamics and glucose tolerance in the conscious mouse. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1700-7, Jul 2012. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22511206> >.

HENQUIN, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 739-51, May 2009. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288076> >.

HOLDER, J. W.; ELMORE, E.; BARRETT, J. C. Gap junction function and cancer. **Cancer Res**, v. 53, n. 15, p. 3475-85, Aug 1993. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393376> >.

HOLE, R. L.; PIAN-SMITH, M. C.; SHARP, G. W. Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. **Am J Physiol**, v. 254, n. 2 Pt 1, p. E167-74,

Feb 1988. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2894770> >.

HONG-GELLER, E.; CERIONE, R. A. Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. **J Cell Biol**, v. 148, n. 3, p. 481-94, Feb 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662774> >.

HUANG, M.; JOSEPH, J. W. Assessment of the metabolic pathways associated with glucose-stimulated biphasic insulin secretion. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1653-66, May 2014. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564396> >.

IEZZI, M. et al. Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells. **Mol Endocrinol**, v. 13, n. 2, p. 202-12, Feb 1999. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973251> >.

IKEZUKI, Y. et al. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. **Hum Reprod**, v. 17, n. 11, p. 2839-41, Nov 2002. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407035> >.

ITOH, Y. et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 173-6, Mar 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629551> >.

JITRAPAKDEE, S. et al. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. **Diabetologia**, v. 53, n. 6, p. 1019-32, Jun 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225132> >.

KALWAT, M. A.; THURMOND, D. C. Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet β cells. **Exp Mol Med**, v. 45, p. e37, 2013. ISSN 2092-6413. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969997> >.

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. L. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. **Diabetes Care**, v. 2, n. 2, p. 120-6, 1979 Mar-Apr 1979. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/520114> >.

KLIP, A. et al. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 306, n. 10, p. C879-86, May 2014. ISSN 1522-1563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24598362> >.

KUBOTA, T. et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. **Cell Metab**, v. 13, n. 3, p. 294-307, Mar 2011. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356519> >.

KUSSMAN, M. J.; GOLDSTEIN, H.; GLEASON, R. E. The clinical course of diabetic nephropathy. **JAMA**, v. 236, n. 16, p. 1861-3, Oct 1976. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/989537> >.

LAM, P. P. et al. Munc18b is a major mediator of insulin exocytosis in rat pancreatic β -cells. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2416-28, Jul 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423569> >.

LARSSON, L. I. et al. Localization of APP, a postulated new hormone, to a pancreatic endocrine cell type. **Histochemistry**, v. 42, n. 4, p. 377-82, 1974. ISSN 0301-5564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4615088> >.

LEBLANC, J. et al. The small GTPase Cdc42 promotes membrane protrusion during polar body emission via ARP2-nucleated actin polymerization. **Mol Hum Reprod**, v. 17, n. 5, p. 305-16, May 2011. ISSN 1460-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21511720> >.

LEE, I. K.; RHEE, S. K. Inhibitory effect of bisphenol A on gap junctional intercellular communication in an epithelial cell line of rat mammary tissue. **Arch Pharm Res**, v. 30, n. 3, p. 337-43, Mar 2007. ISSN 0253-6269. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17424940> >.

LEE, J. C. et al. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 928-36, May 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334435> >.

LEITE, A. R. et al. Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 83, n. 2, p. 142-51, Feb 2005. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15791287> >.

LI, M. W. et al. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 42,

p. 17998-8003, Oct 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921394> >.

LIN, Y. et al. Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e460, 2013. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328667> >.

LIU, J. et al. Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64143, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675523> >.

MAJÓ, G. et al. Exocytotic protein components in rat pituitary gland after long-term estrogen administration. **J Endocrinol**, v. 161, n. 2, p. 323-31, May 1999. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10320831> >.

MARMUGI, A. et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 395-407, Feb 2012. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932408> >.

MATSUOKA, T. A. et al. MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. **Mol Endocrinol**, v. 21, n. 11, p. 2764-74, Nov 2007. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17636040> >.

MEDA, P. et al. The topography of electrical synchrony among beta-cells in the mouse islet of Langerhans. **Q J Exp Physiol**, v. 69, n. 4, p. 719-35, Oct 1984. ISSN 0144-8757. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6440208> >.

MEIER, J. J.; BONADONNA, R. C. Role of reduced β -cell mass versus impaired β -cell function in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 36 Suppl 2, p. S113-9, Aug 2013. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23882035> >.

MELZER, D. et al. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8673, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084273> >.

MENDONCA, K. et al. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 87, n. 1, p. 13-20, Jan 2014. ISSN 1432-1246. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212895> >.

NADAL, A. Obesity: Fat from plastics? Linking bisphenol A exposure and obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 1, p. 9-10, Jan 2013. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147575> >.

NATHAN, D. M. Long-term complications of diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 328, n. 23, p. 1676-85, Jun 1993. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8487827> >.

NEEL, B. A.; SARGIS, R. M. The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1838-48, Jul 2011. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709279> >.

NEVINS, A. K.; THURMOND, D. C. Glucose regulates the cortical actin network through modulation of Cdc42 cycling to stimulate insulin secretion. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 285, n. 3, p. C698-710, Sep 2003. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12760905> >.

_____. A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis. **J Biol Chem**, v. 280, n. 3, p. 1944-52, Jan 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537656> >.

NING, G. et al. Relationship of urinary bisphenol A concentration to risk for prevalent type 2 diabetes in Chinese adults: a cross-sectional analysis. **Ann Intern Med**, v. 155, n. 6, p. 368-74, Sep 2011. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930854> >.

NISHIKAWA, M. et al. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 9, p. 1196-203, Sep 2010. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382578> >.

NLEND, R. N. et al. Connexin36 and pancreatic beta-cell functions. **Arch Physiol Biochem**, v. 112, n. 2, p. 74-81, Apr 2006. ISSN 1381-3455. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931449> >.

ODOM, D. T. et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1378-81, Feb 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988562> >.

OLIVER-KRASINSKI, J. M. et al. The diabetes gene Pdx1 regulates the transcriptional network of pancreatic endocrine progenitor cells in mice. **J Clin Invest**, v. 119, n. 7, p. 1888-98, Jul 2009. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487809> >.

ORCI, L.; UNGER, R. H. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. **Lancet**, v. 2, n. 7947, p. 1243-4, Dec 1975. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/53729> >.

OTONKOSKI, T. et al. Maturation of insulin response to glucose during human fetal and neonatal development. Studies with perfusion of pancreatic isletlike cell clusters. **Diabetes**, v. 37, n. 3, p. 286-91, Mar 1988. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3286329> >.

PALMBERG, P. et al. The natural history of retinopathy in insulin-dependent juvenile-onset diabetes. **Ophthalmology**, v. 88, n. 7, p. 613-8, Jul 1981. ISSN 0161-6420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7267029> >.

PATTERSON, J. N. et al. Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. **J Biol Chem**, v. 289, n. 19, p. 13335-46, May 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675076> >.

PERREAULT, L. et al. Bisphenol A impairs hepatic glucose sensing in C57BL/6 male mice. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69991, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922885> >.

POINTIS, G. et al. Testicular connexin 43, a precocious molecular target for the effect of environmental toxicants on male fertility. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 4, p. 303-317, 10 2011. ISSN 2156-5554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332114> >.

POSNACK, N. G. et al. Bisphenol A exposure and cardiac electrical conduction in excised rat hearts. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 4, p. 384-90, Apr 2014. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487307> >.

PRENTKI, M.; MATSCHINSKY, F. M.; MADIRAJU, S. R. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. **Cell Metab**, v. 18, n. 2, p. 162-85, Aug 2013. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791483> >.

PROKS, P. et al. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. **Diabetes**, v. 51 Suppl 3, p. S368-76, Dec 2002. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475777> >.

QUESADA, I. et al. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. **J Endocrinol**, v. 199, n. 1, p. 5-19, Oct 2008. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669612> >.

ROPERO, A. B. et al. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 874-9, Oct 2008. ISSN 0039-128X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249429> >.

RORSMAN, P. et al. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. **News Physiol Sci**, v. 15, p. 72-77, Apr 2000. ISSN 0886-1714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390882> >.

RORSMAN, P.; RENSTRÖM, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 46, n. 8, p. 1029-45, Aug 2003. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12879249> >.

SALIAN, S.; DOSHI, T.; VANAGE, G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. **Toxicology**, v. 265, n. 1-2, p. 56-67, Nov 2009. ISSN 1879-3185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782717> >.

SANDER, M. et al. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. **Development**, v. 127, n. 24, p. 5533-40, Dec 2000. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076772> >.

SCHÖNFELDER, G. et al. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. **Environ Health Perspect**, v. 110, n. 11, p. A703-7, Nov 2002. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417499> >.

SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, v. 21, n. 5, p. 470-5, Nov 1981. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7028561> >.

SEGHERS, V. et al. Sur1 knockout mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. **J Biol Chem**, v. 275, n. 13, p. 9270-7, Mar 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734066> >.

SERRE-BEINIER, V. et al. Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 3, p. 428-39, Feb 2009. ISSN 1460-2083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19000992> >.

SHANKAR, A.; TEPPALA, S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 12, p. 3822-6, Dec 2011. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956417> >.

SHANKAR, A.; TEPPALA, S.; SABANAYAGAM, C. Bisphenol A and peripheral arterial disease: results from the NHANES. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 9, p. 1297-300, Sep 2012. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22645278> >.

SHARMA, G.; PROSSNITZ, E. R. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3030-9, Aug 2011. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673097> >.

SHEN, J. et al. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 183-95, Jan 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218264> >.

SILVER, M. K. et al. Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: data from NHANES 2003-2008. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26868, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22046388> >.

SLACK, J. M. Developmental biology of the pancreas. **Development**, v. 121, n. 6, p. 1569-80, Jun 1995. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600975> >.

SOMM, E. et al. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 10, p. 1549-55, Oct 2009. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20019905> >.

SONG, L. et al. Low-level phenolic estrogen pollutants impair islet morphology and β -cell function in isolated rat islets. **J Endocrinol**, v. 215, n. 2, p. 303-11, Nov 2012. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946080> >.

SONG, S. et al. Perinatal BPA exposure induces hyperglycemia, oxidative stress and decreased adiponectin production in later life of male rat offspring. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 4, p. 3728-42, Apr 2014. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705360> >.

SORIANO, S. et al. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor β . **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31109, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347437> >.

STRAUB, S. G.; SHARP, G. W. Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 3, p. C565-71, Sep 2004. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308461> >.

TALCHAI, C. et al. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1223-34, Sep 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980982> >.

TARASOV, A.; DUSONCHET, J.; ASHCROFT, F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S113-22, Dec 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561898> >.

TAYLOR, B. L.; LIU, F. F.; SANDER, M. Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. **Cell Rep**, v. 4, n. 6, p. 1262-75, Sep 2013. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24035389> >.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 2, p. E141-5, Feb 2010. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009031> >.

THORENS, B. et al. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. **Cell**, v. 55, n. 2, p. 281-90, Oct 1988. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3048704> >.

UNGER, R. H.; ORCI, L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, n. 7897, p. 14-6, Jan 1975. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/46337> >.

WANG, C. et al. Changes in memory and synaptic plasticity induced in male rats after maternal exposure to bisphenol A. **Toxicology**, May 2014. ISSN 1879-3185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24820113> >.

WANG, Z.; OH, E.; THURMOND, D. C. Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. **J Biol Chem**, v. 282, n. 13, p. 9536-46, Mar 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289663> >.

WEI, J. et al. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3049-61, Aug 2011. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21586551> >.

WEISS, J. M. et al. Estradiol differentially modulates the exocytotic proteins SNAP-25 and munc-18 in pituitary gonadotrophs. **J Mol Endocrinol**, v. 38, n. 1-2, p. 305-14, Feb 2007. ISSN 0952-5041. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293448> >.

WIEDERKEHR, A.; WOLLHEIM, C. B. Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic β -cell. **Mol Cell Endocrinol**, v. 353, n. 1-2, p. 128-37, Apr 2012. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784130> >.

WHO, World Health Organization, 2015. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> >

XU, X. et al. Bisphenol A promotes dendritic morphogenesis of hippocampal neurons through estrogen receptor-mediated ERK1/2 signal pathway. **Chemosphere**, v. 96, p. 129-37, Feb 2014. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24231043> >.

YE, X. et al. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 831, n. 1-2, p. 110-5, Feb 2006. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377264> >.

ZALKO, D. et al. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 424-30, Jan 2011. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030062> >.

ZHANG, C. et al. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 12, p. 4969-76, Jun 2005. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923615> >.

ZOELLER, R. T. et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097-110, Sep 2012. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733974> >.

ANEXOS



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Ação do Bisfenol A sobre ilhotas pancreáticas de neonatos de camundongos C57BL/6" (protocolo nº 3133-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / Luciana Mateus Gonçalves, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 29 de agosto de 2013.

Campinas, 29 de agosto de 2013.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada " Ação do bisfenol A sobre ilhotas de neonatos de camundongos" :

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 3133-1 , Instituição: UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Luciana Mateus Gonçalves

Aluno: Luciana Mateus Gonçalves

Everardo Magalhães Carneiro

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura