



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Efeitos da Exposição ao Bisfenol A na Função Testicular e Reprodutiva

Joaquim António Cabral Nunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Eduardo Cavaco

Covilhã, Maio de 2014

Dedicatória

Aos meus pais.

Ao meu irmão.

Agradecimentos

Agradeço principalmente ao orientador deste trabalho, o Professor Doutor José Eduardo Cavaco, pela forma como o orientou, pela sua disponibilidade, pela revisão deste trabalho e pelo ânimo e motivação que me inculuiu diversas vezes, quando mais precisava.

Não posso deixar de mencionar os meus colegas e amigos, pelo apoio indirecto na elaboração deste trabalho e por sempre me ouvirem falar acerca dele.

Por fim agradeço à minha família, pelo seu apoio todo este tempo e também pela paciência.

Resumo

A infertilidade é uma condição que actualmente afecta 15% dos casais em todo o mundo, com tendência para aumentar, sendo que cerca de 50% dos casos são atribuídos ao parceiro masculino.

Como é sabido, a espermatogénese é extremamente influenciada por estímulos externos, e a incidência crescente de distúrbios reprodutivos aumentou a preocupação em torno dos disruptores endócrinos (EDs). A exposição a estes químicos pode causar disfunções ou anormalidades dos órgãos reprodutivos, conduzindo à infertilidade. Um dos EDs, conhecido por ser ubíquo no meio ambiente é o bisfenol A (BPA). Este é um dos químicos mais produzidos a nível mundial (produção anual superior a 3 milhões de toneladas), sendo utilizado em larga escala na produção de plásticos de policarbonato e resinas. Encontra-se em biberões, garrafas de água, revestimentos de recipientes alimentares, selantes dentários, entre outras aplicações. Como resultado, há uma exposição generalizada da população ao BPA.

O presente trabalho teve como objectivo realizar uma revisão sistemática da literatura sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos efeitos do BPA na estrutura e função testicular.

As principais conclusões encontradas foram que a exposição ao BPA induz stress oxidativo e apoptose excessiva, tem efeitos transgeracionais, e efeitos mutagénicos nas células germinativas masculinas, diminui a síntese de androgénios, pode actuar como agonista estrogénico, interfere com o eixo hipotalâmico-pituitária-gonadal, e induz perturbações nas proteínas de junção das células de Sertoli, pondo em risco a fertilidade masculina.

Os estudos em humanos mostraram que a exposição ao BPA estava associada a alterações dos níveis hormonais nos homens, diminuição da qualidade do esperma, e aumento da lesão do ácido desoxirribonucleico do esperma. Foi também demonstrado que a exposição ao BPA no local de trabalho eleva o risco de disfunção sexual masculina, que se traduz por uma redução da libido, dificuldade na erecção e na ejaculação, e reduzida satisfação com a vida sexual. No entanto, são necessários mais estudos para obtenção de dados mais consistentes, revelando assim, a real influência da exposição ao BPA na fertilidade masculina.

Tendo em conta o exposto neste trabalho, é aconselhável a tomada de medidas, que visem a substituição do BPA por componentes inócuos para a saúde humana, assim como a restrição da sua utilização com regras bem definidas sobre os níveis de exposição.

Palavras-chave

Bisfenol A, Função testicular, Infertilidade, Espermatogénese, Esperma.

Abstract

Infertility is a condition that currently affects 15% of couples worldwide, with tendency to increase, and approximately 50% of the cases are attributed to the male partner.

As it is known, the spermatogenesis is extremely influenced by external stimuli, and the increasing incidence of reproductive disorders has raised concern about the role of endocrine disruptors (EDs). The exposure to these chemicals can cause dysfunctions or abnormalities of the reproductive organs, leading to infertility. One of the EDs, known to be ubiquitous in the environment is bisphenol A (BPA). This is one of the most produced chemicals in the world (more than three million tonnes of it are produced each year), being used extensively in the production of polycarbonate plastics and resins. It is found in baby bottles, water bottles, linings of food containers, dental sealants, among other applications. As a result, there is a widespread exposure of the people to the BPA.

This study aimed to perform a systematic literature review about the pathophysiological mechanisms involved in the effects of BPA on testicular structure and function.

The main conclusions founded were that exposure to BPA induces oxidative stress and excessive apoptosis, has transgenerational effects, and mutagenic effects in male germ cells, decreases the synthesis of androgens, can act as an estrogen agonist, interferes with the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, and induces perturbations in Sertoli cell junctional proteins, endangering male fertility.

The studies in humans have shown that exposure to BPA was associated with alterations in hormone levels in men, decreased sperm quality, and increased deoxyribonucleic acid damage in sperm. It was also shown that BPA exposure in the workplace increases the risk of male sexual dysfunction, which translates into a reduction of libido, difficulty in erection and ejaculation, and reduced satisfaction with sex life. However, further studies are needed to obtain more consistent data, revealing this way, the real influence of BPA exposure on male fertility.

Taking into account what it was exposed in this work, it is advisable to take measures, aimed at replacing the BPA by harmless components to human health, as well as the restriction of its use with well-defined rules about the exposure levels.

Keywords

Bisphenol A, Testicular function, Infertility, Spermatogenesis, Sperm.

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo e Palavras-chave	vii
Abstract and Keywords	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Acrónimos	xv
1. Introdução	1
2. Metodologia	3
3. Anatomia e Fisiologia da Fertilidade Masculina	5
3.1. Estrutura Anatômica dos Testículos	5
3.2. A espermatogénese e formação do sémen	7
3.3. A regulação hormonal das funções reprodutoras	9
4. Bisfenol A	11
5. Efeitos do Bisfenol A na Função Reprodutiva Masculina	13
5.1. Espécies reactivas de oxigénio e stress oxidativo	13
5.2. Apoptose	15
5.3. Efeitos transgeracionais	17
5.4. Síntese de Androgénios	19
5.5. Relação com os Receptores de Estrogénios	21
5.6. Eixo hipotalâmico-pituitária-gonadal	23
5.7. Efeito mutagénico e espermatogénese	24
5.8. Outros Efeitos do Bisfenol A	25
5.9. Estudos em Humanos	26
6. Considerações sobre os estudos em humanos e animais	31
7. Conclusão	33
8. Bibliografia	35

Lista de Figuras

Figura 1 - Anatomia da região inguinal e da genitália externa masculina

Figura 2 - Testículo e estruturas associadas

Figura 3 - Espermatogénese

Figura 4 - Espermiogénese

Figura 5 - Regulação do feedback do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular

Figura 6 - Estrutura molecular do BPA

Figura 7 - Resumo do efeito do BPA na função testicular e reprodutiva

Lista de Acrónimos

3 β -HSD	3 β -hidroxiesteróide desidrogenase 1
17 β -HSD3	17 β -hidroxiesteróide desidrogenase 3
ABP	Proteína de ligação aos androgénios
AJ	Junções de aderência
AMP	Adenosina monofosfato
Aromatase	CYP19
ARs	Receptores dos androgénios
ATM	Ataxia-telangiectasia-mutada
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Ataxia-telangiectasia e proteína relacionada com Rad 3
BAD	Antagonista de BCL-2 de morte celular
BCL-2	Linfoma de células B-2
BPA	Bisfenol A
BTB	Barreira hematotesticular
bw	Peso corporal
CAT	Catalase
Chk2	Quinase 2 do ponto de verificação
Cx	Conexinas
CYP17A1	Citocromo P450 17 α -hidroxilase/17,20-liase
DDR	Resposta à lesão de DNA
DES	Dietilestilbestrol
DHT	5 α -dihidrotestosterona
DISC	Complexo de sinalização indutor da morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	Quebras das cadeias de DNA
EDs	Disruptores endócrinos
ERs	Receptores de estrogénios
FasL	Fas ligando
FSH	Hormona folículo-estimulante
GD	Dia gestacional
GJ	Junções de comunicação
GnRH	Hormona libertadora de gonadotropinas
GRIP-1	Proteína-1 integradora do receptor-G
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HPG	Hipotalâmico-pituitária-gonadal
INSL3	Insulina-tipo 3

KiSS-1	Kisspeptina
LH	Hormona luteinizante
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NCoR	Co-repressor nuclear
ODF1	Proteína 1 de fibra densa externa
p/CIP	Proteína associada ao co-integrador p300/CPB
PND	Dia pós-natal
PUFAs	Ácidos gordos polinsaturados
PUMA	Modulador a montante de p53
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SCJPs	Proteínas de junção das células de Sertoli
SOD	Superóxido dismutase
SRC-1	Co-activador-1 do receptor esteróide
SRs	Receptores de esteróides
StAR	Proteína reguladora aguda da esteroidogénese
TJ	Junções de oclusão
TNFR1	Receptor 1 do factor de necrose tumoral
TNP1	Proteína 1 de transição
uBPA	BPA não conjugado
ZO-1	Zona Ocludina-1

1. Introdução

A infertilidade, definida como a incapacidade para engravidar depois de manter relações sexuais frequentes e desprotegidas por mais de um ano, é uma condição que actualmente afecta 15% dos casais em todo o mundo, com tendência para aumentar nos próximos anos. Aproximadamente 50% dos casos são atribuídos ao parceiro masculino (1, 2).

A baixa contagem de espermatozóides (oligospermia), ausência de espermatozóides no sémen (azoospermia), e as anormalidades morfológicas estão entre os principais factores que contribuem para a infertilidade masculina (3). As causas das contagens de esperma reduzidas e da pobre qualidade do sémen são desconhecidas na maioria dos casos (4).

A espermatogénese constitui o processo de formação dos espermatozóides. Tem início em média aos 13 anos de idade e prossegue durante a maior parte da vida, diminuindo acentuadamente na velhice (5). É extremamente influenciada por estímulos externos, tais como fármacos, radiação, patologias reprodutivas e somáticas, temperatura e poluentes, devido ao contínuo grande número de divisões celulares, e aos processos de diferenciação celular e maturação do esperma (3, 4).

A incidência crescente de distúrbios reprodutivos observada ao longo das últimas décadas aumentou a preocupação em torno das substâncias conhecidas como disruptores endócrinos (EDs), isto é agentes que interferem com a síntese, metabolismo, e acção das hormonas endógenas (6, 7). A exposição a estes químicos, especialmente, durante os estágios de desenvolvimento pode causar disfunções ou anormalidades dos órgãos reprodutivos mais tarde na idade adulta, conduzindo à infertilidade ou ao desenvolvimento de cancro. Um dos EDs, conhecido por ser ubíquo no meio ambiente é o bisfenol A (BPA) (6, 8). Este é um dos químicos mais produzidos a nível mundial. Hoje em dia, estima-se que são gastos mais de 8 biliões de libras anualmente na sua produção, e que aproximadamente 100 toneladas são libertadas para a atmosfera todos os anos (9).

O BPA é utilizado na produção de plásticos de policarbonato, resinas, e em inúmeros produtos de consumo, podendo libertar-se de alguns destes polímeros para a água ou para produtos alimentares. Diversos estudos animais *in vitro* e *in vivo*, assim como estudos epidemiológicos humanos têm demonstrado que este composto exerce efeitos negativos nas funções reprodutivas masculinas (6, 7, 10, 11, 12).

Com o presente trabalho procura-se reunir, actualizar, e sumarizar a informação existente sobre os efeitos do BPA na função testicular e reprodutiva masculina, evidenciando os diversos mecanismos subjacentes envolvidos nesse processo.

2. Metodologia

A informação utilizada na elaboração da presente monografia foi obtida em livros de texto de referência na área da biologia celular e da biologia e fisiologia da reprodução, e em artigos de revistas científicas da especialidade. Para tal, utilizou-se a base de dados científica de biomedicina Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) usando como critérios de busca as palavras-chave “bisphenol A”, “testicular function”, “infertility”, “spermatogenesis”, e “sperm”, isoladamente ou nas diferentes combinações possíveis. A pesquisa foi restrita preferencialmente ao idioma inglês e efectuada maioritariamente entre Junho e Outubro de 2013. Procedeu-se posteriormente à análise e selecção dos artigos mais relevantes incluindo ensaios clínicos, estudos prospectivos e de investigação, os quais foram agrupados segundo os diferentes métodos de análise dos efeitos da exposição ao BPA na função testicular e reprodutiva masculina.

3. Anatomia e Fisiologia da Fertilidade Masculina

3.1. Estrutura Anatômica dos Testículos

Os testículos (Figura 1) são órgãos pares, esbranquiçados e ovóides, tendo cada um cerca de 4 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Cada testículo pesa entre 10 e 14 g. Eles produzem as células germinativas masculinas (espermatozóides) e hormonas masculinas, principalmente a testosterona. Estão suspensos dentro do escroto por meio dos funículos espermáticos, e habitualmente o testículo esquerdo encontra-se suspenso mais inferiormente do que o testículo direito (13, 14).

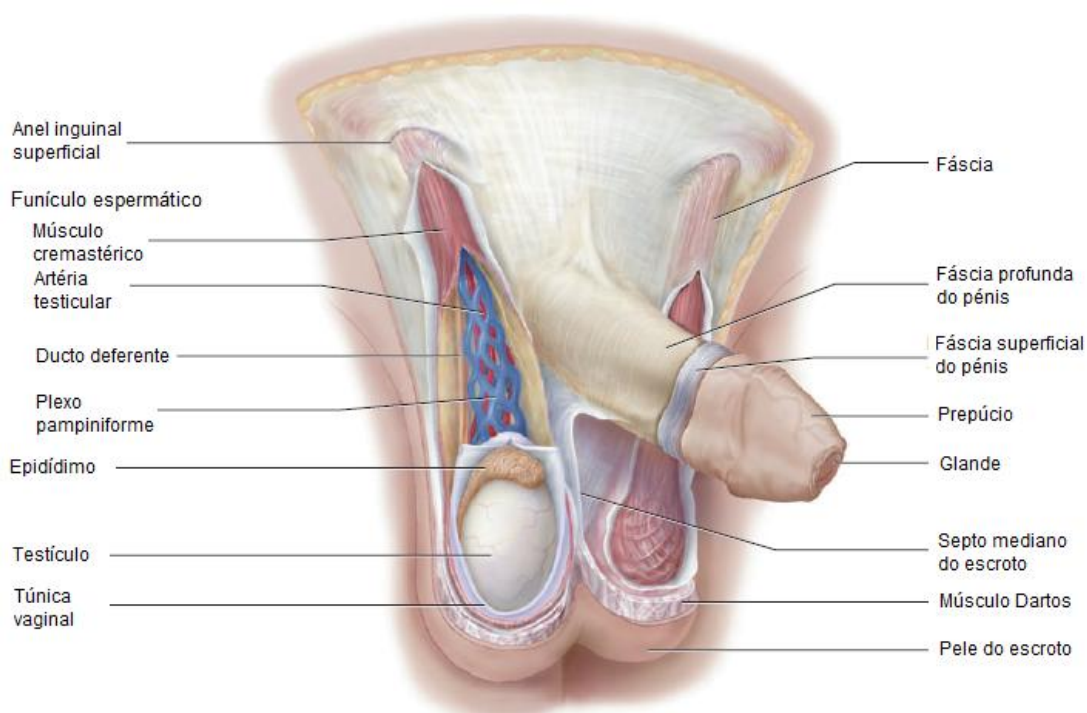


Figura 1 - Anatomia da região inguinal e da genitália externa masculina (adaptado de 15).

Como pode ser visualizado na Figura 2, cada testículo tem as suas superfícies anterior e lateral cobertas pela túnica vaginal (extensão do peritoneu). O testículo, em si, possui uma cápsula fibrosa branca denominada túnica albugínea. Septos de tecido conjuntivo dividem o testículo em cerca de 250 a 300 lóbulos em forma de cunha, e cada um destes lóbulos contém um a três túbulos seminíferos (15). Os túbulos seminíferos totalizam cerca de 600 m de comprimento e representam cerca de dois terços do volume testicular. Entre os túbulos seminíferos encontra-se tecido conjuntivo de suporte que contém células de Leydig (intersticiais), onde é produzida a testosterona (16, 17).

Os túbulos seminíferos têm um lúmen estreito revestido por um espesso epitélio germinativo. Esse epitélio consiste em várias camadas de células germinativas, e num número mais pequeno de células de Sertoli, que protegem as células germinativas e promovem o seu desenvolvimento. As células germinativas dependem das células de Sertoli para ter acesso a nutrientes, factores de crescimento, e para remoção de resíduos, entre outras necessidades. As células de Sertoli também secretam uma hormona chamada inibina que regula a taxa de produção de esperma (15).

As junções de oclusão (TJ) entre as células de Sertoli criam uma barreira hematotesticular (BTB), que filtra o plasma de forma eficaz, permitindo que apenas determinadas substâncias alcancem as células germinativas em desenvolvimento. Esta barreira também previne os produtos espermatogénicos de alcançar a corrente sanguínea, onde, se reconhecidos como substâncias estranhas, poderiam activar o sistema imunitário (16, 18).

Os túbulos seminíferos abrem-se para um sistema de canais curtos e rectos, designados de tubos rectos, os quais, por sua vez, se abrem para uma rede tubular designada por rede testicular. A rede testicular esvazia-se para dentro de 15 a 20 túbulos, os ductulos eferentes. Estes possuem um epitélio cilíndrico pseudo-estratificado ciliado, cujos cílios auxiliam no movimento dos espermatozóides do testículo para o epidídimo (19).

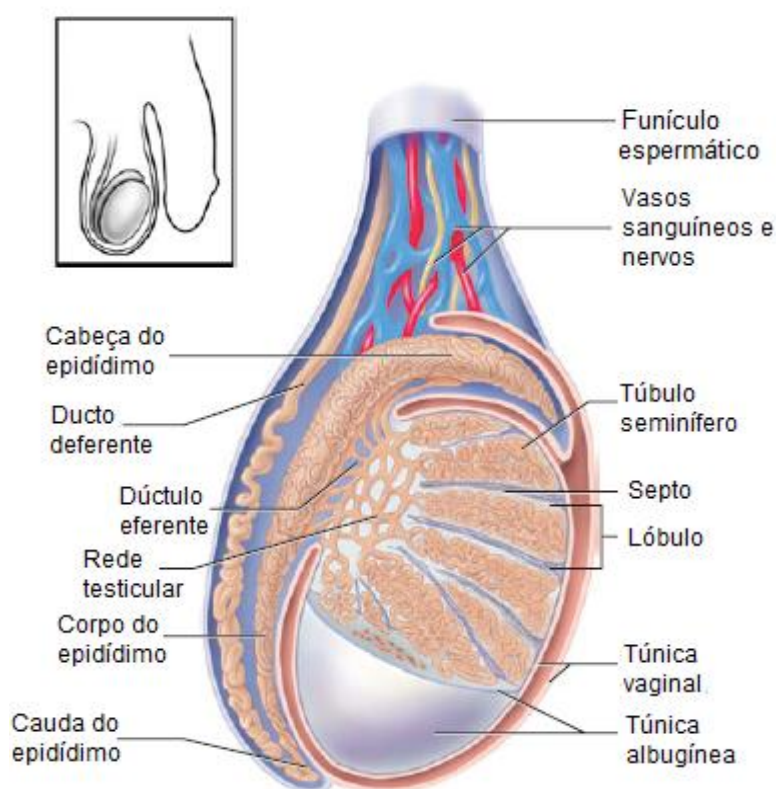


Figura 2 - Testículo e estruturas associadas (adaptado de 15).

3.2. A espermatogênese e formação do sêmen

A espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos durante a vida sexual activa, em resultado da estimulação das hormonas gonodotrópicas da hipófise anterior (5).

As primeiras células destinadas a fazerem parte do processo de formação do esperma são as células germinativas primordiais, que durante a formação do embrião migram para os testículos, e tornam-se células germinativas imaturas chamadas espermatogónias, situando-se em duas ou três camadas das superfícies internas dos túbulos seminíferos. A espermatogónia inicia as divisões mitóticas na puberdade, proliferando e diferenciando-se continuamente através de vários estágios de desenvolvimento para formar o esperma (5).

O processo de espermatogênese encontra-se esquematizado na Figura 3.

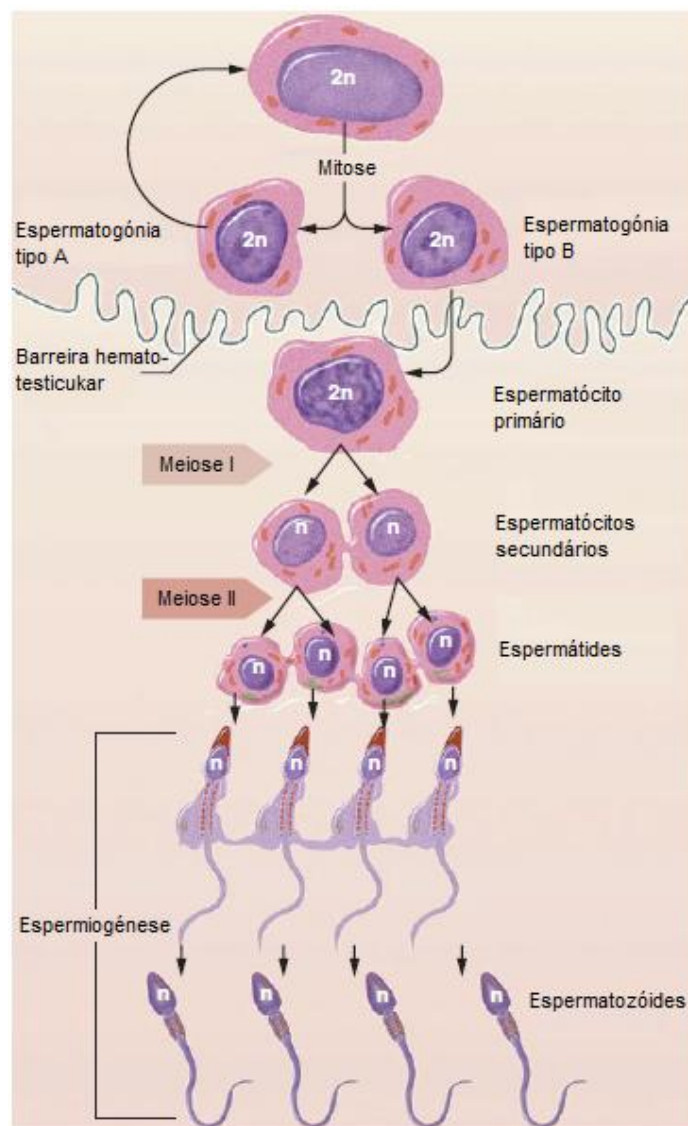


Figura 3 - Espermatogênese (adaptado de 15).

Cada espermatogónia multiplica-se por mitose, produzindo dois tipos de células filhas denominadas espermatogónia tipo A e tipo B. As células tipo A permanecem fora da BTB e

continuam a multiplicar-se desde a puberdade até à morte, dotando os homens de gâmetas ao longo da vida. A espermatogónia tipo B migra para próximo do lúmen do túbulo, e diferencia-se em células grandes chamadas espermatócitos primários. Estas células atravessam a BTB e movem-se em direcção ao lúmen do túbulo (15).

Assim que está isolado do sangue, o espermatócito primário submete-se à meiose I, dando origem a dois espermatócitos secundários haplóides de igual tamanho. Cada um destes submete-se à meiose II, dividindo-se em duas espermatídes, ou seja, um total de quatro por cada espermatogónia. Ao longo destas divisões meióticas, as células filhas não se separam completamente, permanecendo ligadas por pontes citoplasmáticas estreitas (15).

O processo seguinte na espermatogénese é denominado espermiogénese (Figura 4). Neste processo, as espermatídes submetem-se a condensação nuclear, redução do citoplasma, formação de um acrossoma, e desenvolvimento de uma cauda para emergirem como espermatozóides flagelados. Os espermatozóides são depois expelidos para o lúmen do túbulo por um processo chamado espermiacção (18). Esta ocorre ao longo de vários dias na extremidade apical do epitélio seminífero, e envolve várias etapas, incluindo a remodelação da cabeça e do citoplasma da espermatíde, remoção de estruturas de adesão especializadas e a final separação das espermatídes das células de Sertoli (20).

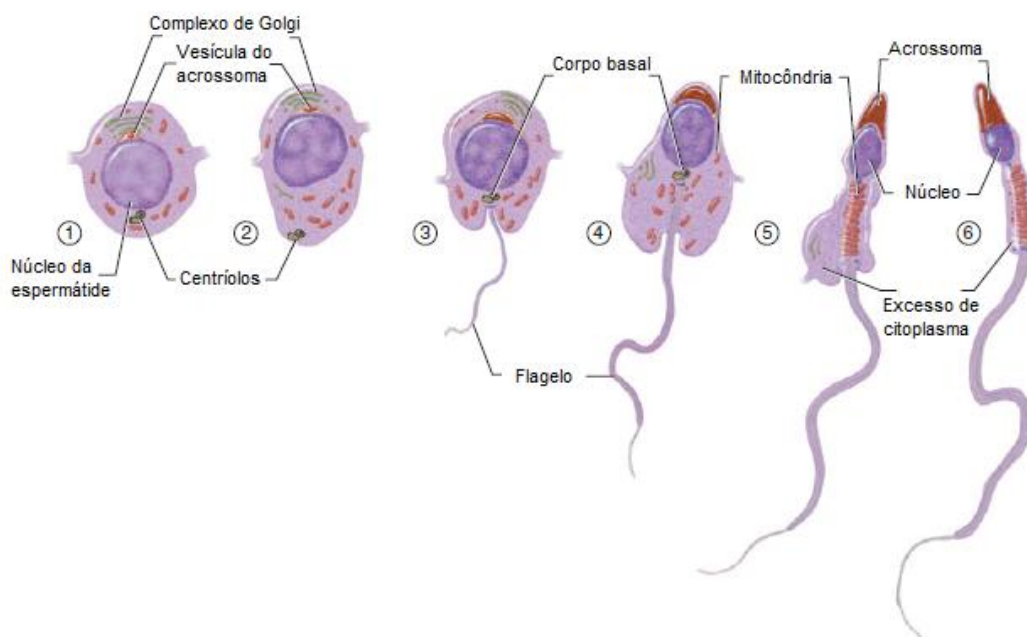


Figura 4 - Espermiogénese. Neste processo, as espermatídes descartam o citoplasma em excesso, crescem os flagelos, e tornam-se espermatozóides (adaptado de 15).

Durante a mudança do estágio de espermatócito para o estágio de espermatíde, os 46 cromossomas (23 pares de cromossomas) do espermatócito dividem-se, de forma a irem 23 cromossomas para uma espermatíde e outros 23 para a segunda espermatíde. Os genes cromossómicos também se dividem e, assim, só metade das características genéticas do

possível feto são fornecidas pelo pai, provindo a outra metade do óocito fornecido pela mãe (5).

A sequência inteira de desenvolvimento desde a espermatogonia até aos espermatozoides leva cerca de 60 a 70 dias, e um homem sexualmente maduro saudável produz cerca de 200 milhões de espermatozoides diariamente (17, 18).

3.3. A regulação hormonal das funções reprodutoras

O controlo da função reprodutiva masculina depende de uma série de hormonas cuja secreção é regulada através de ansas de feedback negativo. O hipotálamo produz a hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH) que é conduzida no sistema porta hipofisário para a pituitária anterior. Esta estimula a libertação das gonadotropinas, hormona folículo-estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH), que são transportadas na circulação para os testículos, actuando em diferentes células alvo (21).

A GnRH é libertada em pulsos distintos aproximadamente a cada 2 horas, resultando em pulsos correspondentes de LH e FSH (16). A LH estimula as células de Leydig dos testículos a secretar androgénios, principalmente testosterona, enquanto a FSH estimula as células de Sertoli a secretar a proteína de ligação aos androgénios (ABP). Pensa-se que esta última aumenta os níveis de testosterona nos túbulos seminíferos e no epidídimo (15).

A testosterona estimula a espermatogénese na presença de ABP, inibe a secreção de GnRH pelo hipotálamo, e reduz a sensibilidade da hipófise à GnRH. Consequentemente, as secreções de FSH e LH são reprimidas (15). Assim, sempre que a secreção de testosterona se torna muito elevada, este efeito automático de feedback negativo, operando através do hipotálamo e da hipófise anterior, reduz a secreção de testosterona para níveis de funcionamento desejados. Em oposição, quantidades pequenas de testosterona induzem o hipotálamo a secretar grandes quantidades de GnRH, com o correspondente aumento na secreção de LH e FSH da hipófise anterior e o consequente aumento na secreção testicular de testosterona (5).

A FSH actua nas células de Sertoli para estimular a secreção de agentes parácrinos que são essenciais para a espermatogénese. Simultaneamente, a testosterona secretada pelas células de Leydig actua localmente, como agente parácrino, na espermatogénese, movendo-se dos espaços intersticiais para os túbulos seminíferos. Aqui, entra nas células de Sertoli, e é através dessas células que facilita a espermatogénese. Assim, apesar da ausência de qualquer efeito directo da LH sobre as células nos túbulos seminíferos, essa hormona exerce um efeito indirecto essencial porque a secreção de testosterona estimulada pela LH é necessária para a espermatogénese. Deste modo, para iniciar a espermatogénese é necessário tanto FSH como testosterona (22).

Quando os túbulos seminíferos deixam de produzir espermatozoides, a secreção de FSH pela hipófise anterior aumenta acentuadamente. Por outro lado, quando a espermatogénese ocorre muito rapidamente, a secreção de FSH pela hipófise diminui. Este mecanismo de feedback negativo sobre a hipófise anterior é causado pela secreção de uma

hormona chamada inibina pelas células de Sertoli. Esta tem um efeito directo intenso sobre a hipófise anterior, inibindo a secreção de FSH, e um efeito discreto sobre o hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH (5).

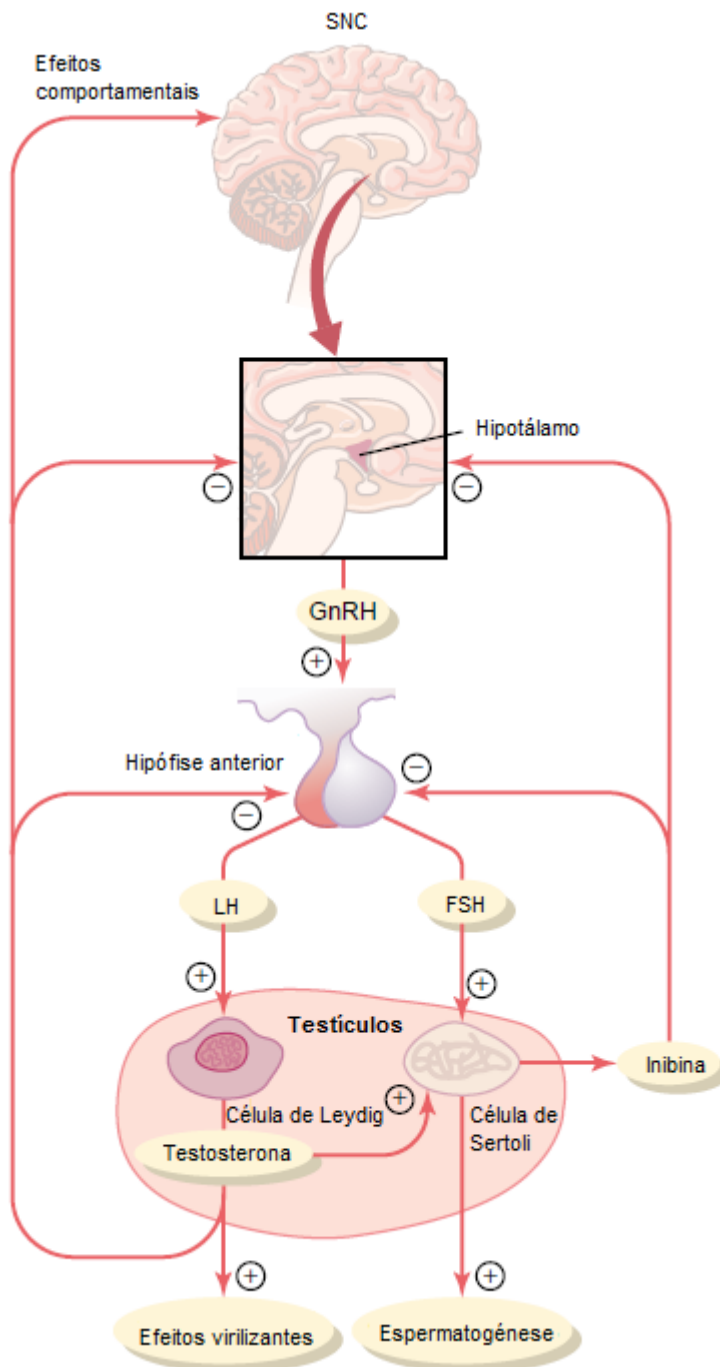


Figura 5 - Regulação do feedback do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular. SNC - sistema nervoso central; GnRH - hormona libertadora de gonadotropinas; LH - hormona luteinizante; FSH - hormona foliculo-estimulante; ⊕ - feedback positivo; ⊖ - feedback negativo (adaptado de 5).

4. Bisfenol A

O BPA (Figura 6) é um dos químicos mais produzidos a nível mundial, sendo a sua produção anual superior a 3 milhões de toneladas (23). As suas propriedades mais relevantes são a baixa pressão de vapor, solubilidade aquosa moderada, e a baixa volatilidade (24). À temperatura ambiente encontra-se no estado sólido como um pó ou grânulo cristalino acinzentado ou incolor com odor semelhante ao clorofenol (24, 25).

O BPA pode-se ligar aos receptores de estrogénios (ERs), no entanto a sua afinidade é de 10000 a 100000 vezes menor quando comparada com a do estradiol (26).

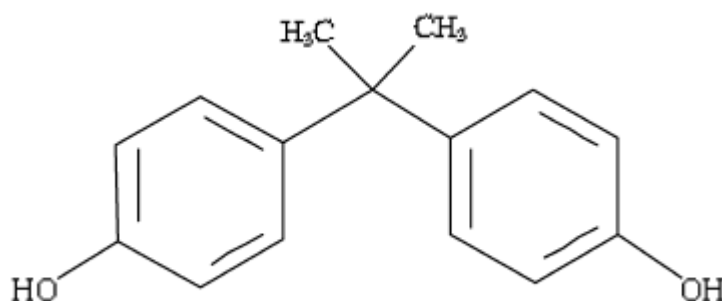


Figura 6 - Estrutura molecular do BPA (adaptado de 25)

O BPA é utilizado principalmente como intermediário na produção de plásticos de policarbonato e de resinas epoxídicas, que estão presentes em diversos produtos da nossa vida diária, incluindo perfumes, cosméticos, brinquedos, materiais de pavimentação, CDs, DVDs, equipamento electrónico, automóveis, equipamentos desportivos, dispositivos médicos (ex: selantes dentários), serviços de mesa, biberões, e embalagens alimentares. De forma a proteger as comidas e bebidas do contacto directo com metais, as resinas epoxídicas são também utilizadas no revestimento interno das latas de comida e bebidas (24, 27). De igual modo, podemos encontrar o BPA numa grande variedade de papéis e cartões, incluindo recibos de caixas registadoras, papéis usados para embrulhar a comida, filtros de cigarro e notas de dinheiro (23).

A libertação de BPA para o meio ambiente pode ocorrer durante a sua produção química, transporte e processamento. As libertações subsequentes processam-se principalmente através de descargas de estações de tratamento de águas residuais, dos lixiviados dos aterros, da combustão de lixo doméstico, e da degradação natural dos plásticos no meio ambiente (28).

As moléculas de BPA estão unidas por ligações éster nos policarbonatos e nas resinas, e a exposição ao calor, assim como o contacto com compostos ácidos ou básicos aceleram a hidrólise dessas ligações (9, 29).

As fontes de exposição humana ao BPA incluem a dieta, o meio ambiente (ar ambiente, ar interior da habitação, água ingerida, solo, e pó), e o uso de consumíveis (24). Das diferentes vias de exposição, a dieta parece ser a principal fonte de exposição. Devido às propriedades físico-químicas do BPA, é expectável que as fontes de ingestão oral mais significativas provavelmente provenham de comidas enlatadas revestidas com resinas epoxídicas, da água consumida nas garrafas de policarbonato, e da saliva derivada de selantes dentários. O BPA também é usado como antioxidante em cosméticos e comidas, esperando-se então a penetração e absorção do BPA através da inalação, assim como do contacto cutâneo, constituindo, estas últimas, vias de exposição humana suplementares (24).

Nos humanos o BPA administrado oralmente é rapidamente e eficientemente (>95% da dose) absorvido a partir do trato gastrointestinal e submetido a um metabolismo de primeira passagem extenso na parede intestinal e no fígado. Durante essa etapa, a biotransformação de BPA a glicuronídeo de BPA é a principal via da biotransformação do BPA, gerando-se, no entanto também, sulfato de BPA (30). A formação dos conjugados de BPA é considerada uma reacção de desactivação, uma vez que tanto o glicuronídeo de BPA como o sulfato de BPA estão desprovidos de actividade estrogénica (30). Devido à elevada solubilidade em água, o glicuronídeo de BPA é rapidamente depurado do sangue pelos rins e excretado na urina. No entanto, a exposição ambiental a concentrações nanomolares de BPA é generalizada e contínua (30, 31). As exposições transdérmica e inalatória não estão sujeitas à extensa conjugação de primeira passagem que ocorre com a ingestão oral (26).

As crianças e os adolescentes, à partida, têm maior risco de exposição do que os adultos porque utilizam mais provavelmente produtos que contêm BPA (ex: biberões, brinquedos) e consomem maior número de bens alimentares embalados em produtos que contêm BPA (ex: comida enlatada) (23).

Posto isto, há uma preocupação crescente relativamente ao potencial papel do BPA na saúde humana, nomeadamente, na infertilidade masculina idiopática, uma vez que ele é um ED e por conseguinte pode mimetizar as hormonas corporais. Muitos estudos em animais demonstraram que a exposição ao BPA diminui a produção de esperma (24, 32).

5. Efeitos do Bisfenol A na Função Reprodutiva Masculina

O BPA, sendo um químico utilizado em larga escala na produção de plásticos de policarbonato e resinas, que se encontram presentes nos mais variados produtos utilizados no nosso dia-a-dia, torna a exposição generalizada da população uma realidade. Neste ponto do presente trabalho, pretendem-se averiguar os possíveis efeitos do BPA nos diversos aspectos da anatomia e fisiologia da função reprodutiva masculina, integrando dados procedentes de vários estudos realizados, expondo-se de seguida os múltiplos mecanismos de acção e vias subjacentes envolvidos (espécies reactivas de oxigénio (ROS) e stress oxidativo, apoptose, efeitos transgeracionais, síntese de androgénios, relação com os ERs, eixo hipotalâmico-pituitária-gonadal (HPG), efeito mutagénico e espermatogénese, outros efeitos do BPA, e estudos em humanos).

5.1. Espécies reactivas de oxigénio e stress oxidativo

As ROS conhecidas como radicais livres são agentes oxidantes gerados em resultado do metabolismo do oxigénio e têm pelo menos um electrão não pareado que os torna espécies muito reactivas. Normalmente, os radicais livres atacam a molécula estável mais próxima, que se torna um radical livre em si mesma, começando uma cascata de reacção em cadeia. O metabolismo aeróbio normal está relacionado a níveis óptimos de ROS porque existe um equilíbrio entre a produção de ROS e a actividade dos antioxidantes. O stress oxidativo é o termo aplicado quando os oxidantes ultrapassam em número os antioxidantes devido à geração excessiva de ROS e quando os antioxidantes não são capazes de eliminar estes radicais livres. Tal fenómeno causa efeitos patológicos, danifica as células, tecidos e órgãos (33).

A elevada geração de ROS no trato reprodutivo masculino tem efeitos tóxicos potenciais na qualidade e função do esperma (34). As membranas dos espermatozoides são ricas em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) e são sensíveis à lesão induzida pelo oxigénio mediada pela peroxidação lipídica, que se traduz em perda de integridade da membrana, causando aumento da permeabilidade celular, inactivação enzimática, e lesões estruturais do ácido desoxirribonucleico (DNA) (34, 35). Apesar da exposição excessiva às ROS ser prejudicial aos espermatozoides, são necessárias pequenas quantidades destas moléculas para os espermatozoides adquirirem a capacidade de fertilização (34, 36).

A geração de ROS pelos espermatozoides ocorre de duas formas: através do sistema de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase ao nível da membrana plasmática, e por intermédio da oxidoredutase dependente de NADPH ao nível mitocondrial (36).

Para contrariar os efeitos das ROS, os testículos possuem sistemas de defesa antioxidantes que previnem a lesão celular. A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px) são as principais enzimas antioxidantes utilizadas para eliminar os radicais de oxigénio nos órgãos reprodutivos masculinos e em outros órgãos (37).

Além disso, o sémen contém várias moléculas não enzimáticas antioxidantes tais como a vitamina C, vitamina E, piruvato, glutathione, e carnitina. Estes antioxidantes compensam a perda das enzimas citoplasmáticas do esperma à medida que o citoplasma é expelido durante a espermiogénese, o que por sua vez, diminui os mecanismos de reparação endógenos e as defesas enzimáticas (34).

A glicose é essencial para a realização bem-sucedida da espermatogénese e esteroidogénese testiculares que requerem elevada energia. A esteroidogénese testicular regulada é resultado de múltiplos mecanismos que envolvem efeitos combinados de LH, FSH, insulina e glicose. Sob condições normais a difusão de glicose para as células é facilitada por proteínas transportadoras específicas conhecidas como transportadores de glicose (GLUT-8 e GLUT-2) (38). A captação celular de glicose para dentro das células pelos transportadores de glicose é realizada pela insulina, e vários factores desempenham um papel importante na manutenção da sinalização de insulina e na homeostasia da glicose no corpo. Entre eles, as ROS são um dos reguladores chave da sinalização de insulina e da homeostasia da glicose nos órgãos. Apesar de níveis óptimos de ROS serem essenciais para a acção da insulina, níveis aumentados podem prejudicar a sinalização de insulina (38).

Num estudo foram administradas a ratas quatro diferentes doses baixas de BPA (0,005; 0,5; 50 e 500 µg de BPA/kg de peso corporal (bw)/dia durante 45 dias), e 17-β-estradiol a uma dose de 50 µg/kg/dia como controlo positivo. No final observou-se uma diminuição dose-dependente nas actividades das enzimas antioxidantes nos testículos e um aumento nos níveis de peroxidação lipídica seguindo-se à administração de BPA, observando-se efeitos similares com o controlo positivo, o que indicou prevalência do stress oxidativo nos testículos. Registou-se também diminuição nos níveis das moléculas sinalizadoras de insulina, GLUT-2 e das enzimas esteroidogénicas nos testículos das ratas tratadas quer com BPA assim como com o controlo positivo. Através de estruturas modeladas de GLUT-2 e GLUT-8 foi demonstrado que o BPA interage com estes transportadores de glicose, inibindo a captação de glicose nos testículos (38).

Administrando-se durante 10 dias BPA a ratas-macho adultas por meio de sonda gástrica a 200 mg/kg bw/dia com ou sem pré-tratamento de melatonina (potente antioxidante), demonstrou-se que a exposição ao BPA pode induzir lesão do DNA nas células germinativas das ratas-macho através do stress oxidativo, que pode ser prevenido com a administração de melatonina. A lesão do DNA induzida pelo BPA estava associada com depleção da actividade da SOD. A melatonina e os seus metabólitos eliminam directamente vários radicais livres, e reduzem o stress oxidativo estimulando as actividades das enzimas anti-oxidativas (SOD, GSH-Px). Além disso, é uma protectora eficiente do DNA, proteínas, e lípidos (37).

A exposição de ratos “Swiss albino” a uma dose oral de BPA a 10 mg/kg bw durante 14 dias causou toxicidade mitocondrial no tecido testicular. Ele afectou actividades de enzimas vitais das mitocôndrias que são parte da bioenergética mitocondrial assim como enzimas antioxidantes. O tratamento do BPA também induziu a peroxidação lipídica demonstrando vulnerabilidade da membrana mitocondrial à sua exposição (39). A administração concomitante de melatonina (10 mg/kg bw; intraperitonealmente durante 14 dias) reduziu a peroxidação lipídica mitocondrial, restaurou a actividade das enzimas mitocondriais e melhorou os diminuídos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos das mitocôndrias (39).

Na investigação desenvolvida por Hulak e seus colaboradores foi averiguado o efeito da exposição *in vitro* do esperma de esturjão (*Acipenser ruthenus*) ao BPA (0,5; 1,75; 2,5; 5 e 10 µg/L) durante 2 horas, em relação aos parâmetros da motilidade dos espermatozóides, conteúdo de adenosina trifosfato (ATP), integridade do DNA, e índices de stress oxidativo. Os resultados revelaram que o BPA diminuiu significativamente a motilidade e velocidade dos espermatozóides a concentrações de 2,5 - 10 µg/L, e foi encontrada uma correlação positiva entre a percentagem de espermatozóides móveis e o conteúdo de ATP (35). O stress oxidativo foi observado a concentrações de 1,75 - 10 µg/L, como reflectido pelos níveis significativamente elevados das oxidações lipídica e proteica e da actividade da SOD (35). O conteúdo de ATP dos espermatozóides diminuiu com concentrações crescentes de BPA, dado que níveis elevados de ROS inibem uma ou mais enzimas da fosforilação oxidativa e/ou glicólise, limitando a geração de ATP. Registou-se também um grande aumento na fragmentação de DNA a concentrações de 1,75 µg/L e superiores (35). Tudo isto confirma que estas concentrações de BPA (semelhantes às encontradas na natureza) são capazes de induzir stress oxidativo, tornando a qualidade do esperma deficiente (35).

Em outro estudo, a administração por via oral a ratas macho “Sprague-Dawley” de BPA a níveis de 0 e 50 mg/kg/dia durante 8 semanas, causou variação da composição dos ácidos gordos n-6 e diminuição dos níveis das enzimas antioxidantes (40).

Com base nestes dados, pode-se afirmar que a exposição ao BPA mesmo em doses reduzidas é capaz de induzir stress oxidativo, pondo em risco a fertilidade masculina.

5.2. Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada e está envolvida em vários eventos fisiológicos e patológicos. Durante os vários estágios da espermatogénese em mamíferos, a apoptose das células germinativas ocorre para remover células espermatogénicas anormais e para manter a quantidade e qualidade normais do esperma. A apoptose das células germinativas é também induzida por muitos factores incluindo falta de hormonas, calor, radiação, e substâncias tóxicas. A apoptose excessiva e/ou anormal das células germinativas é uma das razões para a oligozoospermia e azoospermia (41).

As caspases são um grupo de cisteína proteases dentro das células e a sua cascata de activação desempenha um papel importante após a indução da apoptose (41). Elas são sintetizadas como zimogénios inactivos, tornando-se activos face ao estímulo de morte. A via

extrínseca é iniciada pela activação dos receptores de morte, tais como o Fas ou o receptor 1 do factor de necrose tumoral (TNFR1). A trimerização dos receptores de morte em resposta à ligação do ligando induz a formação de um complexo multimérico denominado complexo de sinalização indutor da morte (DISC), que activa a procaspase-8 nos ratos e a caspase-10 nos humanos (3).

A caspase-8 e/ou 10 proteoliticamente processam a caspase-3, -6 e -7. Entre elas, a caspase-3 é a principal caspase executante envolvida no desmantelamento do complexo de Golgi, fragmentação da lâmina nuclear, fragmentação de DNA, e diminuição no potencial de membrana mitocondrial (3). A via intrínseca da apoptose pode ser activada por diferentes estímulos, tais como radiação, fragmentação de DNA, fome, stress oxidativo e autofagia. É caracterizada por uma diminuição no potencial de membrana da mitocôndria e libertação do citocromo C da mitocôndria, que juntamente com a desoxi-ATP, a proteína citosólica Apaf-1 e a procaspase-9 formam um complexo denominado apoptossoma. Dentro deste complexo, a procaspase-9 torna-se activa e depois activa a caspase-3, conectando as vias intrínseca e extrínseca (3).

Os eventos de sinalização que levam à apoptose são assim divididos em duas vias principais: a via Fas e Fas ligando (FasL), e a via mitocondrial. O sistema Fas/FasL é o principal indutor da apoptose das células germinativas. A translocação do citocromo C da mitocôndria para o citosol é o evento primário na via de sinalização mitocondrial para a apoptose (42).

A estabilidade da membrana da mitocôndria é preservada pela proteína anti-apoptótica da família do linfoma de células B-2 (BCL-2). A BCL-2, BCL-x e BCL-w são três proteínas anti-apoptóticas que interagem e reprimem a actividade das proteínas pró-apoptóticas. Existem duas classes gerais de proteínas da família pró-apoptótica: aquelas que partilham três regiões homólogas (BH1, BH2 e BH3), e que são denominadas proteínas multidomínio; e aquelas que partilham uma pequena sequência homóloga, excepto para o domínio BH3 conservado, também denominadas proteínas “apenas BH3”. Entre o grupo de “apenas BH3” encontra-se o antagonista de BCL-2 de morte celular (BAD) e o modulador a montante de p53 (PUMA) (3).

As proteínas pró-apoptóticas de multidomínios BAX e BAK são cruciais para a permeabilização da membrana mitocondrial externa e a subsequente libertação de moléculas apoptogénicas, que levam à activação da caspase-9. Assim, a apoptose é um processo complexo que envolve a activação de várias vias para induzir a morte celular evitando uma resposta inflamatória (3).

A administração por via oral de BPA a 2 µg/kg bw/dia durante 14 dias a ratas adultas, demonstrou que a exposição a doses baixas de BPA prejudica a espermatogénese devido à redução das hormonas reprodutivas, e à indução da apoptose das células germinativas pela activação da via Fas/FasL nos tecidos testiculares (43).

No trabalho desenvolvido por Li e seus colaboradores o BPA foi administrado através de sonda gástrica nas doses de: 0 (controlo), 160, 480, e 960 mg/kg/dia a ratos do dia pós-

natal (PND) 31-44, seguindo-se a observação da morfologia e detecção da apoptose e expressões de Fas/FasL e da caspase-3 activa nos PNDs 45, 60 e 90 (41). Desta análise verificou-se que não houve efeito do BPA na dose de 160 mg/kg/dia, contudo, as doses de 480 e 960 mg/kg/dia revelaram subdesenvolvimento dos testículos e interrupção da espermatogénese. Constatou-se a existência de muitas células de Leydig e células germinativas apoptóticas nos testículos com os índices apoptóticos significativamente aumentados em relação aos controlos. A expressão do Fas e da caspase-3 activa estava localizada nos mesmos tipos celulares em que a apoptose ocorreu, e os níveis de expressão de Fas, FasL, e caspase-3 activa estavam significativamente aumentados em relação aos controlos. A perturbação da espermatogénese, a apoptose e a supra-regulação da expressão de Fas, FasL, e caspase-3 activa persistiu até ao PND 90 (41). Estes resultados sugerem que o BPA em altas doses induz a apoptose das células de Leydig e das células germinativas nos testículos dos ratos através da via sinalizadora Fas (41).

Num outro estudo foi administrado BPA (160 ou 480 mg/kg) por sonda nasogástrica diariamente a ratos-macho desde o PND 35 ao PND 49, verificando-se que o número de células germinativas apoptóticas por túbulo seminífero e a percentagem de túbulos seminíferos com células germinativas apoptóticas eram significativamente maiores nos testículos dos ratos tratados com BPA (42). Foi também notório um aumento no nível de Fas e FasL nos testículos dos ratos expostos ao BPA. Além disso, a exposição ao BPA evocou a activação da caspase-8 e caspase-3 nos testículos, causou a translocação do citocromo C da mitocôndria para o citosol, e supra-regulou o nível de BAX e da caspase-9 activa nos testículos. Estes resultados sugerem que a exposição ao BPA induz a apoptose das células germinativas nos testículos não só através da via de sinalização Fas/FasL como também pela via apoptótica mitocondrial (42).

Assim, a indução excessiva da apoptose após a exposição ao BPA constitui uma das possíveis vias pelas quais ela actua no organismo, prejudicando a fertilidade masculina.

5.3. Efeitos transgeracionais

O período perinatal é considerado uma das janelas sensíveis e vulneráveis do desenvolvimento, que engloba um período crucial envolvendo a diferenciação sexual, em que pequenas perturbações hormonais podem ter um impacto de longa duração na fertilidade (44).

Numa experiência realizada por Kobayashi *et al.* administraram-se 0; 0,33; 3,3; e 33 ppm de BPA na dieta de ratas prenhas do dia gestacional (GD) 6 até ao PND 21 e examinaram-se posteriormente os efeitos no desenvolvimento reprodutivo na descendência das ratas. Os resultados sugeriram que a exposição in útero e durante a lactação a doses baixas de BPA na dieta (0,33 - 33 ppm) não afectava adversamente o desenvolvimento reprodutivo na descendência das ratas (45).

Por seu lado, LaRocca e os colegas desenvolveram um estudo no qual examinaram o peso dos órgãos sexuais, a distância anogenital, e a histopatologia dos testículos de ratos-macho adultos expostos in útero através de sonda gástrica a óleo de sésamo, 50 µg/kg de

BPA, 1000 µg/kg de BPA, ou 2 µg/kg de dietilestilbestrol (DES) (controle positivo) do GD 10-16 (46). Eles constataram que a exposição moderada (50 µg/kg) a elevada (1000 µg/kg) ao BPA in útero não leva a alterações grosseiras no bw adulto, peso testicular, distância anogenital, espermatogênese, produção de esperma, ou alterações específicas na expressão de genes associada com a esteroideogênese, apoptose, ou maturação da célula de Sertoli na geração F1 dos ratos adultos (46). Contudo, a exposição in útero ao DES aumentou a distância anogenital nos machos F1, e alterou a expressão de genes associados com um fenótipo da célula de Sertoli alterado (46). Em suma, estes resultados indicam que às doses empregues através de sonda gástrica, o BPA não afecta a saúde reprodutiva masculina jovem adulta em relação aos testículos (46).

Noutro estudo, alimentaram-se ratas fêmeas prenhas (F0) através de sonda gástrica com BPA (1,2 e 2,4 µg/kg bw), um controle ou DES (10 µg/kg bw) durante o período perinatal. Os machos F1 adultos foram sujeitos a avaliação da fertilidade por acasalamento com fêmeas não expostas, e as funções reprodutivas das ninhadas subsequentes F2 e F3 foram investigadas de maneira similar (44). No final foi visível um aumento significativo na perda pós-implantação, e um decréscimo no tamanho da ninhada e na contagem e motilidade de espermatozoides na descendência masculina F1. Além disso, houve uma redução no perfil de expressão testicular dos receptores de esteróides (SRs). Estes efeitos foram muito proeminentes nas gerações subsequentes F2 e F3 (44). Deste modo, a exposição perinatal a doses de BPA ambientalmente relevantes afectou a linha germinativa masculina, prejudicando a fertilidade da descendência masculina F1 e suas subsequentes gerações F2 e F3 (44).

As interações entre as hormonas esteróides e os SRs desempenham um papel crucial na espermatogênese. Os co-reguladores estabelecem a ligação entre os SRs e a maquinaria transcripcional, e desempenham um papel fundamental na regulação do eixo reprodutivo. Dependendo do ligando, os co-reguladores dos SRs podem activar (co-activadores) ou reprimir (co-repressores) a expressão dos genes (47). Perturbações no perfil de expressão dos co-reguladores dos SRs terão influência significativa nas funções dos órgãos que respondem a esteróides durante a idade adulta, e eventualmente terão impacto na fertilidade (47). O grupo de co-activadores dos co-reguladores dos SRs é composto por três membros: co-activador-1 do receptor esteróide (SRC-1), proteína-1 integradora do receptor-G (GRIP-1), e proteína associada ao co-integrador p300/CPB (p/CIP) (47). O SRC-1 é crucial para o comportamento sexual e fertilidade masculina. Localiza-se nas células de Sertoli e nas células germinativas dos testículos das ratas adultas, onde estão expressos receptores dos androgénios (ARs) e ERs (47). O co-repressor nuclear (NCoR) é outro co-regulador do SR que tem efeitos inibitórios no funcionamento do SR. O NCoR está localizado no núcleo e no citoplasma das células de Leydig, que também co-expressam o ER alfa (47). A alteração do padrão de expressão do co-regulador do SR nas células de Leydig, células de Sertoli ou nas células germinativas dos testículos tem impacto no funcionamento dos esteróides e dos SRs nestas células, acarretando efeitos na espermatogênese (47).

Numa experiência na qual ratas fêmeas prenhas (F0) foram alimentadas por sonda gástrica diariamente com BPA (1,2 e 2,4 µg/kg bw) desde o GD 12 até ao PND 21, e na qual se realizou a localização imuno-histoquímica do SRC-1, da GRIP-1, da p/CIP e do NCoR nos testículos das ratas adultas das gerações F1, F2 e F3, observou-se uma redução significativa na expressão de SRC-1 e NCoR, com um aumento paralelo na expressão da p/CIP e da GRIP-1 nos testículos das ratas expostas durante o período perinatal ao BPA. O aumento na expressão de GRIP-1 decorreu possivelmente de um mecanismo compensatório pela redução no SRC-1. Foi visível um padrão semelhante nos testículos das ratas F2 e F3. (47). Assim, nesta experiência foi notória que a exposição perinatal das ratas-macho ao BPA criou perturbações transgeracionais no perfil de expressão dos co-reguladores dos receptores esteróides testiculares (47).

Com base nos dados referidos anteriormente pode-se concluir que a exposição a doses relevantes de BPA durante períodos prematuros de desenvolvimento muito provavelmente poderá causar alterações de longa duração na fertilidade masculina e que esses efeitos podem também ser transmitidos às gerações subsequentes com perturbações da fertilidade.

5.4. Síntese de Androgénios

As células de Leydig produzem testosterona que é responsável pela masculinização do sistema urogenital masculino e genitália externa, e pela produção de esperma nos túbulos seminíferos. Além disso, a migração dos testículos fetais para o escroto é dependente da testosterona e da Insulina-tipo 3 (INSL3), uma hormona produzida pelas células de Leydig (48).

Apesar das células de Leydig contabilizarem apenas cerca de 5% de todos os tipos celulares nos testículos na idade adulta, a testosterona produzida por elas perfaz mais de 95% da testosterona em circulação (49).

O processo da síntese dos androgénios inicia-se com a ligação da LH ao seu receptor acoplado a proteína G para activar a via da adenosina monofosfato (AMP) cíclico. A estimulação do receptor de LH induz a proteína reguladora aguda da esteroidogénese (StAR) e várias enzimas esteroidogénicas envolvidas na síntese do androgénio (16). Por seu lado, a StAR liga-se ao colesterol e facilita a transferência deste da membrana mitocondrial externa para a interna, onde a primeira enzima esteroidogénica CYP11A1 o usa como substrato para produzir pregnenolona. Esta subsequentemente difunde-se para o retículo endoplasmático liso, onde é convertida a testosterona pelas três seguintes enzimas: 3β-hidroxiesteróide desidrogenase 1 (3β-HSD), citocromo P450 17α-hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1) e 17β-hidroxiesteróide desidrogenase 3 (17β-HSD3) (50, 51). A primeira reacção no retículo endoplasmático liso é catalisada pela 3β-HSD para formar progesterona; a CYP17A1 catalisa duas reacções que convertem progesterona em 17α-hidroxiprogesterona e depois em androstenediona; e a 17β-HSD3 catalisa o último passo da androstenediona a testosterona (51). A testosterona pode ser convertida para o mais potente androgénio 5α-dihidrotestosterona (DHT) nas células de Leydig ou nos tecidos periféricos por vários tipos de

5 α -redutases (SRD5A1, 2e 3), particularmente a SRD5A2 que tem elevada afinidade para a testosterona, ou pode ser aromatizada a estradiol pela CYP19 (aromatase) (16, 49).

Após administração de BPA (0,0005 - 5 mg/kg bw) durante 8 semanas a ratazanas verificou-se que as concentrações testadas não originaram toxicidade nem alterações significativas nas hormonas do soro. Contudo, a testosterona testicular, e os genes relacionados à síntese hormonal StAR e CYP11A1 aumentaram, enquanto a 3 β -HSD, 17 β -HSD e aromatase diminuíram. Além disso, o BPA diminuiu significativamente a altura epitelial e as espermátides nos túbulos seminíferos, a contagem de esperma, a expressão do receptor de androgénio, e a expressão dos genes relacionados à espermatogénese: proteína 1 de fibra densa externa (ODF1) e proteína 1 de transição (TNP1). Estes resultados indicam que uma baixa concentração de BPA pode induzir alterações das proteínas relacionadas à síntese hormonal, e desordens da espermatogénese principalmente através da diminuição da expressão do receptor de androgénio (50).

A exposição de ratazanas-fêmeas prenhas por intermédio de sonda gástrica a BPA nas doses de 2,5 e 25 μ g/kg bw, do GD 12 até ao PND 21 estimulou na descendência masculina a divisão das células de Leydig no período pré-pubertal e aumentou o número das células de Leydig nos testículos das ratazanas-macho adultas aos 90 dias. A actividade proliferativa induzida pelo BPA *in vivo* foi mediada por proteínas quinase, receptores do factor de crescimento, e a hormona anti-Mulleriana secretada pelas células de Sertoli. Por outro lado, o BPA suprimiu a expressão da proteína do receptor da LH e a enzima 17 β -HSD3, diminuindo a secreção de androgénio pelas células de Leydig. O impacto do défice da secreção de androgénio nos níveis de androgénio no soro após a exposição ao BPA foi atenuado pelo grande número de células de Leydig (52).

Em outro estudo averiguaram-se os efeitos das concentrações de 10^{-12} M a 10^{-5} M de BPA na função das células de Leydig. Para isso, testículos fetais de humanos com 6,5 a 10,5 semanas de gestação, e de ratazanas e ratos num período crítico comparável de desenvolvimento foram explantados e cultivados na presença ou ausência de BPA durante 1 a 3 dias (48). As concentrações de BPA na ordem de 10^{-8} M reduziram a secreção de testosterona pelos testículos humanos a partir do primeiro dia de cultura, enquanto os testículos dos ratos e das ratazanas requereram concentrações de 10^{-5} . De igual modo, 10^{-8} M de BPA reduziram os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de INSL3 apenas nos testículos humanos cultivados. Por outro lado, 10^{-5} M e 10^{-6} M de DES, um composto estrogénico clássico, afectaram a secreção de testosterona apenas nas culturas de testículos de ratazanas e ratos (48). Por último, contrariamente ao efeito do DES, o efeito negativo do BPA na testosterona produzida pelos testículos fetais dos ratos manteve-se depois da inutilização do ER α , evidenciando uma via sinalizadora específica para o BPA que difere da do DES e que não envolve ER α (48).

Na experiência levada a cabo por Hatef e restantes colaboradores analisaram-se os efeitos do BPA (0,6; 4,5; e 11,0 μ g/L) na esteroidogénese e na qualidade do esperma, *in vivo*, em douradas-macho (*Carassius auratus L.*), sendo recolhidas amostras nos dias 10, 20 e 30 de

exposição (53). Os níveis de testosterona e de 11-cetotestosterona, assim como a motilidade do esperma diminuíram significativamente nos grupos tratados com BPA depois de 20 ou 30 dias. Observou-se também uma diminuição significativa na velocidade do esperma aos 30, 60 e 90 segundos pós-activação nos grupos tratados com BPA em todos os tempos de exposição. A vitelogenina (biomarcador que representa disfunção testicular) aumentou significativamente nos machos expostos a 11,0 µg/L no dia 30 de exposição (53). Esta experiência revelou uma diminuição na qualidade do esperma concomitante com a diminuição dos androgénios e o aumento da VTG. Assim, os resultados sugerem efeitos adversos do BPA na motilidade e velocidade do esperma através de modificações na esteroidogénese testicular (53).

Foram também investigados os efeitos directos do BPA em três enzimas esteroidogénicas: 3β-HSD, CYP17A1 e 17β-HSD3. Para tal, microsomas testiculares de humanos e de ratazanas foram expostos a várias concentrações de BPA (10^{-8} - 10^{-4} M). Este inibiu as actividades da 3β-HSD, CYP17A1 e 17β-HSD3 de humanos e ratazanas. O BPA também inibiu a produção de testosterona de forma dependente da concentração pelas células de Leydig das ratazanas. A 3β-HSD e a CYP17A1 humanas mostraram ser mais sensíveis ao BPA do que a 3β-HSD e a CYP17A1 das ratazanas (51).

Usando células de adenocarcinoma humanas H295R, Zhang *et al.* analisaram o efeito do BPA na esteroidogénese e no metabolismo do 17-β-estradiol (54). As exposições ao BPA (30 a 3000 ng/ml) diminuíram significativamente as concentrações de androstenediona, testosterona, cortisol, e cortisona. Em contraste, as concentrações de estrona e 17-β-estradiol aumentaram nas células H295R expostas ao BPA. O principal mecanismo que causou aumento do 17-β-estradiol no meio foi a inibição do seu metabolismo e não o aumento da actividade da aromatase. Estes resultados sugerem que o BPA interfere com a esteroidogénese celular nos humanos através de múltiplos mecanismos moleculares (54).

Todos os estudos anteriormente mencionados reforçam a ideia de que o BPA afecta a síntese de androgénios, ao longo das suas várias etapas, a níveis de exposição presentes no meio ambiente, e a sua presença nos produtos de consumo tem implicações na fertilidade masculina.

5.5. Relação com os Receptores de Estrogénios

Os ERs são membros de uma superfamília de proteínas de receptores nucleares que modulam a expressão de genes em consequência da ligação a um ligando. Esta ligação induz alterações conformacionais no receptor permitindo ao complexo receptor-ligando interagir com locais específicos do DNA. Uma vez ligado ao DNA, este complexo altera a expressão dos genes sensíveis ao estrogénio que alteram o crescimento e diferenciação celular. A localização dos ERs e a actividade da aromatase em todos os níveis do eixo HPG sugere o seu envolvimento na função reprodutora (55). Dois subtipos de ERs (ERα e ERβ) são conhecidos por ter um vasto padrão de distribuição tecidual. O ERα em conjunto com os receptores de androgénio tem um papel mediador no feedback de esteróides na pituitária (56).

As células de Leydig expressam ERs e estão sujeitas a acção estrogénica (55). A exposição das células de Leydig aos estrogénios inibe o seu desenvolvimento e função porque afecta a expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de androgénios (56).

A exposição de ratas a 2,4 µg/kg dia de BPA do PND 21-35 suprimiu a LH do soro e os níveis de testosterona, e o tratamento de células de Leydig adultas com 0,01 nM de BPA diminuiu a biossíntese de testosterona em 25% devido à expressão diminuída da enzima esteroidogénica CYP17A1. No mesmo estudo, o BPA diminuiu os níveis de 17β-estradiol séricos em ratas expostas a 2,4 µg, 10 µg, ou 100 mg/kg dia de BPA do PND 21-35 em resultado da sua capacidade para inibir a actividade da aromatase das células de Leydig. Por fim, exposições do GD 12 ao PND 21 diminuíram os níveis de testosterona no fluido do interstício testicular na idade adulta, sugerindo que o período perinatal é uma janela sensível de exposição ao BPA (55). Assim os dados deste estudo demonstraram que o BPA tem um efeito inibitório na esteroidogénese testicular a níveis de exposição em baixas doses, actuando presumivelmente através de ERs, enquanto também suprime a expressão do gene de aromatase e a biossíntese de 17β-estradiol (55).

Noutro estudo, demonstrou-se, *in vivo*, que a administração de 200 µg/kg bw/dia de BPA em ratas-macho adultas diminuiu significativamente a contagem de espermatozoides devido à inibição da espermiacção (57). As quebras das cadeias de DNA (DSBs) suscitam, nas células, a activação das quinases dos pontos de verificação e uma rede de resposta complexa, incluindo sensores de lesão de DNA, transdutores de sinal, e efectores, denominando-se resposta à lesão de DNA (DDR). Dois dos principais reguladores da DDR são a ataxia-telangiectasia-mutada (ATM) e a ataxia-telangiectasia e proteína relacionada com Rad 3 (ATR). Os sinais de ATM e ATR controlam as transições do ciclo celular, a replicação de DNA, reparação de DNA, e a apoptose. A ATM responde principalmente às DSBs, enquanto a ATR reage às estruturas que contêm uma só cadeia de DNA (57). A redução da contagem de esperma foi associada com uma interrupção na progressão meiótica e apoptose nas células testiculares, causada pela persistência de DSBs nas ratas-macho expostas ao BPA, e pela activação dos sinais de ATM/quinase 2 do ponto de verificação (Chk2) (57). A utilização do 17β-Estradiol, e do antagonista do ER (ICI 182780) determinaram que a sinalização do ER mediou os distúrbios reprodutivos induzidos pelo BPA (57).

Toyama e os colegas administraram subcutaneamente uma injeção de 20 ou 200 µg/kg bw de BPA a ratas e ratas adultas durante 6 dias, e os efeitos nos testículos foram investigados por microscopia (58). Eles observaram anormalidades nas espermatídes: vesículas acrossómicas, cápsulas acrossómicas, acrossomas e núcleos das espermatídes severamente deformados; e anormalidades na especialização ectoplásmica entre a célula de Sertoli e as espermatídes: especialização incompleta, especialização ectópica redundante, e aplasia (58). Uma vez que foram observados efeitos adversos semelhantes em ratas adultas tratados com β-estradiol 3-benzoato, os efeitos do BPA parecem reflectir os efeitos estrogénicos nos testículos (58). Os animais que se mantiveram por mais dois meses após a

cessação da administração demonstraram fertilidade e os seus testículos adquiriram histologia normal, indicando que os efeitos adversos eram transitórios (58).

Os resultados destes estudos demonstram que os efeitos do BPA no sistema reprodutivo masculino podem ser mediados através dos ERs, actuando nestes como agonista estrogénico, apesar de ser considerado com base na sua afinidade por estes receptores um estrogénio fraco quando comparado com os estrogénios endógenos. Deste modo, a actividade biológica do BPA não se correlaciona directamente com a sua afinidade pelos ERs.

5.6. Eixo hipotalâmico-pituitária-gonadal

Xi *et al.* utilizaram roedores como modelos para estudar os efeitos da exposição ao BPA durante os períodos perinatal e pós-natal nas funções endócrinas do eixo HPG. Foram usadas doses de 12 a 50 mg/kg bw/dia (59). Ao nível hipotalâmico-pituitária, a exposição ao BPA resultou na supra-regulação dos níveis de expressão de kisspeptina (KiSS-1), GnRH e mRNA da FSH nas crias (59). A KiSS-1 funciona como um guardião para o início da puberdade e para a regulação da expressão de genes no eixo HPG. A supra-regulação da expressão da KiSS-1 hipotalâmica estimula a síntese e libertação de GnRH e gonadotropinas no hipotálamo e hipófise, respectivamente (59). Ao nível das gónadas, o BPA causou inibição na expressão das enzimas esteroideogénicas testiculares e na síntese de testosterona nas crias masculinas (59). Os efeitos do BPA na disfunção reprodutiva deveram-se provavelmente às suas acções na esteroideogénese gonadal e consequentes libertações anómalas de hormonas esteróides endógenas. Esse efeito afectou os circuitos reguladores de feedback no eixo HPG (59).

Em outro estudo administrou-se BPA (0, 20, 100, e 200 mg/kg/dia) ou 17- β -estradiol (10 e 100 μ g/kg/dia) por via subcutânea durante 6 semanas a ratas macho pré-púberes (8). Tanto o tratamento com BPA, como o tratamento com 17- β -estradiol diminuíram os níveis de testosterona plasmática e testicular, e a LH plasmática, mas não os níveis de 17- β -estradiol e FSH, apesar do tratamento de 17- β -estradiol aumentar o seu nível plasmático. Em relação aos níveis de testosterona diminuídos, o BPA e o 17- β -estradiol diminuíram as expressões das enzimas esteroideogénicas e da proteína transportadora de colesterol nas células de Leydig. Deste modo, os níveis de testosterona diminuídos no plasma devem ter resultado das expressões diminuídas dessas enzimas e proteína, assim como dos níveis de LH plasmático diminuídos (8). As alterações nas enzimas esteroideogénicas e na proteína transportadora foram observadas a níveis mais baixos de exposição ao BPA ou ao 17- β -estradiol do que aqueles inibindo os níveis de LH plasmático (8). Microscopicamente, 200 mg/kg de BPA e 100 μ g/kg de 17- β -estradiol diminuíram significativamente os números de células de Leydig nos testículos. Além disso o BPA e o 17- β -estradiol também diminuíram a expressão do mRNA do ER α , que pode estar relacionado à diminuição do número de células de Leydig (8). Assim, o BPA afecta directamente não só as células de Leydig como também a pituitária (mecanismo semelhante ao do 17- β -estradiol), mas as primeiras podem ser prejudicadas a concentrações de exposição mais baixas do que a última, sendo portanto mais vulneráveis ao BPA (8).

Estes estudos põem em evidência que o BPA pode interferir nos vários níveis do eixo HPG e assim diminuir a fertilidade masculina.

5.7. Efeito mutagénico e espermatogénese

Tiwari e colegas investigaram os efeitos do BPA nos vários estágios de desenvolvimento das células germinativas na espermatogénese. Eles alimentaram ratas macho com BPA (10 µg e 5,0 mg/kg bw) através de sonda gástrica durante 6 dias, e posteriormente cada macho coabitou com fêmeas não tratadas durante 8 semanas (60). Os resultados revelaram que a exposição ao BPA (5,0 mg/kg bw) causou efeitos adversos nas células germinativas durante a espermatogénese. Houve aumento na percentagem da perda pós-implantação e na taxa da mutação letal dominante durante a 4^a e a 6^a semana, indicando sensibilidade das espermátides e dos espermátócitos (60). A lesão do DNA induzida no estágio de espermátides e de espermátócitos acumulou-se no esperma fertilizante e foi transmitida ao embrião, constituindo uma das razões para a perda pós-implantação (60). Observou-se também diminuição na produção diária de esperma testicular, na contagem de esperma epididimário e nos parâmetros de motilidade, sugerindo que a exposição ao BPA prejudica a fertilidade nas ratas (60).

Noutro trabalho foi implantado subcutaneamente um tubo de silicone de libertação lenta revestido com 10 ng, 500 ng, 1 µg, ou 10 µg de 17 β-Estradiol, ou 100 µg ou 5 mg de BPA em ratas-fêmeas antes do acasalamento. O tubo foi mantido ao longo da gravidez e da lactação, até as crias desmamarem às 4 semanas de idade. Durante este período, o 17 β-Estradiol foi libertado do tubo a 120 pg ou 6, 12 ou 120 ng/dia, e o BPA a 1,2 ou 60 µg/dia (61). A maioria dos animais que tinham um tubo de 1 µg e 10 µg de 17 β-Estradiol não mantiveram a sua gravidez. Contudo, os outros grupos exibiram altas taxas de nascimentos (mais de 70%) (61). Às 4 semanas, as crias masculinas foram mortas e os resultados mostraram que o bw e o peso dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimos e glândulas reprodutivas acessórias) nos grupos tratados não diferiram dos valores do grupo de controlo. No entanto, a percentagem de túbulos seminíferos nos testículos com espermátides maduras era significativamente inferior nos grupos que tinham o tubo de 10 ng e 500 ng de 17 β-Estradiol e 5 mg de BPA em relação ao grupo de controlo. Assim, a exposição crónica ao 17 β-Estradiol e ao BPA pode interromper a espermatogénese nas crias masculinas (61).

Por seu lado, Furuya *et al.* administraram oralmente várias doses de BPA (2 µg a 200 µg/kg) a pintos-macho desde as 2 semanas de idade, tendo procedido à análise das cristas, barbelas e testículos às 5, 10, 15, 20 e 25 semanas de idade (62). Os seus resultados apesar de não mostrarem diferenças significativas no bw entre as aves, demonstraram que o crescimento dos órgãos supracitados foi significativamente afectado. Esses efeitos inibitórios eram dose-dependentes (62). Histologicamente, o crescimento dos testículos foi negativamente afectado pela exposição acima de 20 µg/kg de BPA: nomeadamente, o desenvolvimento dos túbulos seminíferos e a espermatogénese foram severamente inibidos. As expressões do mRNA do ERα e do gene da aromatase aumentaram nos testículos de forma

dose-dependente após a administração de BPA. Assim, ficou demonstrado que doses baixas de BPA atrasam o crescimento do fenótipo do galo quer por efeito directo ou por resposta indirecta resultando num aumento dos níveis de estrogénio endógeno e hipersensibilidade ao estrogénio (62).

Tendo por base estes estudos pode-se afirmar que o BPA actua como mutagénio nas células germinativas masculinas, prejudicando a espermatogénese e por conseguinte a fertilidade masculina.

5.8. Outros Efeitos do Bisfenol A

Num estudo desenvolvido com o intuito de esclarecer se o tratamento crónico com BPA durante o período perinatal alterava o comportamento sexual na idade adulta, se o efeito era dose-dependente, e se a experiência sexual atenuava quaisquer défices iniciais no desempenho sexual, administrou-se BPA diariamente a ratas fêmeas prenhas durante a gestação e a lactação, e quantificaram-se os comportamentos sexuais (apetite sexual e consumação) da descendência masculina e feminina resultante ao longo de múltiplos encontros sexuais na idade adulta (63). Os machos que receberam uma dose baixa de BPA (50 µg/kg bw/dia) durante o período perinatal mostraram défices persistentes no comportamento sexual na idade adulta. Contudo, os machos que receberam uma dose elevada (5 mg/kg bw/dia) eram indistinguíveis dos controlos em relação aos comportamentos sexuais consumatórios, apresentando, no entanto, latências diminuídas para se envolverem nesses comportamentos quando inexperientes sexualmente com relações dose-resposta não lineares. O comportamento sexual feminino não foi afectado pela administração de BPA precocemente nas doses testadas (63). Estes resultados mostram que o BPA exerce efeitos comportamentais especialmente em doses baixas e pode causar prejuízo de longa duração do comportamento sexual nos machos. O desempenho sexual adulto foi prejudicado em animais experienciados sexualmente após exposição ao BPA durante o período perinatal (63).

Noutra experiência investigaram-se os efeitos do BPA na motilidade e velocidade do esperma na perca (*Perca fluviatilis L.*). Para esse efeito foi colhido separadamente esperma de cinco machos maduros, sendo as amostras posteriormente diluídas numa solução imobilizadora (340mOsmol kg⁻¹) (64). A motilidade do esperma foi accionada numa solução de activação contendo diferentes concentrações de BPA (2; 1,5; 1,25; 1,0; 0,5; 0,25; 0,12 e 0,0 mM). Aos 15 s pós-activação, a motilidade e velocidade do esperma diminuíram significativamente no meio de activação contendo 1,5 e 1 mM de BPA, respectivamente. Na concentração de 2 mM de BPA, a motilidade do esperma estava totalmente inibida. A duração da motilidade do esperma diminuiu com concentrações de BPA crescentes (64). Enquanto no grupo de controlo 25,3% dos espermatozóides aos 90 s pós-activação eram ainda móveis, no grupo exposto à concentração de 0,12 mM de BPA tal só acontecia em 1,3% dos espermatozóides. No entanto, a velocidade do esperma era elevada no meio de activação contendo 0,12 mM de BPA aos 15 s pós-activação. Os resultados deste estudo indicam que o BPA diminui a motilidade e velocidade do esperma exposto, *in vitro*. O BPA também pode

danificar os flagelos, na medida em que foram observados flagelos em forma de “C” após o período de motilidade das células do esperma ter terminado (64).

As junções entre as células de Sertoli (junções de aderência (AJ), junções de comunicação (GJ) e TJ) são importantes para manter a espermatogénese. As conexinas (Cx) são proteínas de GJ presentes nos testículos. Entre elas, a mais predominante é a Cx43, que desempenha um papel essencial na espermatogénese. As TJ da célula de Sertoli são as constituintes principais da especialização ectoplásmica basal e criam a BTB, que providencia um nicho especializado para o desenvolvimento das células germinativas. A superfamília caderina (N-caderina, E-caderina) também contribui significativamente para a maturação das células germinativas e é um dos membros essenciais das AJ. Perturbações nestas proteínas de junção das células de Sertoli (SCJPs) estão associadas a prejuízos na espermatogénese (65). Assim, Salian e os colaboradores, num dos seus trabalhos, injectaram subcutaneamente BPA a ratazanas-macho em doses que variaram de 0,6 a 10 µg/ratazana (100-1600 µg/kg bw de BPA) nos PNDs 1-5, e o DES foi usado como controlo positivo. A fertilidade masculina foi avaliada durante a idade adulta, e foi levada a cabo a localização imuno-histoquímica para a Cx-43, Zona Ocludina-1 (ZO-1, TJ) e N-caderina em secções de tecido testicular obtidas nos PNDs 15, 30, 45 e 90 das ratazanas expostas à dose mais baixa de BPA que prejudicou a fertilidade (65). As fêmeas que acasalaram com ratazanas-macho expostas durante o período neonatal ao BPA mostraram um aumento significativo na perda pós-implantação e uma diminuição no tamanho da ninhada. Também ocorreram alterações significativas na contagem dos espermatozoides juntamente com desequilíbrios hormonais nas ratazanas expostas durante o período neonatal ao BPA. Por último, foi observada uma redução significativa na expressão de Cx-43 e aumento na expressão de N-caderina e ZO-1 nos testículos das ratazanas expostas durante o período neonatal a uma dose efectiva de BPA (65). A exposição das ratazanas ao BPA durante o período neonatal diminui a sua fertilidade e tem potencial para induzir perturbações nas SCJPs. Estas perturbações podem ser um dos factores contribuintes que prejudicam a espermatogénese nos animais expostos (65).

5.9. Estudos em Humanos

Num estudo de caso-controlo em que 877 homens com infertilidade idiopática foram comparados com 713 homens férteis (grupo de controlo) em relação aos níveis urinários de BPA e aos parâmetros do sémen, não foi encontrada uma associação significativa entre a exposição ao BPA e a infertilidade masculina idiopática (32).

Noutro trabalho, mediram-se os níveis activos de BPA não conjugado (uBPA) no sangue do cordão umbilical de 152 rapazes que nasceram após 34 semanas de gestação, e que apresentavam criptorquidia ou, por outro lado, testículos descendentes (66). O uBPA activo foi detectado em todas as amostras de sangue do cordão umbilical sugerindo que há transferência através da placenta e exposição fetal. No entanto, os níveis semelhantes de uBPA encontrados nos grupos de controlo e de criptorquidia tornam improvável a participação da exposição fetal ao uBPA na fisiopatologia dos testículos não descendentes (66).

Por seu lado, Meeker e a sua equipa numa outra investigação mediram as concentrações de BPA urinário e os níveis das hormonas tiroideias e reprodutivas no soro de 167 homens recrutados através de uma clínica de infertilidade. O BPA foi detectado em 89% das amostras de urina com uma mediana de 1,3 ng/mL. As concentrações de BPA na urina que foi recolhida no mesmo dia da amostra de sangue estavam inversamente associadas com os níveis no soro de inibina B, assim como com a razão estradiol:testosterona, e positivamente associadas com a FSH e a razão FSH:inibina B (67). A FSH e a inibina B são duas hormonas altamente preditivas da qualidade do sémen, sendo que níveis elevados de FSH e/ou níveis reduzidos de inibina B estão associados com pobre qualidade do sémen. Assim, o BPA pode estar associado a efeitos adversos nas células de Sertoli ou nos seus receptores de FSH para alterar a produção de inibina B. Isto por sua vez, através da redução do feedback negativo da inibina B leva ao aumento da produção e secreção de FSH pituitário, resultando em reduzida qualidade do sémen (67). A redução na razão estradiol:testosterona provavelmente reflecte a diminuição da actividade da aromatase, uma vez que o estradiol é produzido através da aromatização da testosterona. Outra explicação alternativa pode estar ligada a efeitos diferentes da exposição ao BPA no metabolismo da testosterona e do estradiol (67). Foram também observadas relações inversas entre o BPA urinário e o índice de androgénio livre (razão da testosterona para a globulina de ligação a hormonas sexuais), estradiol e hormona estimuladora da tiróide. Todos estes resultados sugeriram que a exposição ao BPA poderia estar associada com alterações nos níveis de hormonas circulantes nos homens (67).

Num segundo estudo conduzido pela mesma equipa de investigadores foi avaliada a relação entre a concentração de BPA urinário (marcador da exposição ao BPA), a qualidade do sémen e a lesão de DNA do esperma em 190 homens recrutados através de uma clínica de infertilidade (68). O BPA foi detectado em 89% das amostras, com uma concentração mediana de 1,3 ng/ml. A concentração de BPA urinária foi associada com probabilidade ligeiramente elevada, embora não estatisticamente significativa, de concentração de esperma, motilidade, e morfologia abaixo dos valores de referência. Quando modeladas como variáveis dependentes contínuas, o aumento na concentração de BPA urinário esteve associado a diminuição na concentração de esperma, motilidade, e morfologia de 23%, 7,5% e 13%, respectivamente, em conjunto com um aumento de 10% na lesão de DNA do esperma (68). Em conclusão, o BPA urinário pode estar associado com diminuição da qualidade do sémen e aumento da lesão do DNA do esperma, mas são necessários estudos de confirmação (68).

Li *et al.* conduziram um estudo entre 427 homens trabalhadores em regiões onde existem níveis elevados de exposição ao BPA. Todos os participantes forneceram amostras de urina, que foram testadas para concentração de BPA, e a disfunção sexual masculina foi averiguada usando inventários de função sexual masculina standardizados (11). A disfunção sexual masculina foi medida em 4 domínios (desejo sexual, função erétil, função orgásmica, satisfação global com a vida sexual) usando 7 índices (nível de condução sexual, capacidade para ter uma erecção, capacidade para ter uma erecção suficiente forte para a penetração, nível de dificuldade em ter uma erecção, nível de dificuldade de ejacular, nível de força de

ejaculação, nível de satisfação) (11). O aumento do nível de BPA urinário foi associado com agravamento da função sexual masculina. Todos os 7 índices demonstraram esta correlação linear negativa. O aumento do nível de BPA urinário foi associado com diminuição do desejo sexual, maior dificuldade em ter uma erecção, diminuição da força de ejaculação, e diminuição do nível de satisfação global com a vida sexual. Uma correlação negativa semelhante foi também observada entre participantes expostos ao BPA a partir de apenas fontes ambientais (não houve exposição ocupacional ao BPA) (11). Em conclusão este estudo evidenciou uma correlação entre os níveis de BPA urinários aumentados e a diminuição da função sexual masculina (11).

Numa outra investigação foi analisado o efeito da exposição ocupacional ao BPA no risco de disfunção sexual masculina. Foram recrutados trabalhadores de fábricas expostos ao BPA e não expostos ao BPA (grupo de controlo). Os trabalhadores expostos tinham elevados níveis de BPA no seu local de trabalho. A função sexual masculina foi averiguada através de entrevistas pessoais usando um inventário da função sexual masculina standardizado (69). No final constatou-se que os trabalhadores expostos ao BPA tinham consistentemente elevado risco de disfunção sexual masculina em todos os domínios da função sexual masculina comparativamente aos trabalhadores não expostos. Os trabalhadores expostos tinham um elevado risco significativo de desejo sexual reduzido, dificuldade erétil, dificuldade de ejaculação, e reduzida satisfação com a vida sexual. Foi observada uma relação de dose-resposta de um elevado nível de exposição cumulativa ao BPA estar associada a um elevado risco de disfunção sexual. Além disso, comparados com os trabalhadores não expostos, os trabalhadores expostos ao BPA relataram frequências significativamente elevadas de função sexual reduzida após um ano de emprego nas fábricas expostas ao BPA (69). O BPA tem efeitos estrogénicos e antiandrogénicos. Ele actua como um antagonista do receptor de androgénio interrompendo a interacção entre o receptor de androgénio e os androgénios endógenos. Isso pode perturbar as funções sexuais masculinas normais incluindo a libido e as funções erétil e orgásmica. Além disso, o BPA interfere com a função das células de Leydig resultando na redução da biossíntese de testosterona, e afecta adversamente vários tecidos e estruturas celulares dos órgãos sexuais masculinos através de diversos mecanismos (69). Com este estudo concluiu-se que a exposição ao BPA no local de trabalho pode ter um efeito adverso na função sexual masculina (69).

Por seu lado Galloway e os seus colaboradores conduziram uma análise transversal utilizando dados do Estudo InCHIANTI, um estudo prospectivo baseado na população de adultos italianos. Foram incluídos 715 adultos entre os 20 e os 74 anos de idade, e as concentrações de BPA foram medidas em amostras de urina de 24 horas. As principais medidas de resultado foram as concentrações séricas da testosterona total e do 17 β -estradiol (70). A média geométrica da concentração de BPA foi 3,59 ng/mL, e a excreção média foi 5,63 μ g/dia. Foram encontradas elevadas taxas de excreção entre os homens, os entrevistados mais jovens, e naqueles com perímetro de cintura e peso aumentados. A elevada excreção diária de BPA foi associada a elevadas concentrações de testosterona total

em homens. Não foram encontradas associações com outras medidas séricas. Também não foram encontradas associações com os resultados primários entre as mulheres, mas foi encontrada uma associação entre o BPA e as concentrações de globulina de ligação a hormonas sexuais nas 60 mulheres pré-menopáusicas (70). Possíveis explicações para o achado do aumento da testosterona total incluem a redução da actividade da aromatase, que levaria a uma diminuição na conversão de testosterona a estradiol. Uma vez que o BPA tem mostrado possuir actividade antiandrogénica, uma explicação alternativa seria que o bloqueio dos locais de ligação do androgénio alteraria os mecanismos de controlo de feedback levando a um aumento na testosterona circulante. Por outro lado, esse achado poderia dever-se aos diferentes efeitos do BPA no metabolismo da testosterona e do estrogénio (70).

Investigaram-se também as relações entre a exposição ao BPA ambiental e os parâmetros reprodutivos, incluindo a qualidade do sémen e as hormonas reprodutivas masculinas, de modo prospectivo em homens férteis. Os participantes (n=375) dessa experiência eram parceiros de mulheres grávidas que participaram no “Estudo para Famílias Futuras” em quatro cidades dos Estados Unidos da América, e todos os homens forneceram amostras de sangue, sémen, e urina (10). O BPA foi medido na urina, e as amostras de soro foram analisadas em relação às hormonas reprodutivas, incluindo FSH, LH, testosterona, inibina B, estradiol, e globulina de ligação a hormonas sexuais, assim como em relação ao índice de androgénio livre (10). Após vários ajustamentos não foram observadas associações significativas entre qualquer parâmetro de sémen e concentração de BPA urinário. Contudo, foi encontrada uma associação inversa significativa entre a concentração de BPA urinário e os níveis de índice de androgénio livre e a razão índice de androgénio livre /LH. Foi também encontrada uma associação positiva significativa entre o BPA e a globulina de ligação a hormonas sexuais (10). Os níveis de índice de androgénio livre são um dos marcadores da testosterona activa biologicamente (10). A acção do androgénio baixa a globulina de ligação a hormonas sexuais no soro enquanto a acção do estrogénio a aumenta. O aumento nos níveis de globulina de ligação a hormonas sexuais pode ser resultado directo da acção estrogénica do BPA. Por outro lado, é possível que o BPA diminua a acção do androgénio através da diminuição da produção de esteróide mediada pelo ER (10). O eixo HPG também pode ser afectado pelo BPA, não apresentando mecanismos compensatórios de LH ou FSH aumentados. Alternativamente, como não há alterações na testosterona com o BPA, isto sugere que o sinal é insuficiente para accionar o mecanismo de feedback para o hipotálamo e pituitária (10). Estes resultados sugerem que, em homens férteis, a exposição a níveis ambientais baixos de BPA podem estar associados a uma modesta redução nos marcadores de testosterona livre, mas quaisquer efeitos na função reprodutiva são provavelmente pequenos, e de significância clínica incerta (10). No entanto, como a espermatogénese leva vários dias, pode ser difícil avaliar uma clara associação entre os parâmetros do sémen e as relativamente baixas e crónicas concentrações de BPA urinário (10).

Os estudos que analisaram os efeitos da exposição humana ao BPA, apesar de algumas controvérsias, demonstram que este último provavelmente altera os níveis das hormonas

circulatórias, a qualidade do sêmen, aumenta a lesão no DNA e diminui a função sexual masculina, sendo portanto importante a sua erradicação do meio ambiente, com o fim de preservar a fertilidade masculina.

6. Considerações sobre os estudos em humanos e animais

O BPA é apenas um dos muitos EDs a que nós estamos expostos diariamente, e a possibilidade de efeitos aditivos e sinérgicos do BPA com outros compostos EDs prevalentes não devem ser negligenciados (9). Apesar de muito ser conhecido acerca de alguns dos produtos que contêm BPA, nem todas as possíveis fontes de contacto com o químico foram identificadas, e pouco é conhecido acerca das contribuições relativas dessas fontes nos níveis globais de exposição (23). A exposição humana ao BPA é superior à estimada a partir das fontes de exposição conhecidas, e ocorre através de múltiplas vias, tornando a resposta metabólica diferente daquela observada em modelos animais (26).

É também relevante referir que os estudos de dose elevada aguda não reflectem a situação nos humanos, onde a exposição é mais provavelmente crónica e de baixo nível. Assim, são necessários mais estudos de exposição crónica, de baixa dose ao BPA em modelos animais e humanos (26). Além disso, os estudos laboratoriais geralmente focam-se num único químico em doses estáveis, e nos sistemas naturais, pode haver exposição a muitos químicos de uma só vez e as doses podem flutuar (28).

Um problema geral com a interpretação dos resultados nos níveis sanguíneos e urinários do BPA é contaminação de fundo das amostras com BPA, que pode interferir com a quantificação a baixas concentrações. Há estudos que relataram contaminação de reagentes ou solventes com BPA ou a libertação de BPA dos materiais usados para o processamento, análise e armazenamento de amostras (30). É necessária também uma rápida refrigeração das amostras imediatamente após a sua colheita, caso contrário, os conjugados de BPA hidrolisarão espontaneamente para formar BPA na urina humana (e provavelmente no soro) (30).

Há inconsistências em relação ao que se constitui ser um nível seguro de exposição ao BPA. A concordância entre as agências federais e os investigadores é essencial para claramente se definir e publicar o nível de exposição humana diária que constitui risco. Até que haja acordo de regulamentação na segurança do BPA, a exposição deve ser limitada em populações vulneráveis como bebés, crianças, e mulheres grávidas (29).

A maioria da regulação existente visa os materiais e embalagens em contacto com a comida, mas o risco de exposição ambiental ao BPA também necessita de ser avaliado. Apesar de quase um terço e um quarto da produção mundial de BPA ocorrer nos Estados Unidos e na União Europeia, respectivamente, o BPA libertado para o meio ambiente não está devidamente regulado. O Canadá é actualmente o único país que regula o destino ambiental do BPA (28).

Se as tendências actuais continuarem, a produção e libertação ambiental de BPA aumentarão na ausência de nova regulação. Existem alternativas ao BPA, contudo, não há uma única solução de substituição para todas as suas aplicações industriais (28).

A União Europeia proibiu o fabrico de biberões de policarbonato com BPA desde 1 de Março de 2011, e banuiu a sua importação e venda a 1 de Junho de 2011 (24). Apesar de algumas autoridades reguladoras por todo o mundo questionarem alguns dos estudos de baixa dose em animais, as evidências mostram uma possível ligação entre a exposição ao BPA e os efeitos observados na saúde humana (24).

7. Conclusão

Os dados recolhidos neste trabalho permitem concluir que o BPA pode afectar a espermatogénese e as propriedades do esperma, contribuindo de forma significativa para a diminuição da fertilidade masculina.

São muitas as evidências científicas que demonstram os efeitos adversos do BPA nos diversos aspectos da anatomia e fisiologia da função reprodutiva masculina (Figura 7), nomeadamente através da indução de stress oxidativo, apoptose excessiva, alterações de longa duração na fertilidade masculina e transmissão às gerações subsequentes, afecção da síntese de androgénios ao longo das suas várias etapas, interferência nos vários níveis do eixo HPG, actuação como agonista estrogénico nos ERs e mutagénio nas células germinativas masculinas, perturbações nas SCJPs, entre outros.

Os estudos em humanos sugerem que a exposição ao BPA está associada a alterações dos níveis hormonais nos homens, diminuição da qualidade do esperma, e aumento da lesão do DNA do esperma, e quando esta ocorre no local de trabalho a função sexual masculina é significativamente afectada. No entanto, é necessário que se realizem mais estudos em humanos para se estabelecerem com maior precisão os seus efeitos adversos, e averiguar se os achados encontrados nos estudos *in vitro* e com modelos animais expostos ao BPA se verificam com o mesmo grau de intensidade nos humanos.

As controvérsias encontradas em alguns dos estudos revistos prendem-se sobretudo com as múltiplas metodologias usadas, os diferentes níveis e concentrações analisadas, os tempos de exposição variados, e ao facto de alguns resultados obtidos serem qualitativos, e portanto com algum grau de subjectividade. Deste modo, é importante a realização de estudos com maior grau de homogeneidade, permitindo a obtenção de dados mais consistentes e fiáveis, revelando assim, a real influência da exposição ao BPA na fertilidade masculina.

Tendo em conta a produção em larga escala de BPA, a sua presença universal no nosso dia quotidiano, e a comprovada redução da fertilidade masculina é aconselhável a tomada de medidas, que visem a sua substituição por componentes inócuos para a saúde humana, bem como a restrição da sua utilização com regras bem definidas sobre os níveis de exposição.

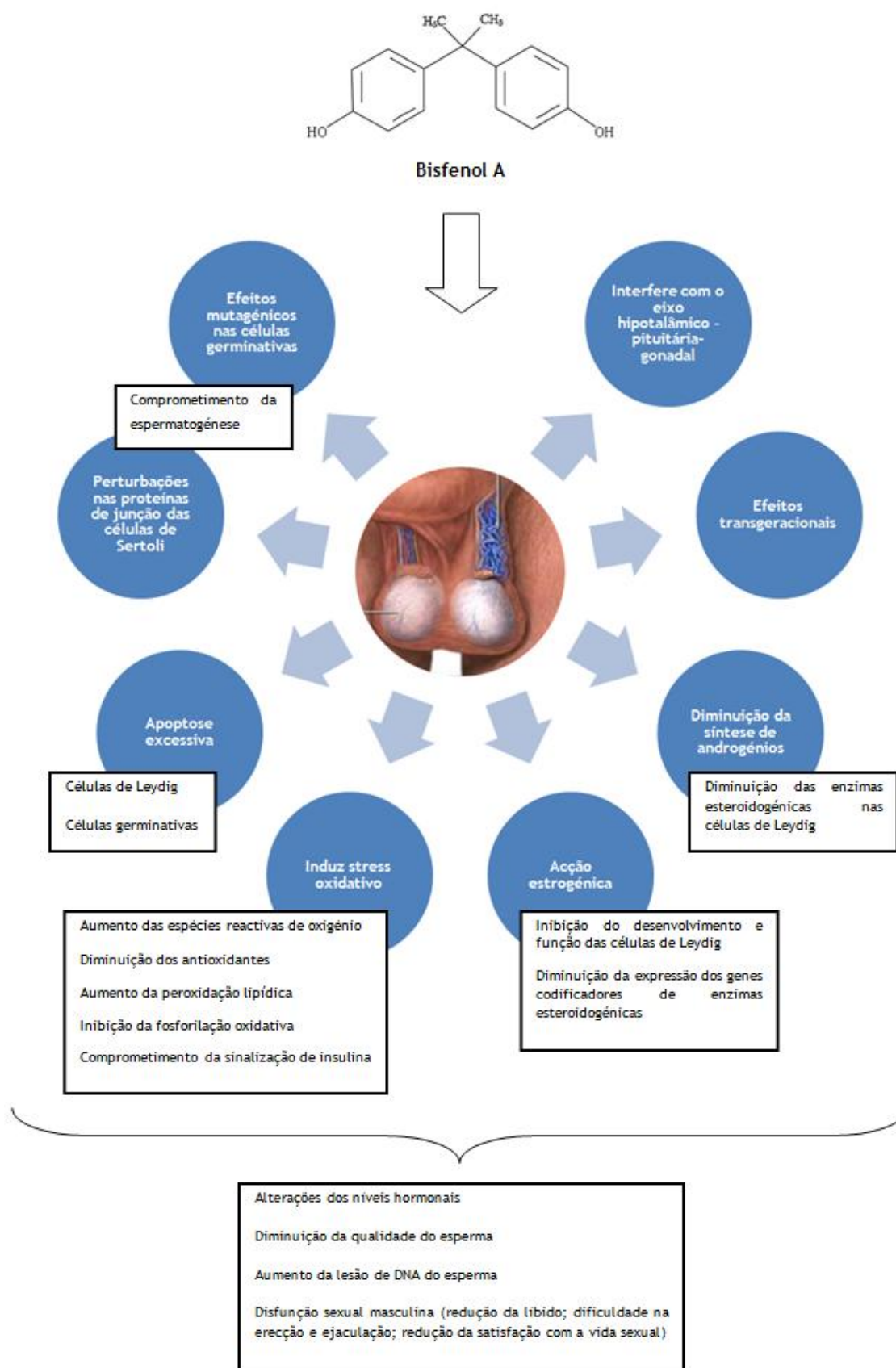


Figura 7 - Resumo do efeito do BPA na função testicular e reprodutiva.

8. Bibliografia

- (1) Wong EW, Cheng CY. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci.* 2011 May;32(5):290-9.
- (2) Lee HD, Lee HS, Park SH, Jo DG, Choe JH, Lee JS, Seo JT. Causes and classification of male infertility in Korea. *Clin Exp Reprod Med.* 2012 Dec;39(4):172-5.
- (3) Lagos-Cabré R, Moreno RD. Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biol Res.* 2012;45(1):5-14.
- (4) Bonde JP. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian J Androl.* 2010 Mar;12(2):152-6.
- (5) Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 11ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2006. 1115 pp.
- (6) Salian S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring--an overview. *Reprod Toxicol.* 2011 Apr;31(3):359-62.
- (7) Xi W, Wan HT, Zhao YG, Wong MH, Giesy JP, Wong CK. Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2011 Aug;19(7):2515-27.
- (8) Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Li C, Taya K, Zhang SY, Naito H, Ramdhan DH, Kamijima M, Nakajima T. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett.* 2010 Apr 15;194(1-2):16-25.
- (9) Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011 Oct;127(1-2):27-34.
- (10) Mendiola J, Jørgensen N, Andersson AM, Calafat AM, Ye X, Redmon JB, Drobnis EZ, Wang C, Sparks A, Thurston SW, Liu F, Swan SH. Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect.* 2010 Sep;118(9):1286-91.

- (11) Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Qing D, Wu T, Wang J, Weng X, Ferber J, Herrinton LJ, Zhu Q, Gao E, Yuan W. Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. *J Androl.* 2010 Sep-Oct;31(5):500-6.
- (12) Sharpe RM. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br Med Bull.* 2000;56(3):630-42.
- (13) Van De Graaff KM. *Human Anatomy.* 6th edition. Boston: McGraw-Hill; 2002. 840 pp.
- (14) Moore KL, Dalley AF. *Anatomia Orientada para a Clínica.* 4^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 1021pp.
- (15) Saladin KS. *Anatomy and Physiology: The Unit of Form and Function.* 3rd edition. New York: McGraw-Hill; 2003. 1120 pp.
- (16) Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. *Medicina Interna de Harrison.* 18^a edição. Porto Alegre: AMGH; 2013. 3610 pp.
- (17) Pocock G, Richards CD. *Human Physiology: The Basis of Medicine.* Oxford: Oxford University; 1999. 627 pp.
- (18) Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Physiology.* 4th edition. St. Louis: Mosby; 1998. 1131 pp.
- (19) Seeley RR, Stephens TD, Tate P. *Anatomia & fisiologia.* 6^a edição. Loures: Lusociência; 2005. 1118 pp.
- (20) O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis.* 2011 Jan;1(1):14-35.
- (21) McGeown JG. *Physiology: A clinical core text of human physiology with self-assessment.* 2nd edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002. 263 pp.
- (22) Vander A, Sherman J, Luciano D. *Human physiology: the mechanisms of body function.* 8th edition. Boston: McGraw-Hill; 2001. 800 pp.
- (23) Vandenberg LN. Exposure to bisphenol A in Canada: invoking the precautionary principle. *CMAJ.* 2011 Aug 9;183(11):1265-70.

- (24) Huang YQ, Wong CK, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, Neretin L, Wong MH. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int.* 2012 Jul;42:91-9.
- (25) Tsai WT. Human health risk on environmental exposure to Bisphenol-A: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2006;24(2):225-55.
- (26) Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol.* 2007 Aug-Sep;24(2):139-77.
- (27) Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, Wollenberger L, Santos EM, Paull GC, Van Look KJ, Tyler CR. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 Jul 27;364(1526):2047-62.
- (28) Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage.* 2012 Aug 15;104:19-34.
- (29) Erler C, Novak J. Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *J Pediatr Nurs.* 2010 Oct;25(5):400-7.
- (30) Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Apr 1;228(1):114-34.
- (31) Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F. Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *Ann Endocrinol (Paris).* 2013 Jul;74(3):211-20.
- (32) Chen M, Tang R, Fu G, Xu B, Zhu P, Qiao S, Chen X, Xu B, Qin Y, Lu C, Hang B, Xia Y, Wang X. Association of exposure to phenols and idiopathic male infertility. *J Hazard Mater.* 2013 Apr 15;250-251:115-21.
- (33) Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007 Sep-Oct;33(5):603-21.
- (34) Mahanta R, Gogoi A, Chaudhury PN, Roy S, Bhattacharyya IK, Sharma P. Association of oxidative stress biomarkers and antioxidant enzymatic activity in male infertility of north-East India. *J Obstet Gynaecol India.* 2012 Oct;62(5):546-50.

- (35) Hulak M, Gazo I, Shaliutina A, Linhartova P. In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2013 Aug;158(2):64-71.
- (36) Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Jan;59(1):2-11.
- (37) Wu HJ, Liu C, Duan WX, Xu SC, He MD, Chen CH, Wang Y, Zhou Z, Yu ZP, Zhang L, Chen Y. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. *Mutat Res*. 2013 Apr 15;752(1-2):57-67.
- (38) D'Cruz SC, Jubendradass R, Jayakanthan M, Rani SJ, Mathur PP. Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: an in vivo and in silico study. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar;50(3-4):1124-33.
- (39) Anjum S, Rahman S, Kaur M, Ahmad F, Rashid H, Ansari RA, Raisuddin S. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of mouse. *Food Chem Toxicol*. 2011 Nov;49(11):2849-54.
- (40) Chen M, Xu B, Ji W, Qiao S, Hu N, Hu Y, Wu W, Qiu L, Zhang R, Wang Y, Wang S, Zhou Z, Xia Y, Wang X. Bisphenol A alters n-6 fatty acid composition and decreases antioxidant enzyme levels in rat testes: a LC-QTOF-based metabolomics study. *PLoS One*. 2012;7(9):e44754.
- (41) Li YJ, Song TB, Cai YY, Zhou JS, Song X, Zhao X, Wu XL. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci*. 2009 Apr;108(2):427-36.
- (42) Wang Q, Zhao XF, Ji YL, Wang H, Liu P, Zhang C, Zhang Y, Xu DX. Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Lett*. 2010 Nov 30;199(2):129-35.
- (43) Jin P, Wang X, Chang F, Bai Y, Li Y, Zhou R, Chen L. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *J Biomed Res*. 2013 Mar;27(2):135-44.
- (44) Salian S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci*. 2009 Nov 18;85(21-22):742-52.

- (45) Kobayashi K, Kubota H, Ohtani K, Hojo R, Miyagawa M. Lack of effects for dietary exposure of bisphenol A during in utero and lactational periods on reproductive development in rat offspring. *J Toxicol Sci.* 2012;37(3):565-73.
- (46) LaRocca J, Boyajian A, Brown C, Smith SD, Hixon M. Effects of in utero exposure to Bisphenol A or diethylstilbestrol on the adult male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2011 Dec;92(6):526-33.
- (47) Salian S, Doshi T, Vanage G. Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life Sci.* 2009 Jul 3;85(1-2):11-8.
- (48) N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud'homme SM, Pozzi-Gaudin S, Frydman R, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V, Habert R. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One.* 2012;7(12):e51579.
- (49) Ye L, Su ZJ, Ge RS. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules.* 2011 Dec 2;16(12):9983-10001.
- (50) Qiu LL, Wang X, Zhang XH, Zhang Z, Gu J, Liu L, Wang Y, Wang X, Wang SL. Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A. *Toxicol Lett.* 2013 May 23;219(2):116-24.
- (51) Ye L, Zhao B, Hu G, Chu Y, Ge RS. Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol Lett.* 2011 Nov 30;207(2):137-42.
- (52) Nanjappa MK, Simon L, Akingbemi BT. The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biol Reprod.* 2012 May 3;86(5):135, 1-12.
- (53) Hatef A, Alavi SM, Abdulfatah A, Fontaine P, Rodina M, Linhart O. Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012 Feb;76(2):56-62.
- (54) Zhang X, Chang H, Wiseman S, He Y, Higley E, Jones P, Wong CK, Al-Khedhairi A, Giesy JP, Hecker M. Bisphenol A disrupts steroidogenesis in human H295R cells. *Toxicol Sci.* 2011 Jun;121(2):320-7.

- (55) Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):592-603.
- (56) Akingbemi BT, Ge R, Rosenfeld CS, Newton LG, Hardy DO, Catterall JF, Lubahn DB, Korach KS, Hardy MP. Estrogen receptor-alpha gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. *Endocrinology*. 2003 Jan;144(1):84-93.
- (57) Liu C, Duan W, Li R, Xu S, Zhang L, Chen C, He M, Lu Y, Wu H, Pi H, Luo X, Zhang Y, Zhong M, Yu Z, Zhou Z. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death Dis*. 2013 Jun 20;4:e676.
- (58) Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol*. 2004 Nov;67(4):373-81.
- (59) Xi W, Lee CK, Yeung WS, Giesy JP, Wong MH, Zhang X, Hecker M, Wong CK. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol*. 2011 May;31(4):409-17.
- (60) Tiwari D, Vanage G. Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reprod Toxicol*. 2013 Sep;40:60-8.
- (61) Okada A, Kai O. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J Androl*. 2008 Mar;10(2):271-6.
- (62) Furuya M, Adachi K, Kuwahara S, Ogawa K, Tsukamoto Y. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A. *Life Sci*. 2006 Mar 6;78(15):1767-76.
- (63) Jones BA, Shimell JJ, Watson NV. Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Horm Behav*. 2011 Feb;59(2):246-51.
- (64) Hatef A, Alavi SMH, Linhartova Z, Rodina M, Policar T, Linhart O. In vitro effects of Bisphenol A on sperm motility characteristics in *Perca fluviatilis* L. (Percidae; Teleostei). *J Appl Ichthyol*. 2010;26(5):696-701.

- (65) 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*. 2009 Nov 9;265(1-2):56-67.
- (66) Fénichel P, Déchaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, Pacini P, Wagner-Mahler K, Pugeat M, Brucker-Davis F. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Hum Reprod*. 2012 Apr;27(4):983-90.
- (67) Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol*. 2010 Feb 15;44(4):1458-63.
- (68) Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, Ye X, Hauser R. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol*. 2010 Dec;30(4):532-9.
- (69) Li D, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, Wang J, Weng X, Ferber JR, Herrinton LJ, Zhu Q, Gao E, Checkoway H, Yuan W. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod*. 2010 Feb;25(2):519-27.
- (70) Galloway T, Cipelli R, Guralnik J, Ferrucci L, Bandinelli S, Corsi AM, Money C, McCormack P, Melzer D. Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environ Health Perspect*. 2010 Nov;118(11):1603-8.