

Andreia Gomes Freitas Friques

**Contaminação por Bisfenol A (BPA) na infância:
alterações cardiovasculares e o papel protetor do
kefir**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Vitória

2019

Andreia Gomes Freitas Friques

**Contaminação por Bisfenol A (BPA) na infância:
alterações cardiovasculares moleculares, estruturais,
fisiológicas e o papel protetor do kefir**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 25 de Outubro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez – Orientador

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassalo – UFES

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg – UFES

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro-Neto – EMESCAM

Prof. Dr. Antônio de Melo Cabral – FAESA

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Abilio Friques, por me incentivar, e por, através do seu cuidado, permitir que esse e outros sonhos se tornassem realidade na minha vida. Essa vitória também é sua!

Aos meus filhos Miguel, Marina (*in memoriam*) e Davi, minhas maiores fontes de inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Jesus, Senhor e salvador da minha vida, por me “chamar” ainda na infância e revelar a mim todo seu amor e cuidado. Agradeço por tudo que tens feito e pelo que ainda irás fazer.

Ao meu marido e filhos, por tanto amor, suporte, companheirismo. Vocês enchem a minha vida de alegria e tê-los ao meu lado é o que me faz ser capaz de enfrentar qualquer desafio. Amo vocês.

Ao meu mestre, professor Dr. Elisardo Corral Vasquez, minha gratidão, meu amor e reconhecimento. Que honra a minha ser sua primeira orientanda de mestrado na Universidade Vila Velha e depois, ser sua última aluna na Universidade Federal do Espírito Santo. Vou levar para sempre a alegria da sua companhia no dia a dia, nas viagens, nas conquistas e nas lutas também. Eu não tenho dúvidas que foi Deus que me presenteou me permitindo viver tudo isso ao seu lado. O senhor me ensinou muito mais que ciência, me ensinou sobre a vida, me tornou mais forte e me mostrou que uma mente determinada é capaz de tudo. Serei sempre grata a Deus pela sua vida, pela sua existência e por Ele me presentear, escrevendo o seu nome na minha história. Que privilégio, que bênção!

Aos meus pais Enétson (*in memoriam*) e Maria de Lourdes, minha base de amor, valores e educação. Obrigada por se sacrificarem tanto e me permitirem sair de uma cidadezinha do interior para realizar meu grande sonho, estudar. Tantos anos depois, aqui estou eu, estudando, e tudo isso começou com vocês. Todo e qualquer título que eu receber, terá sempre uma raiz em vocês. Em todo e qualquer lugar que eu chegue, vocês sempre estarão comigo.

Aos professores, Dra. Silvana dos Santos Meyrelles, Dr. Thiago de Melo, Dra. Bianca Prandi Campagnaro, Dra. Ágata Lages Gava, minha gratidão pelos ensinamentos, apoio e pela amizade que construímos. Vocês farão sempre parte da minha história.

Às ICs Fernanda Dornelas e Daiany De Angeli por suas participações tão relevantes para o andamento desse trabalho.

A todos os colegas e amigos da Universidade Federal do Espírito Santo, a todos os alunos do laboratório de Fisiologia Translacional pela amizade, apoio e companheirismo.

Ao colega Marcos Leal, por me treinar e contribuir diretamente para minha capacitação para as pesquisas do mestrado e doutorado.

À Ananda Tissianel, obrigada por me ajudar tanto nessa caminhada. Sua presença doce, sua delicadeza nas palavras e seu incentivo foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Você fez meus dias de laboratório mais leves e felizes.

Aos colegas Eduardo Frizzera, Rafaela Aires, Marcella Porto, Fernanda Amorim, por tudo de bom que vivemos juntos nesses anos de estudo.

Ao professor Dr. Breno Nogueira, pelo apoio para a realização da microscopia eletrônica de varredura no laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins.

A todas as pessoas que me apoiaram direta ou indiretamente durante esses anos de dedicação à pesquisa: Vilma, Joelma, Marta, Cleidiane, Fabrícia e a todos os meus amigos e familiares pela torcida.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq e FAPES pelo apoio financeiro ao nosso laboratório.

Mudaste o meu pranto em dança,
a minha veste de lamento em veste de alegria,
para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale.
Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.

Salmos 30:11,12

RESUMO

Introdução: Tem sido demonstrado os efeitos danosos da contaminação por Bisfenol A (BPA) em períodos críticos do desenvolvimento humano, como gestação e infância. Do ponto de vista endócrino, muito se sabe a esse respeito, porém, em relação a desfechos cardiovasculares, a literatura é escassa quanto aos mecanismos de ação através dos quais esse disruptor endócrino poderia agir. Além disso, muitas pesquisas são realizadas com indivíduos adultos, quando na verdade, sabe-se que muitas doenças que aparecem nessa fase têm suas origens na infância. Neste estudo, foram avaliados os efeitos do BPA na infância e a ação protetora do kefir nesse contexto.

Métodos: Animais Wistar-Kyoto machos foram desmamados com 25 dias de vida e foram divididos em três grupos. O grupo BPA foi tratado com BPA (100µg/Kg/dia), por gavagem, 60 dias. O grupo BPA Kefir recebeu diariamente a mesma dose de BPA e em outro momento uma dose de kefir (0,3 mL/100g). Esses dois grupos foram comparados com ratos que receberam leite acidificado por gavagem 60 dias para controle negativo. A função endotelial vascular foi avaliada em anéis de aorta, através da resposta de relaxamento à acetilcolina (ACh). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO) foi avaliada através da utilização dos bloqueadores como apocinina e L-NAME na reatividade vascular à ACh e de marcadores por meio de citometria de fluxo no tecido vascular.

Resultados: Foram observados efeitos prejudiciais da contaminação por BPA e um efeito protetor significativo do kefir. O grupo BPA apresentou pressão arterial (PA) elevada e o tratamento com kefir atenuou a PA. O grupo BPA apresentou redução no relaxamento induzido pela ACh quando comparado ao grupo controle ($\sim 81 \pm 3\%$ vs. $\sim 95 \pm 2\%$). Interessantemente, no grupo BPA kefir ($92 \pm 2\%$) observou-se uma vasodilatação induzida pela ACh semelhante a do grupo controle. O bloqueio da NADPH-oxidase promoveu aumento no relaxamento dos anéis de aorta no grupo BPA, entretanto, não alterou a vasodilatação dos animais do grupo controle e BPA kefir. A análise de citometria de fluxo das células endoteliais da aorta revelou aumento da produção de ROS e diminuição da biodisponibilidade do NO no grupo BPA, sendo que, o tratamento com kefir foi capaz de normalizar para níveis de

animais do grupo controle os níveis de ROS e NO. A microscopia eletrônica de varredura mostrou lesão endotelial na superfície vascular dos BPA, o que foi parcialmente revertido com a administração do kefir.

Conclusão: A contaminação por BPA na infância aumentou o ganho de peso corporal, elevou a pressão arterial, causou disfunção endotelial, promoveu desequilíbrio entre ROS/NO, e promoveu alterações na arquitetura endotelial e provocou dano ao DNA da célula da aorta. O tratamento com kefir foi capaz de conferir uma ação protetora, diminuindo de maneira significativa os danos causados pelo BPA.

Palavras-chave

Bisfenol a, contaminação ambiental, infância, Kefir, probióticos, estresse oxidativo, disfunção endotelial, hipertensão

ABSTRACT

Introduction: Although the harmful effects of Bisphenol A (BPA) contamination in infancy has been demonstrated, the mechanisms of action of cardiovascular outcomes still is scant. Here, we demonstrate the effects of BPA in infancy and the protective action of kefir.

Methods: Animals (25 days old) were treated with BPA (100 µg/Kg/day) for 60 days (BPA group), or administered with kefir (0.3 mL/100 g) in addition to BPA (BPA kefir group), compared with non-treated rats (Control group). The vascular endothelial function was evaluated in aortic rings through the relaxation response to acetylcholine (ACh) and specific blockers. The balance between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) synthase was assessed through flow cytometry in the vascular tissue.

Results: The BPA group developed high blood pressure (+10%) and the analysis of vascular reactivity showed an impaired ACh-induced relaxation (~80%). The further analysis by using NADPH, NOS and COX blockers revealed that the impaired vasorelaxation was due to increased ROS production (+12%), NO bioavailability (-12%) and increased vasoconstriction to prostanoids (+36%) compared with the Control group. Kefir treatment reverted those effects significantly. Analysis of the aortic cells showed increased •O₂⁻ production (1942±39 a.u.) and decreased NO bioavailability (1250±30 a.u.) compared with the Control group (1374±146 and 2777±25 a.u., P<.05) and kefir reverted these values (1298±57 and 2517±57 a.u.).

Conclusion: Contamination by BPA in this model caused hypertension and endothelial dysfunction and it was accompanied by a vascular ROS/NO imbalance, damage of endothelial layer and pro-apoptotic effects. The novelty is that the treatment using probiotic kefir was able to attenuate the progression of the above BPA effects.

Keywords: Bisphenol A, environmental contamination, infancy, kefir, oxidative stress, endothelial dysfunction, high blood pressure

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do BPA	19
Figura 2. Esquema ilustrativo dos efeitos de vários contaminantes ambientais sobre a função vascular, incluindo o efeito do BPA sobre a disfunção endotelial	24
Figura 3. Resumo dos efeitos benéficos do probiótico Kefir sobre a disfunção endotelial em SHR, de acordo com os resultados de Friques <i>et al.</i> , 2015	27
Figura 4. Esquema simplificado sobre o desenho metodológico do estudo	34
Figura 5. Análise do efeito da contaminação por Bisfenol A sobre parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos acordados Wistar.....	43
Figura 6. Efeitos do BPA sobre a reatividade vascular à ACh (à esquerda) e Fenilefrina (à direita) em ratos Wistar	44
Figura 7. Avaliação da via molecular da NOS/cGMP em anéis de aorta nos três grupos de animais estudados através do inibidor inespecífico L-Name.....	45
Figura 8. Contribuição do estresse oxidativo para a disfunção endotelial. Efeito do bloqueio da atividade da NADPH oxidase com a apocinina na curva de concentração-resposta acumulativa de acetilcolina (ACh) nos três grupos	46
Figura 9. Avaliação da participação dos Prostanoides. Efeito do bloqueio da atividade da Cox 1 e 2 com Indometacina e NS 398 na curva de concentração-resposta à acetilcolina (ACh) nos três grupos	47
Figura 10. Avaliação da produção de ROS (O ₂ ⁻ , B: H ₂ O ₂ , C: ONOO ⁻ /• OH-) e de NO pela intensidade de fluorescência emitida pelo DHE, DCF, HPF e DAF, por citometria de fluxo (figuras A, B, C, D, respectivamente) em células vasculares isoladas de aorta	48
Figura 11. Quantidade de células na fase Sub-G0 do ciclo celular em células de aorta	49
Figura 12. Efeitos do BPA sobre a viabilidade e apoptose das células de aorta.....	49

Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a estrutura endotelial representativa de aorta de rato Wistar, BPA e BPA-kefir 51

Figura 14. Esquema simplificado sobre os efeitos da contaminação por BPA na infância e a ação protetora do kefir 62

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grau Celsius

µg: Micrograma

µm: Micrómetro

nM: nanômetro

µmol: Micromol

nmol: Nanomol

ACh: Acetilcolina

ANOVA: Análise de variância

AUC: Área sob a curva

BPA: Bisfenol A

BPM: Batimentos por minuto

C: Carbono

C₁₅H₁₆O₂: Bisfenol A

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

cGMP: Monofosfato cíclico de guanosina

CH₃⁻: Metil

CNTBIO: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

CO₂: Dióxido de Carbono

COX: Ciclooxygenase

COX 1-2: Ciclooxygenase tipo 1 e tipo 2

ΔAUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva

DAF/ DAF-2D: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DC: Doenças Cardiovasculares

DCF: Diacetato de diclorofluoresceína

DCF-DA: Diacetato de diclorofluoresceína

DCFH: Diacetato de Dicloro-di-hidro-fluoresceína

DE: Disruptor Endócrino

DEHP: Ftalato di(2-etilhexil)

DHE: Dihidroetídeo

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico
ECA: Enzima conversora de angiotensina
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
EPM: Erro padrão da média
Et al: E outros
FACS: Separador celular ativado por fluorescência
FDA: Food and Drug Administration
G: Grama
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HPF: Hidroxifenilfluoresceína
KCl: Cloreto de potássio
KG: Quilograma
L: Litro
L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester
MCP-1: Proteína de quimioatração de monócitos
MFI: Mediana intensidade de fluorescência
MG: Miligrama
mL: Mililitro
mM: Milímetro
mmHg: Milímetros de mercúrio
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
•OH⁻ Hidroxila
•O₂⁻: Ânion superóxido
•ONOO⁻: Peroxinitrito
PA: Pressão arterial
PBS: Fosfato Salino
PCBs: Bifenilos policlorados
PCB-77: bifenil policlorado 3, 4, 3', 4'-tetraclorobifenil
PFOS: sulfonato de perfluorooctano
PGI₂: Prostaciclina
Phe: Fenilefrina
PI: Iodeto de Prodíio

PM_{2.5}: material particulado fino

PVC: Polyvinyl Chloride

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

R_{máx}: Resposta máxima

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SNP: Nitroprussiato de Sódio

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UHT: Ultra High Temperature

UVV: Universidade Vila Velha

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES	18
1.2 BISFENOL A (BPA)	19
1.3 CONTAMINAÇÃO POR BISFENOL A (BPA) NOS PRIMEIROS MIL DIAS.....	20
1.4 LEGISLAÇÃO SOBRE O USO DO BISFENOL A	21
1.5 EFEITOS DO BISFENOL A (BPA) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	22
1.6 TERAPIAS NÃO FARMACOLÓGICAS NAS DISFUNÇÕES CARDIOVASCULARES.....	24
1.6.1 Kefir, ação antioxidante e reparativa ao dano endotelial	25
1.7 HIPÓTESE	28
JUSTIFICATIVA.....	29
OBJETIVOS.....	31
3.1 GERAL	32
3.2 ESPECÍFICOS.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ANIMAIS	34
4.2 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DO KEFIR E BPA	34
4.3 MEDIDAS PONDERAIS E HEMODINÂMICAS.....	35
4.4 ESTUDOS DE FUNÇÃO VASCULAR NA AORTA	36
4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES NA AORTA	37
4.5.1 Isolamento das células da aorta	37
4.5.2 Produção de ROS.....	37
4.5.3 Biodisponibilidade do Óxido Nítrico	38
4.6 ANÁLISE DO CONTEÚDO DO DNA	39
4.7 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR: APOPTOSE.....	39
4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA VASCULAR ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	40
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
RESULTADOS.....	41
5.1 EFEITOS DO BPA SOBRE O PESO CORPORAL E COMPORTAMENTO.....	42

5.2 EFEITOS DO BPA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL	42
5.3 EFEITOS DO BPA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR.....	43
5.4 MECANISMO DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: O PAPEL DO NO.....	44
5.5 MECANISMOS DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: O PAPEL DAS ROS.....	45
5.6 MECANISMOS DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: O PAPEL DOS PROSTANÓIDES.....	46
5.7 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS PRINCIPAIS VIAS DE PRODUÇÃO DE ROS NAS CÉLULAS DA AORTA	47
5.8 EFEITOS DO BPA SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS DE AORTA	48
5.9 EFEITOS DO BPA SOBRE A VIABILIDADE E APOPTOSE DE CÉLULAS DA AORTA	49
5.10 ANÁLISE DA ARQUITETURA ENDOTELIAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	50
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO.....	80

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Contaminação ambiental e as doenças cardiovasculares

Sabe-se que as doenças cardiovasculares (DC) são um grande problema de saúde pública, e constituem a principal causa de morte no Brasil e no mundo. Essas doenças que até alguns anos atrás acometiam apenas adultos, tornando-se presentes na vida de pessoas cada vez mais jovens, incluindo crianças.

Devido à sua gravidade e repercussões na saúde humana e também a todas as questões sociais e econômicas envolvidas, muito tem sido discutido a respeito dos contribuintes genéticos, fisiológicos e fisiopatológicos nas DC. Se por um lado, diversos estudos comprovam a forte relação entre dieta e estilo de vida com as DC, por outro, muitos pesquisadores vêm demonstrando que fatores ambientais como a poluição e a contaminação por substâncias tóxicas, também constituem importantes fatores de risco para DC como disfunção endotelial, hipertensão, infarto agudo do miocárdio entre outras (1, 2).

A literatura aponta para uma significativa relação entre contaminação por metais pesados como mercúrio, chumbo, arsênio, cádmio, entre outros, e por compostos químicos, chamados de disruptores endócrinos, entre eles o Bisfenol A (BPA) e o desenvolvimento de DC (3, 4).

Em um mundo cada vez mais globalizado e industrializado, a contaminação ambiental pelo uso do tabaco, poluentes originados pelas indústrias e componentes químicos práticos, baratos e versáteis, vem despertando o interesse do meio científico por pesquisas que desvendem seus mecanismos de ação e repercussões na saúde dos indivíduos nas mais diferentes faixas etárias.

Apesar dos esforços e leis propostas pelas nações mais desenvolvidas no sentido de diminuir as fontes de contaminação ambiental, sabe-se que essa meta ainda está longe de ser alcançada. Isso porque, entre as características do estilo de vida moderno estão a busca constante por praticidade, fabricação de produtos com maior tempo de prateleira, produção em grande escala e hábitos de vida distantes de nossos antepassados, especialmente no que se refere à alimentação e cuidado com o meio ambiente. Consequentemente, várias doenças crônicas que geralmente acometem o indivíduo adulto (cardiometabólicas) e idoso (demência), podem ter suas origens na infância devido à exposição à diversos contaminantes (5).

1.2 Bisfenol A (BPA)

Dentre os diversos contaminantes ambientais destaca-se o Bisfenol A (BPA) que age como um disruptor endócrino (DE) (6), interferindo nos sistemas hormonais, produzindo efeitos adversos de desenvolvimento, reprodutivos, neurológicos e imunológicos em mamíferos (5).

O BPA é um difenol, formado pela união de dois grupos fenóis com uma acetona, possui fórmula molecular igual a $C_{15}H_{16}O_2$ e ponto de fusão entre 152 e 158°C. Trata-se de um composto orgânico que constitui a unidade básica de polímeros e revestimentos de alto desempenho.

O BPA é muito utilizado na fabricação de policarbonato, um tipo de plástico duradouro, de grande transparência e alta resistência ao calor e ao impacto. Além disso, pode reagir com a epiclorigrina para formar uma resina epóxi, um plástico termo estável que endurece quando misturado com um catalisador, presente em vernizes utilizados para revestimentos de embalagens metálicas de alimentos, no revestimento de aplicações industriais e de consumo (7).

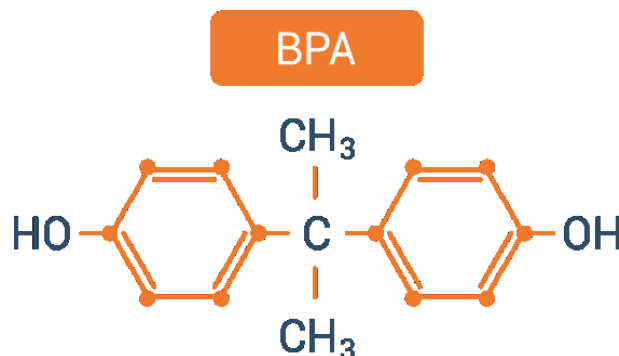


Figura 1. Fórmula estrutural do BPA. Fonte: Friques, 2019 (8).

O composto está presente em DVDs, visores de capacetes para motociclistas, em coberturas transparentes, nas janelas de aviões, computadores, eletrodomésticos, armações e lentes de óculos, tintas, revestimentos internos de enlatados (comida, bebida), garrafas de água, encanamentos, recipientes de armazenamento de alimentos, equipamentos médicos e de segurança, capacetes, materiais de construção, brinquedos, selantes dentários, entre outros produtos. O Bisfenol A também está entre os componentes de formulações de aditivos

antioxidantes no PVC maleável (fios e cabos) e como preparador de cor em papéis térmicos, como por exemplo, em extratos bancários. Dentre os vários disruptores endócrinos, o BPA é um dos compostos sintéticos mais utilizados no planeta, com uma produção anual de cerca de 5 milhões de toneladas nos Estados Unidos, porém, seu uso tem crescido cerca de 13 a 19% por ano no continente Asiático, o que tem chamado a atenção de todo o mundo (9).

Embora o contaminante esteja presente em muitas formas no dia a dia desse mundo moderno extremamente industrializado, acredita-se que a maior fonte de exposição ao BPA seja através da alimentação, por meio da contaminação dos alimentos e bebidas que ficam em contato com a substância durante seu armazenamento. A instabilidade química entre as moléculas do BPA possibilita que o mesmo se desprenda da embalagem e contamine os alimentos, através de uma reação entre o BPA com o ácido ou base dos alimentos ou pela exposição a variações de temperaturas (10). Mas dados recentes sugerem que é crescente a contaminação através do contato com o papel térmico e que há, pelo menos algum tipo de exposição a partir da água potável, selantes dentários e possivelmente até através da inalação de partículas do pó doméstico (11).

Devido ao seu uso em grande escala pela indústria e o descaso dos órgãos fiscalizadores em diversos países, é possível que em muitos locais, o próprio meio ambiente, água, ar e solo estejam contaminados por esse composto químico (12). Nesse contexto, a distribuição generalizada de BPA tem provocado preocupações mundiais sobre suas possíveis associações com doenças humanas, entre elas alterações comportamentais, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (13).

Em 2011, o composto foi encontrado em cerca de 95% das amostras de urina da população americana. Ele também foi identificado no soro de mulheres grávidas, no líquido amniótico e no sangue do cordão umbilical durante o nascimento (14).

1.3 Contaminação por Bisfenol A (BPA) nos primeiros mil dias

Em relação aos disruptores endócrinos, dentre eles o BPA, observa-se uma “janela crítica de exposição”. Esta fase é aquela que compreende nosso estado de maior vulnerabilidade, onde a exposição resulta em mais efeitos deletérios para a saúde humana. A literatura vem apontando uma janela crítica de exposição que

compreende o período de cerca de 3 meses antes da concepção para os espermatozóides, a fase intrauterina para o feto e gestante e os dois primeiros anos, para a criança (8). Essa fase coincide com o que ficou conhecido dentre os estudos da área da pediatria como o “período ouro do desenvolvimento humano” (15,16).

Costa *et al.* (17), concordam que as principais vias de contaminação humana são através do consumo de alimentos e absorção cutânea, porém, ressaltam que a exposição durante os estágios iniciais de desenvolvimento também pode ocorrer por via transplacentária e durante a amamentação.

Diversos autores mostram que a contaminação por BPA durante a gestação, pode acarretar em prejuízos para a saúde do bebê. Prejuízos esses que vão desde risco aumentado para alterações congênitas, pois o composto pode afetar a síntese de DNA (18, 19) até efeitos irreversíveis sobre o desenvolvimento da criança como aumento significativo no peso de nascimento de crianças do sexo masculino, obesidade infantil e alterações comportamentais (20). Nesse sentido, há alguns anos, nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) emitiu uma avaliação identificando o BPA como causador de possível risco à saúde de fetos, bebês e crianças, alegando que após a polimerização, algumas moléculas BPA permanecem livres podendo migrar contaminando alimentos e bebidas (21).

A contaminação por BPA em fases iniciais da vida tem apresentado vários efeitos deletérios na prole, como o decréscimo na produção de esperma nos homens, a estimulação de liberação de prolactina e a promoção de proliferação de células em câncer de mama nas mulheres, o aumento da má formação nos aparelhos reprodutivos feminino e masculino, inibição dos hormônios tireoidianos, o fenômeno de maturação precoce em garotas e outras perturbações genéticas (20).

Também tem sido observado relação positiva entre a contaminação por BPA nos primeiros mil dias, da fecundação aos dois anos de vida, e prejuízos cardiovasculares, mostrando uma janela de suscetibilidade à contaminação ambiental nessa fase que pode deixar consequências por toda a vida (22). O BPA leva a um aumento do estresse oxidativo, e disfunção endotelial, inclusive em crianças (23).

1.4 Legislação sobre o uso do Bisfenol A

A preocupação sobre o uso do BPA tem crescido internacionalmente. O Canadá foi o primeiro país a tornar ilegal a substância, em setembro de 2010,

apesar da oposição da indústria. França e Dinamarca baniram o BPA pouco depois. O governo dinamarquês chegou a proibir o uso do produto em qualquer alimento para crianças de até três anos de idade.

Por precaução, alguns países, inclusive o Brasil, optaram por proibir a importação e fabricação de mamadeiras que contenham BPA, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários deste produto. Esta proibição está vigente desde janeiro de 2012, por meio da Resolução RDC n. 41/2011. No Brasil, a proibição do uso do BPA aplica-se somente a mamadeiras e artigos similares destinados à alimentação de lactentes. Para as demais aplicações, existem limites de migração para essa substância definidos nas Resoluções RDC n. 56/2012 e 17/2008, que devem ser observados para qualquer material que se destine ao contato com alimentos como embalagens, equipamentos e utensílios (24).

1.5 Efeitos do Bisfenol A (BPA) sobre o sistema cardiovascular

Lang *et al.* (25), relataram pela primeira vez, que níveis mais elevados de BPA urinário estavam significativamente associados a um aumento da incidência de doenças cardiovasculares (DC). Desde então, é crescente o número de estudos demonstrando associação positiva entre a contaminação por BPA e o risco aumentado para diversas DC, como a hipertensão, aterosclerose, doença cardíaca coronária, infarto do miocárdio e angina (6, 26). Estudos experimentais sugerem que a exposição ao BPA tanto aguda como crônica poderiam afetar o funcionamento fisiológico do sistema cardiovascular (4).

Embora limitadas, as evidências atuais sugerem que a exposição ambiental ao BPA pode ser um fator de risco que contribui para as DC e diversos autores apontam para a necessidade de aprofundar a avaliação do potencial de toxicidade de BPA sob esse ponto de vista, incluindo a realização de pesquisas que investiguem os mecanismos celulares e moleculares pelos quais o tóxico do BPA levaria à uma disfunção endotelial e consequentes danos cardiovasculares (4, 27, 11).

Caampang *et al.* (28), avaliaram os efeitos da administração diária de BPA em camundongas prenhas correlacionando a contaminação com suas repercussões cardiovasculares. Os resultados desse trabalho mostram pela primeira vez que a exposição pré-natal ao BPA resulta em alterações no crescimento, aumento da adiposidade e prejuízos na homeostasia da glicose em filhotes machos e fêmeas. A

prole também apresentou pressão sistólica aumentada e, nos filhotes machos, isso foi acompanhado por um tônus vascular prejudicado. Naquele estudo, foi mostrado uma curva dose efeito ao agonista α_1 -adrenérgico, fenilefrina, na qual verificou-se uma exacerbação da resposta vasoconstrictora do grupo contaminado por BPA em relação ao controle. Na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, não se verificou uma influência do contaminante sob o efeito da ACh. Por outro lado, na avaliação da resposta vasodilatadora independente do endotélio, através do doador de óxido nítrico, Nitroprussiato de Sódio (SNP), verificou-se uma atenuação da resposta vasodilatadora no grupo contaminado. Embora trate-se de um trabalho relevante, o mesmo, não desvendou os mecanismos moleculares pelos quais a disfunção endotelial ocorre frente à essa contaminação. Consequentemente, faz-se necessário a realização de outros estudos que elucidem essa questão visando também explorar as vias pelas quais o músculo liso do vaso sanguíneo se altera na presença desse contaminante no período intrauterino.

Conforme ilustrado no esquema abaixo, o BPA poderia afetar a reatividade vascular principalmente via endotélio, no entanto, como vimos acima, o único estudo que investigou esse efeito vascular nesses casos, não observou essa ação, apenas efeitos sobre o músculo liso vascular. Assim, ressalta-se a importância de nossa investigação visando um melhor detalhamento sobre esse tema.

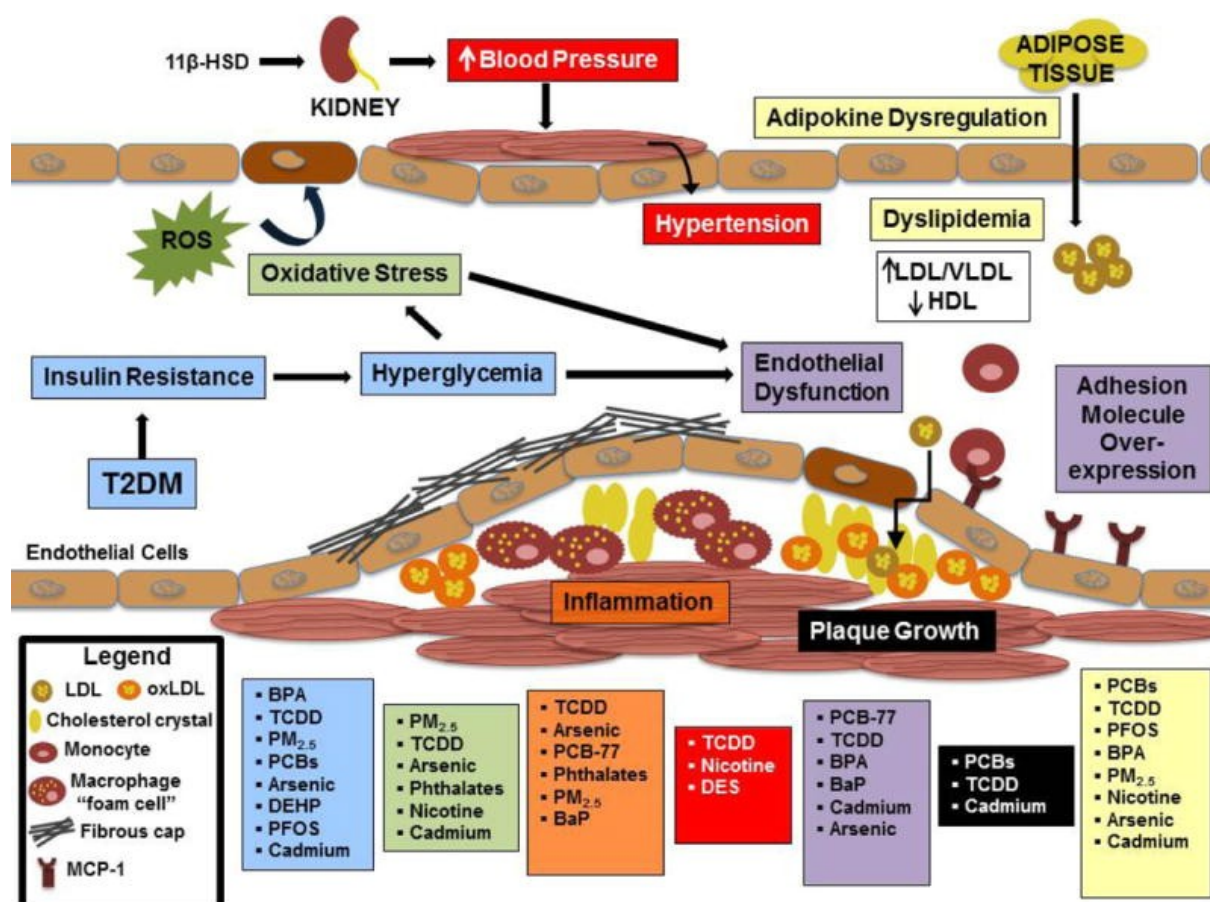


Figura 2. Esquema ilustrativo dos efeitos de vários contaminantes ambientais sobre a função vascular, incluindo o efeito do BPA sobre a disfunção endotelial. Fonte: Kirkley & Sargis, 2014 (29).

1.6 Terapias não farmacológicas nas disfunções cardiovasculares

É indiscutível a importância dos tratamentos farmacológicos nas doenças cardiovasculares, especialmente nos casos mais graves. Entretanto, é crescente o interesse social e científico pela busca de alternativas não farmacológicas como parte de um estilo de vida saudável para a prevenção e até tratamento dos casos mais leves de hipertensão, disfunção endotelial, etc.

Nesse contexto, é importante resgatar na história da humanidade, que o consumo de alimentos para fins preventivos e curativos vem fazendo parte dos hábitos de diversas culturas. Está bem documentado, inclusive, que vários fármacos normalmente utilizados hoje em dia são estruturalmente derivados a partir de substâncias de origem natural (30).

1.6.1 Kefir, ação antioxidante e reparativa ao dano endotelial

Em um contexto de busca por qualidade de vida, desde 1920, vem sendo utilizada a prática de se realizar algum tipo de modificação no alimento para aumentar seu potencial nutritivo. Esse processo foi mais forte inicialmente no Japão, onde, em 1984 cientistas utilizaram o termo "alimentos funcionais" para produtos alimentícios fortificados com constituintes especiais que possuíam efeitos fisiológicos adicionais (31).

Diversos autores caracterizam os alimentos funcionais como aqueles capazes de oferecer benefícios adicionais aos inerentes à sua composição nutricional, à saúde do consumidor, podendo desempenhar um papel potencialmente importante na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (32).

Para Candido & Campos (33), alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis.

Os alimentos funcionais apresentam capacidade de atuar em funções fisiológicas auxiliando na proteção contra doenças crônicas degenerativas (diabetes, hipertensão, câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose) e infecções microbianas (34).

Um importante grupo de alimentos funcionais são os prebióticos, os probióticos e os simbióticos. Prebióticos são carboidratos não digeríveis, também chamados de fibras dietéticas, que estimulam seletivamente a proliferação ou a atividade de populações de bactérias desejáveis no intestino. Já os probióticos, são considerados como alimentos ou suplementos alimentares que contenham microrganismos vivos importantes na manutenção da microbiota intestinal e junto com uma alimentação saudável, promovem a saúde. Entre esses produtos, destacam-se os leites fermentados, que são resultantes da fermentação microbiológica do leite (35).

Já os simbióticos são misturas sinérgicas de prebióticos e probióticos, que são usados ou administrados com o objetivo de beneficiar a saúde do hospedeiro. Por outro lado, o termo "simbiótico" também tem sido usado para descrever diferentes microrganismos vivos que coabitam, cada um obtendo benefícios

específicos do outro (simbiose) na microbiota intestinal, termo este que se aplica ao kefir (36).

A palavra kefir é derivada da palavra turca *Keyif*, que significa "bom sentimento". Originada nas montanhas do Cáucaso, a bebida é tradicionalmente consumida na Europa Oriental, Rússia e Sudoeste da Ásia. Porém, nos últimos anos, vem sendo observado um aumento no consumo de kefir em muitos países, o que tem sido relacionado às suas propriedades únicas sensoriais e história associada a efeitos benéficos para a saúde humana (37).

No Brasil, o conhecimento desta bebida e de seus benefícios não são muito difundidos e a fabricação de kefir é em sua maior parte artesanal (35). Trata-se de uma bebida fermentada pela ação de bactérias e leveduras que estão associadas simbioticamente nos chamados grãos de kefir. De fácil preparo, apresenta consistência semelhante ao iogurte, sendo ligeiramente efervescente e espumoso (38).

Nos grãos de kefir, podem estar presentes várias espécies de bactérias (gêneros *Lactobacillus*, *Lactococci*, *Leuconostocs* e *Acetobacter*), e leveduras (gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torula*, *Saccharomyces*), que coexistem numa associação simbiótica (37).

O kefir, preparado pela fermentação dos grãos em solução aquosa de açúcar mascavo, é uma forma bastante consumida pela população brasileira, mas suas propriedades funcionais ainda são pouco relatadas na literatura. A maioria dos estudos utiliza o kefir tradicional, fermentado em leite. Na literatura, há trabalhos reportando efeitos benéficos do "kefir de leite": na atividade antitumoral (39); como antialérgico (40); na melhora da digestão e tolerância à lactose (38); na inibição da proliferação de microorganismos patogênicos a nível intestinal (41).

O efeito hipocolesterolêmico do kefir também vem sendo estudado e a maioria dos trabalhos aponta para resultados positivos. Tamai *et al.* (42), investigaram os efeitos de um kefir-leite produzido por 10 tipos de bactérias ácido-láticas e *Saccaromyces cerevisiae* na concentração sérica e hepática de lipídeos em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol. O colesterol total e os níveis de fosfolipídeos séricos reduziram significativamente nos ratos suplementados com kefir. Entretanto, no estudo de ST-Onge *et al.* (43), com humanos, o kefir (leite) não afetou as concentrações de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos (TG) no sangue dos indivíduos após 4 semanas de tratamento.

Um estudo realizado por nosso grupo (26), avaliou os efeitos do tratamento crônico com kefir em aorta de ratos espontaneamente hipertensos, verificando se o tratamento seria capaz de reverter o prejuízo endotelial e por quais vias estaria atuando. O trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o probiótico kefir é capaz de atenuar a disfunção endotelial em vasos de condutância de animais SHR, através da diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, consequentemente, reestabelecendo a biodisponibilidade de Óxido Nítrico, NO. Além disso, o kefir também foi capaz de promover reendotelização dos vasos, e devido a um maior recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPC), o qual pode contribuir para a reparação morfológica nos animais SHR (figura 3).

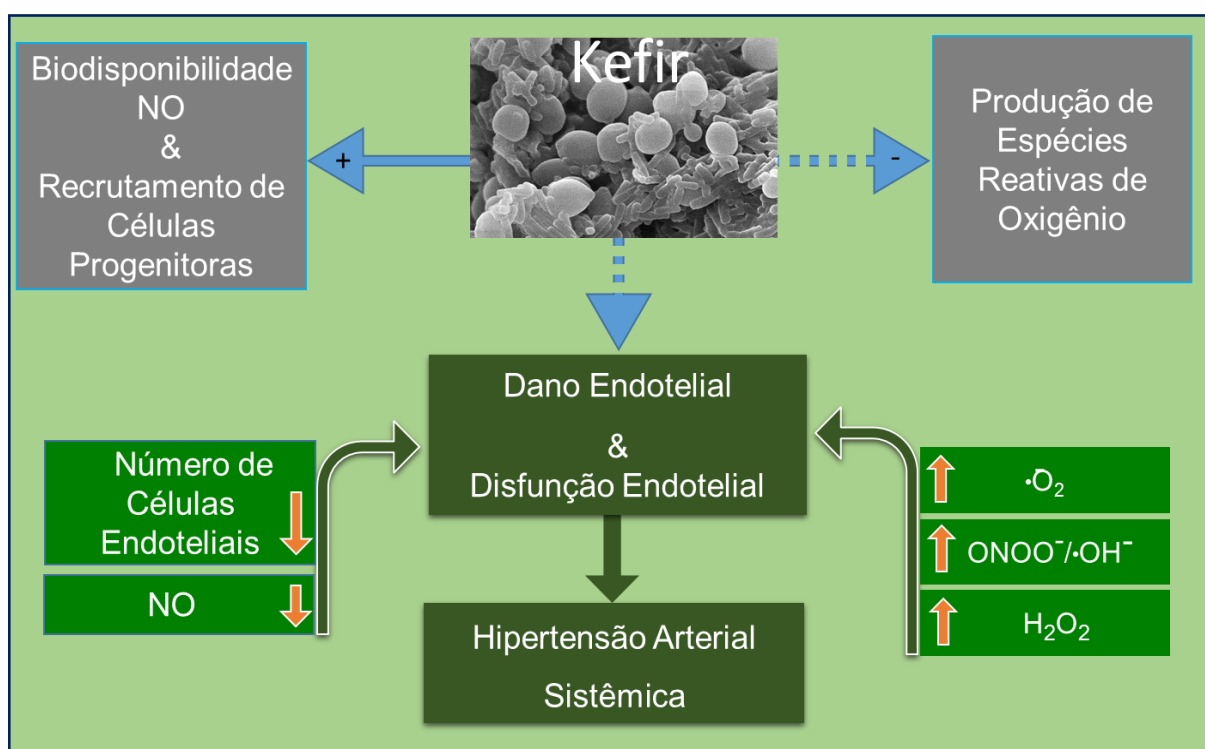


Figura 3. Resumo dos efeitos benéficos do probiótico Kefir sobre a disfunção endotelial em SHR, de acordo com os resultados de Friques *et al.*, 2015 (26).

Assim, nosso grupo tem demonstrado que o simbiótico kefir, diminui o estresse oxidativo, aumenta o número de células progenitoras endoteliais (EPC), restaurando a função endotelial na hipertensão (26). Por ser um alimento funcional, seus efeitos vão além da nutrição e sua população de lactobacilos e leveduras é capaz de trazer benefícios ao microbioma. Sabe-se que em determinadas

circunstâncias, incluindo a infância, esse microbioma pode ser afetado por vários fatores tais como a contaminação ambiental, levando a uma disbiose cujas consequências podem ser a disfunção de vários órgãos e sistemas, dentre eles o cardiovascular, na maioria das vezes caracterizado por elevação da pressão arterial, disfunções endotelial e cardíaca (44). Daí a reconhecida importância do uso de probióticos para prevenir ou reverter os estados de disbiose e assim, consequentemente, garantir a saúde do hospedeiro (36).

1.7 Hipótese

Apesar dos vários estudos que comprovam os efeitos maléficos que a exposição ao BPA causa à saúde humana, os efeitos desse contaminante sobre a função vascular, assim como seus mecanismos de ação, ainda não foram esclarecidos. Portanto, nosso estudo testou a hipótese que a contaminação por BPA na infância levaria à disfunção endotelial, com repercussões na pressão arterial, e que o kefir teria uma ação profilática nesse contexto.



JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A literatura mais recente no campo da nutrição e pediatria mostra que as diferentes fases que compreendem os primeiros mil dias são consideradas críticas para o desenvolvimento humano por tratar-se de uma janela de grande suscetibilidade epigenética. Agressões sofridas nesse período podem deixar sequelas por toda a vida (45). Nesse sentido, a preocupação em investigar os efeitos da contaminação por Bisfenol A nesta fase é extremamente relevante. Associar essa contaminação a possíveis efeitos cardiovasculares pode ser uma importante contribuição científica para o estudo da fisiopatologia das doenças cardiovasculares, abrindo novas perspectivas investigativas sobre o tema.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a função endotelial de ratos Wistar expostos ao Bisfenol-A a partir do desmame, bem como os efeitos profiláticos do kefir.

3.2 Específicos

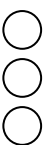
Avaliar a função endotelial de anéis de aorta, através de curvas concentração-efeito com acetilcolina e aenilefrina.

Avaliar as vias moleculares envolvidas mediante bloqueadores farmacológicos clássicos, L-Name, Apocinina, Indometacina e NS398.

Avaliar a participação do estresse oxidativo nos efeitos do bisfenol A.

Avaliar a integridade da superfície endotelial vascular através da microscopia de varredura.

Avaliar as possíveis ações protetoras do kefir em um contexto de contaminação por bisfenol-A.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

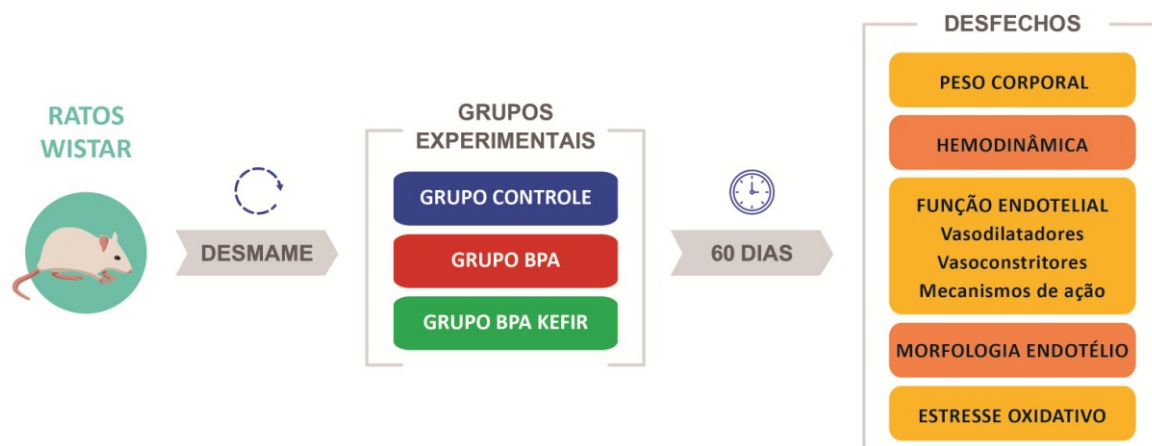


Figura 4. Esquema simplificado sobre o desenho metodológico do estudo. Fonte: Própria (2019).

4.1 Animais

Ratos Wistar desmamados aos 25 dias de vida provenientes do biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), foram mantidos em gaiolas individuais e mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h), temperatura de 20-25 °C e umidade de 70%, de acordo com o recomendado. Os ratos receberam ração e água *ad libitum* e foram cuidados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Nacional de Biossegurança (CNTBIO), mediante prévia aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA/UFES, protocolo nº63/2016).

4.2 Preparo e administração do kefir e BPA

Os grãos de Kefir, provenientes da Universidade Vila Velha, ES, foram adicionados em leite integral, pasteurizado e resfriado (UHT). Utilizou-se uma proporção de 4% ou seja, 40 gramas de grãos para 1 litro de leite. O leite inoculado com os grãos foi mantido em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, foi realizada uma filtração dos grãos através de uma peneira plástica e o produto resultante mantido sob refrigeração entre 5°C a 15°C por 24hs para que as

leveduras multiplicassem. Ao término desse processo, o Kefir foi fracionado em tubos "falcon" e acondicionado em freezer à -20° C (46).

O BPA foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA, #133027) e foi preparado na concentração final de 0,1 mg/ml.

No dia 1 após o desmame, os ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: Grupo contaminado: BPA (n=10), Grupo contaminado tratado com kefir: BPA-Kefir (n=10), Grupo não contaminado: Controle (n=10).

O grupo BPA recebeu o BPA na dose de 100 µg/kg/dia por gavagem, 60 dias (28). O grupo BPA-Kefir recebeu kefir em uma dose de 0,3mL/100g peso corporal, por gavagem, como tem sido comumente utilizado no laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional da Universidade Vila Velha (UVV) (26, 47, 48). Esse grupo, em um segundo momento, recebeu o Bisfenol, na dose de 100 µg/kg/dia por gavagem, 60 dias. As dosagens de BPA e kefir, foram ajustadas semanalmente de acordo com as mudanças de peso corporal dos animais. O grupo controle recebeu leite acidificado por gavagem 60 dias para controle negativo.

4.3 Medidas ponderais e hemodinâmicas

Inicialmente os animais foram pesados e distribuídos nos diferentes grupos, a partir daí foram pesados duas vezes por semana para adequação das doses de BPA e Kefir. No sexagésimo dia de tratamento, foram submetidos à verificação da pressão arterial. Para a realização da pletismografia ((IITC INC/Life Science, 23924 VictoryBlvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA). Para isto, os animais foram aclimatados durante 3 dias, por cerca de 10 minutos no equipamento, para evitar a influência do estresse sobre a pressão arterial. No dia do registro, os animais foram acomodados na câmara aquecida dentro de um contentor com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na região próxima à cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de pressão arterial sistólica foi obtido por meio de sinais do transdutor acoplado a um computador (49). A temperatura foi controlada entre 29 e 32 °C durante os 40 minutos em que cada animal permaneceu no equipamento. Foi realizada a média de 3 registros com diferença máxima de 10 mmHg. Foram descartados os registros associados às influências causadas por movimentos dos animais. Após medida da pressão, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (200mg/kg, i.p., Cristalia, São Paulo, Brasil) e o sangue foi coletado.

4.4 Estudos de função vascular na aorta

Após a eutanásia os animais foram submetidos à toracotomia para exposição do coração e aorta, que foram cuidadosamente dissecadas do tecido conjuntivo, retiradas e acondicionadas em placa de petri contendo solução nutritora de Krebs modificada (NaCl 119.0, NaHCO₃ 25.0, glicose 11.2, CaCl₂ 1.6, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2). Posteriormente, foram feitos anéis de aorta com aproximadamente 4mm, que eram gentilmente colocados em triângulos de aço inoxidável e mantidos em cubas contendo solução de Krebs modificada, pH 7,4 a 37°C e constantemente aerada por mistura carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂, trocada a cada 30 minutos (exceto durante os procedimentos farmacológicos). Os anéis foram conectados a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, EUA). As respostas vasculares frente à administração de agentes vasoativos foram captadas e plotadas em curvas de variação de tensão em função da concentração das drogas administradas.

Para execução dos protocolos de reatividade vascular, após a estabilização de 30 minutos, os vasos foram submetidos a doses crescentes de substâncias vasoativas, permitindo o registro da variação de tensão em função do tempo e a construção de curvas dose-resposta. A viabilidade dos anéis foi avaliada por meio de incubação de KCl 125 mM por 30 minutos. Considerou-se viáveis os anéis cuja contração máxima atingiu, no mínimo, o dobro do valor basal de tensão (1g). O teste da integridade do endotélio vascular foi realizado por meio da avaliação do relaxamento frente à acetilcolina (ACh, 10μM), após pré-contracção com fenilefrina (Phe, 10μM). O endotélio foi considerado viável quando este relaxamento era maior que 80% da contração induzida por Phe.

A reatividade vasoconstrictora dos anéis de aorta foi feita através de um agonista α1 adrenérgico, fenilefrina. Para isso, foram construídas curvas dose efeito de fenilefrina (1 à 30 μM) em anéis de aorta com endotélio.

A avaliação da função endotelial foi realizada por meio da construção de uma curva de relaxamento dos anéis frente à administração de doses crescentes de ACh (10⁻¹¹ a 10^{-4.5} M), após pré-contracção com Phe (10⁻⁶). Para efeitos de avaliação da participação do óxido nítrico na disfunção endotelial, foi realizada a construção de uma curva de relaxamento com ACh (10⁻¹¹ a 10^{-4.5} M), em anéis pré-incubados com inibidor padrão não seletivo da enzima óxido nítrico sintase N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-Name, 100μM). Para avaliar a influência de ROS produzidas pela NADPH

oxidase no relaxamento vascular, foram realizadas curvas de relaxamento com ACh (10^{-11} a $10^{-4.5}$ M) na presença e ausência de apocinina (300 μ M), um inibidor da enzima NADPH oxidase. As respostas obtidas pelo relaxamento provocado pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contracção obtida pela Phe nos anéis de aorta. Nas curvas dose-resposta foram calculadas a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e o pEC_{50} , que representa o valor da concentração que produz 50% da $R_{\text{máx}}$. Para tal, foram usadas análises de regressão não-linear obtidas a partir das curvas dose-resposta. Para verificar a influência de prostanóides produzidos pela ciclooxigenase (COX) na vasodilatação, foram realizadas curvas concentração-resposta à ACh na presença e ausência de indometacina (10 μ M) um inibidor não seletivo das COX 1 e 2 e também na presença e ausência de NS 398 (1 μ M) um bloqueador seletivo da COX2. Protocolo adaptado de Balarini *et al.* (50).

4.5 Avaliação da produção de Radicais Livres na Aorta

4.5.1 Isolamento das células da aorta

As aortas foram coletadas e trituradas com tesoura cirúrgica e incubadas a 37°C com solução de extração contendo colagenase tipo 1 (100U/mL Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) dissolvidas em solução de tripsina e mantidas em agitador à velocidade de 200 rpm por 60 minutos. Após o período de incubação, o homogenato foi filtrado através de uma membrana de nylon (BD Falcon 70 μ m) para remover resíduos celulares. O filtrado foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. Depois disso, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas e finalmente ressuspensas em uma solução estoque contendo 95% de soro bovino fetal + 5% de DMSO, para posterior análise no citômetro de fluxo (51).

4.5.2 Produção de ROS

Dihidroetídeo (DHE) e 2',7'- diacetato de dicloro fluoresceína (DCF-DA) foram usados para determinar os níveis intracelulares de ânions superóxido ($\bullet O_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. Os níveis de ânion superóxido $\bullet O_2^-$ foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina. A oxidação do DHE é quantitativamente proporcional à concentração de $\bullet O_2^-$ na célula. A produção de H_2O_2 foi estimada por meio da citometria de fluxo através da fluorescência emitida

pela diclorofluoresceína (DCF). Após entrar na célula sofre ação de esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 formando um composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula.

As células isoladas das aortas foram ressuspensas em 1mL de solução tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160 mM) e DCF-DA (20mM), por 30 minutos à 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadas por 5 minutos com 10µM doxorrubicina ou 50 mM H_2O_2 , enquanto que para controle negativo as amostras foram incubadas apenas com etanol. As células então, foram lavadas e ressuspensas com PBS, mantidas no gelo e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo (FACS Cantoll, Becton Dickinson, SanJuan, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACS Diva (Becton Dickinson, San Juan, CA) e a sobreposição dos histogramas foi construída usando o FCS Express software. Para quantificação da fluorescência emitida pelo DHE e DCF, as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488nm e os sinais foram obtidos utilizando filtros 585/42 e 530/30, respectivamente. Os dados foram expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência emitida (MFI).

4.5.3 Biodisponibilidade do Óxido Nítrico

A biodisponibilidade do óxido nítrico foi avaliada conforme descrito anteriormente (52) e para estimá-la utilizou-se diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2D, 2Mm), adicionado em uma suspensão de células (10^6) e incubado a 37°C, por 18 minutos, no escuro. Para controle positivo, as amostras foram incubadas com 10 µM de nitroprussiato de sódio. As células então, foram lavadas, ressuspensas com PBS, mantidas no gelo e protegidas da luz para aquisição imediata dos dados por citometria de fluxo, os dados foram analisados com auxílio do software FACS Diva e a sobreposição do histograma foi construída usando o FCS Express Software. Para quantificação da fluorescência emitida pelo DAF-2D, as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488nm, o sinal foi obtido utilizando filtro 530/30 e os dados

foram expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência emitida (MFI).

4.6 Análise do conteúdo do DNA

A distribuição do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo. Antes da coloração, 1×10^6 células foram fixadas em etanol frio a 70% por 2h a -20°C . As amostras de células foram lavadas, ressuspensas em PBS gelado e incubadas com 200 mL de solução de coloração (20 mg/mL de RNase A, 500 mg/ml de iodeto de propídio [PI], 1% de Triton X-100 v/v) por 30 min a 4°C , no escuro. Assim, as células foram lavadas, centrifugadas por 10 min a 1200 rpm e ressuspensas em PBS. As amostras foram adquiridas em triplicata e 10.000 eventos foram utilizados para cada medição. O perfil do ciclo celular foi determinado usando um citômetro de fluxo FACSCanto II. As amostras foram adquiridas em triplicata e 10.000 eventos foram utilizados para cada medição para determinação do conteúdo de DNA. O método PI para detectar o DNA fragmentado baseia-se no princípio de que o marcador entra na célula após a permeabilização da membrana que marca o DNA. O DNA fragmentado de baixo peso molecular pode ser observado à esquerda do pico de células do DNA interfásico ($2n$) (53).

A análise dos dados foi realizada pelo software FACSDiva através da observação do seguinte: a porcentagem de DNA fragmentado, o DNA interfásico, que indica que as células não estão se dividindo, e o DNA duplicado, que indica que as células estão em mitose (54).

4.7 Determinação da viabilidade celular: apoptose

As células aórticas apoptóticas foram quantificadas por coloração dupla com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) usando o kit de detecção de apoptose (BD) da anexina V-FITC. Depois disso, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ajustadas para 500 μL em tampão de ligação (5×10^5 células). Em seguida, anexina V-FITC e PI foram adicionadas à suspensão celular, e as células foram suavemente submetidas ao vórtex. As células foram então incubadas por 15 min à temperatura ambiente (25°C) no escuro. Finalmente, as células foram analisadas por citometria de fluxo usando um FACSCanto II (BD). As células apoptóticas foram definidas como células positivas para anexina V (54).

4.8 Análise morfológica vascular através da microscopia eletrônica de varredura

Para verificação da estrutura do endotélio presente na aorta os animais foram perfundidos com uma solução de fixação (Glutaraldeído 2,5%, Formaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1 M). Após a perfusão a aorta foi removida, o tecido conjuntivo cuidadosamente retirado e a aorta foi mantida por um período de 24 horas na solução de fixação. Posteriormente, a aorta foi cortada e lavada em tampão cacodilato (0,1 M) por 3 vezes a cada 30 minutos, após a lavagem foi mantida em uma solução de pós-fixação contendo tetróxido de ósmio 1%, tampão cacodilato 0,1 M e ferrocianeto de potássio 1,24%, em câmara escura, por um período de 1 hora. Foi feita então a lavagem com tampão cacodilato 0,1M e água MiliQ. Após o processo, foi realizada a desidratação com álcool em concentrações crescentes, secagem pelo ponto crítico com CO₂, montadas em stubs e submetidas a uma camada de ouro no equipamento a vácuo. Os stubs foram visualizados no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. USA). As imagens foram obtidas no aumento de 50X (55).

4.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As amostras foram previamente submetidas a testes de Shapiro-Wilk para análise de distribuição normal. Considerando que todas as amostras apresentaram distribuição Gaussiana, foram utilizados testes bioestatísticos paramétricos. Para as comparações das médias dos grupos foi utilizado o teste de Anova de 2 vias para medidas repetidas na análise das curvas dose-efeito e Anova de 2 vias para amostras completamente randomizadas nos demais protocolos. Após, foi realizado teste *post-hoc* de Tukey e os resultados analisados via software (Graph Pad Prism 6, San Diego, CA, USA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos do BPA sobre o peso corporal e comportamento

No início do tratamento todos os animais apresentavam (~25 dias) e peso corporal semelhante. O peso corporal foi avaliado semanalmente e ao término do tratamento os animais do grupo controle possuíam peso de 350 ± 4 g. O grupo contaminado por Bisfenol-A, apresentou ganho de peso significativamente superior ao controle (13%, $p < 0,05$). Nos animais contaminados que receberam kefir o ganho de peso foi de 4,5%, ($p > 0,05$) comparado ao grupo controle, portanto, o ganho de peso foi menor do que o observado nos animais que receberam apenas BPA.

Em relação ao comportamento, em uma análise qualitativa, observou-se, durante os sessenta dias de tratamento dos animais, uma notória diferença no grupo contaminado por BPA. Os ratos eram mais irritados, agressivos, resistentes à gavagem, apresentavam piloereção e pelos com coloração menos alva que os animais do grupo controle. Estas alterações comportamentais não foram observadas nos animais que receberam o kefir.

5.2 Efeitos do BPA sobre a pressão arterial

Os animais contaminados com BPA apresentaram um aumento da pressão arterial sistólica (+ 9%, Figura 5A), pressão arterial diastólica (+10%, Figura 5B) e pressão arterial média (+9%, Figura 5C) em comparação com o grupo controle. Os animais tratados com kefir, não apresentaram elevação dos níveis pressóricos em relação ao grupo controle, evidenciando o potencial efeito anti-hipertensivo deste leite fermentado (Figura 5).

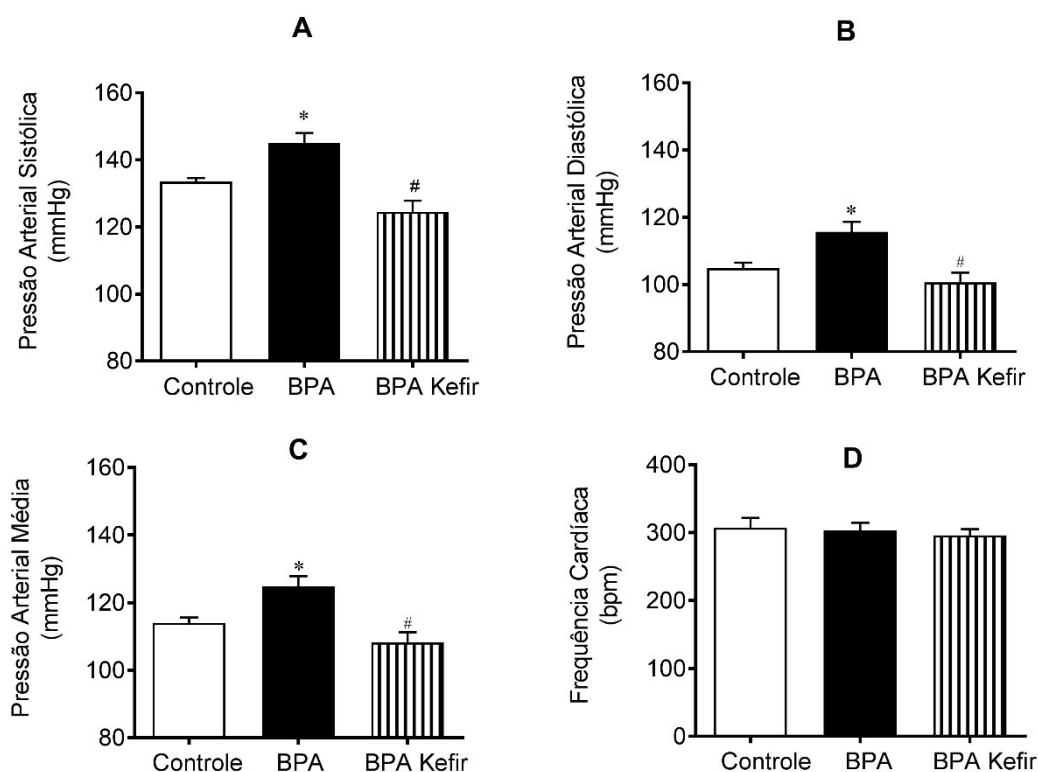


Figura 5. Análise do efeito da contaminação por Bisfenol A sobre parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos acordados Wistar (n: 8 a 10 por grupo). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo BPA.

5.3 Efeitos do BPA sobre a reatividade vascular

No teste de contração à Fenilefrina (Figura 6), a curva dose-efeito dos animais contaminados por BPA não foi estatisticamente diferente da curva dos animais do grupo controle. No entanto, o grupo que recebeu kefir apresentou menor resposta contrátil em relação tanto ao controle quanto ao grupo BPA.

O relaxamento induzido por ACh nos anéis de aorta em todos os grupos está demonstrado na Figura 6, na tabela estão descritos os três principais parâmetros que determinam o resultado da curva (R_{max} , EC_{50} e AUC).

O grupo tratado com BPA apresentou valor de R_{max} de $\sim 81 \pm 3\%$ (Figura 6A), significativamente menor que o observado no grupo controle, $\sim 95 \pm 2\%$. Similarmente, a AUC desse grupo foi estatisticamente diminuída quando comparada ao controle ($\sim 249 \pm 19$ a.u. x 319 ± 22 a.u. $p < 0,05$). No entanto, não observamos diferença entre os grupos no parâmetro que avalia a sensibilidade.

A administração diária de Kefir promoveu restauração da resposta vasodilatadora, aumentando a R_{max} ($92 \pm 2\%$, $p < 0,05$), a sensibilidade ($7,8 \pm 0,1 - \log M$ ACh, $p < 0,05$) à ACh, mantendo a AUC (345 ± 20 a.u. $p < 0,01$) similar a apresentada pelo grupo controle.

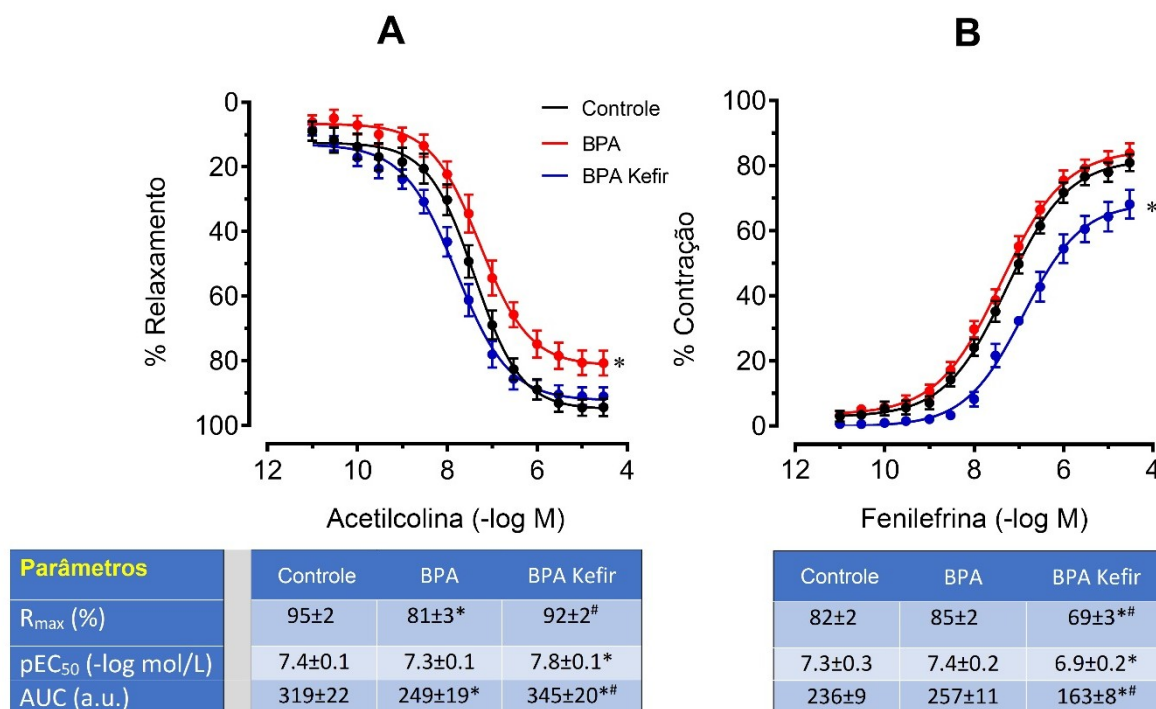


Figura 6. Efeitos do BPA sobre a reatividade vascular à ACh (à esquerda) e Fenilefrina (à direita) em ratos Wistar (n: 9 a 10 por grupo). Os resultados de R_{max} , EC_{50} e AUC estão demonstrados nas tabelas. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle; [#] $p < 0,05$ vs. grupo BPA.

Conforme descrito acima e considerando que o BPA não causou alteração na resposta vaso-contrátil à fenilefrina em nossos animais, o foco do nosso estudo passou a ser os mecanismos que envolvem os prejuízos da vasodilatação induzida pela ACh.

5.4 Mecanismo de disfunção endotelial: o papel do NO

A figura 7 mostra as curvas concentração-resposta à ACh na presença e ausência de inibição da via NOS por L-NAME nos três grupos de animais. O bloqueio dos anéis aórticos com L-NAME causou uma redução acentuada na resposta vasodilatadora à ACh no grupo controle (Figura 7A), atingindo um R_{max} de $0,9 \pm 0,1\%$, no grupo BPA $6,9 \pm 0,3\%$ e no grupo BPA kefir $1,6 \pm 0,2\%$ (Figura 7B).

Dessa forma podemos observar que a contaminação por BPA causa uma redução da biodisponibilidade do NO e o tratamento com o kefir aumentou a disponibilidade desse importante vasodilatador em vasos de condutância.

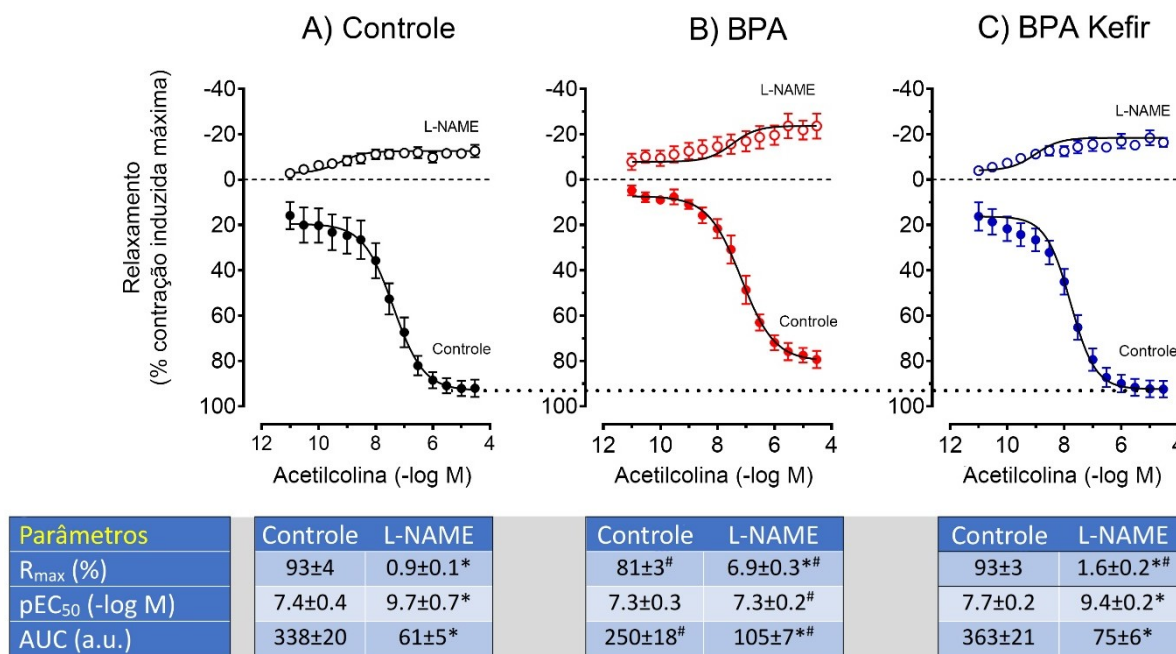


Figura 7. Avaliação da via molecular da NOS/cGMP em anéis de aorta nos três grupos de animais estudados através do inibidor inespecífico L-Name (n: 8 a 10 por grupo). Os gráficos acima mostram os valores antes e depois do bloqueio nos três grupos. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle (sem bloqueio no respectivo grupo); [#] $p < 0,05$ vs. grupo controle.

5.5 Mecanismos de disfunção endotelial: o papel das ROS

O grupo BPA (Figura 8B) apresentou uma resposta vasodilatadora diminuída em relação ao grupo controle e kefir (Figuras 8A e 8C). O bloqueio das ROS com a apocinina reverteu essa diminuição na resposta vasodilatadora (R_{max} 73 $\pm$ 4% vs 85 $\pm$ 4%) nesse grupo (Figura 8B). Conforme mostrado na figura 8, nos animais controle não foi observado diferença entre a curva dose-efeito antes e após o bloqueio com apocinina (R_{max} 84 $\pm$ 4% vs 83 $\pm$ 3%). E no grupo tratado com kefir, a curva dose-efeito já se apresentava semelhante aquela do grupo controle, sendo assim, a repetição do teste mediante bloqueio com apocinina não resultou em qualquer alteração significativa.

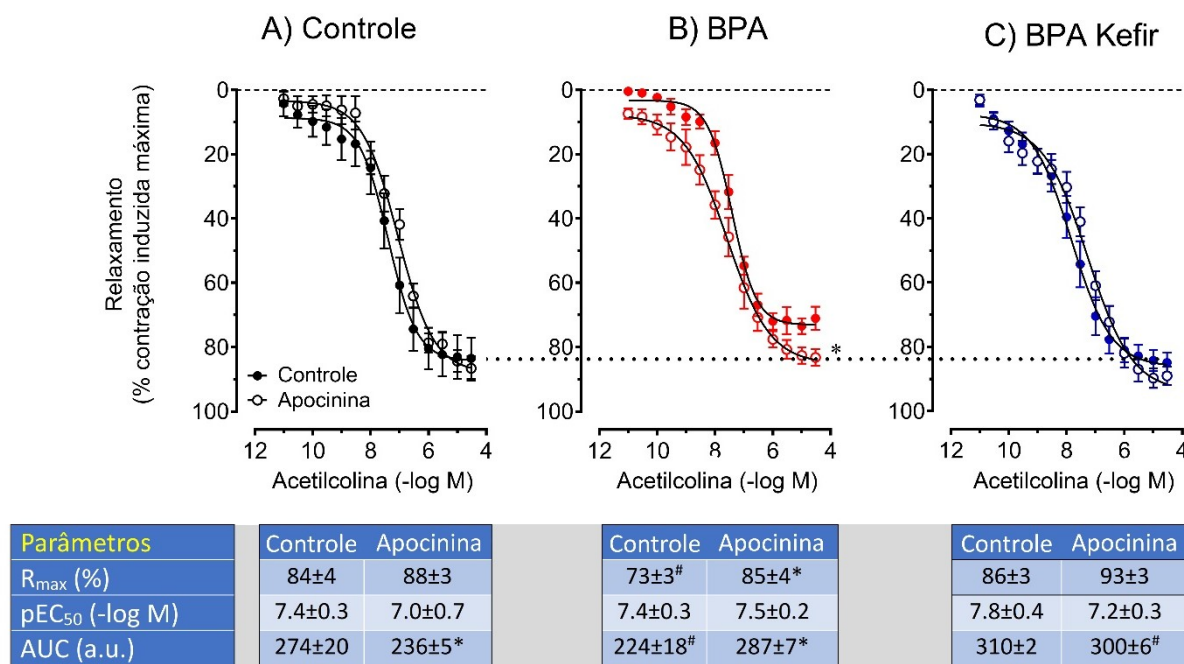
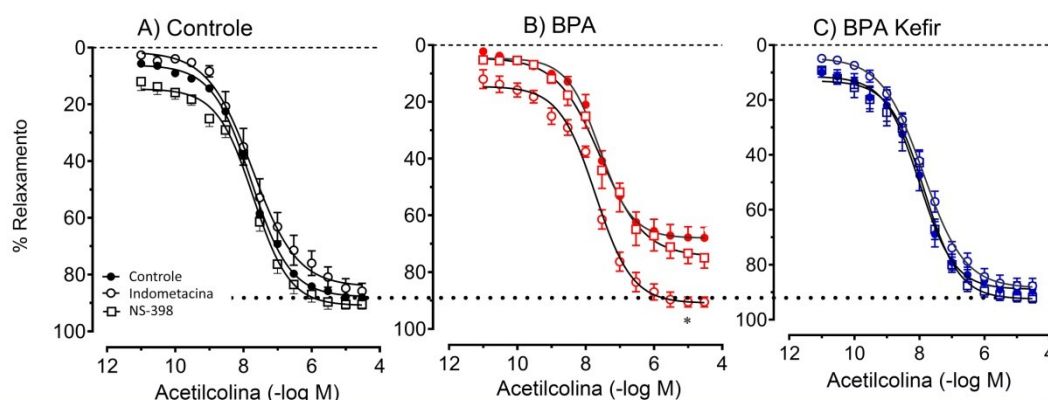


Figura 8. Contribuição do estresse oxidativo para a disfunção endotelial. Efeito do bloqueio da atividade da NADPH oxidase com a apocinina na curva de concentração-resposta acumulativa de acetilcolina (ACh) nos três grupos (n: 8 a 10 por grupo). Os valores estão expressos como média ± EPM, *p<0,05 vs. grupo controle (sem bloqueio no respectivo grupo); [#]p<0,05 vs. grupo controle.

5.6 Mecanismos de disfunção endotelial: o papel dos prostanóides

No grupo contaminado com BPA (Figura 9B), o bloqueio das Cox 1 e 2 através da utilização da indometacina foi capaz de normalizar a curva concentração resposta à ACh quando comparado com a curva controle, sem bloqueio. Conforme mostrado na figura 9, nesse grupo, o bloqueio com indometacina causou um aumento significativo na R_{max} de 66±4% para 90±4% e também na AUC, de 212±17% para 316±18%. Não foi observado diferença nos parâmetros analisados com o bloqueio seletivo da COX 2, com a utilização do NS 398. Diferentemente, no grupo controle (Figura 9A), a utilização dos bloqueadores da COX, não promoveu alteração significativa na curva concentração resposta à ACh. Nos animais contaminados com BPA que receberam kefir (Figura 9C), a disfunção endotelial foi totalmente abolida e, deste modo, as curvas se comportaram semelhantemente ao grupo de animais controle, isto é, os bloqueios não promoveram alterações.



Parâmetros & Mecanismos		Controle	BPA	BPA Kefir
R_{max} (%)	Controle	85±4	66±4*	91±4
	Indometacina	77±3	90±4*#	91±3*
	NS-398	88±4	70±4*	92±4
pEC_5 (-log M)	Controle	7.6±0.3	7.4±0.4	8.0±0.4
	Indometacina	7.8±0.4	7.6±0.4	7.7±0.3
	NS-398	7.7±0.4	7.6±0.3	7.9±0.4
Δ AUC (a.u.)	Controle	263±18	212±17	343±17
	Indometacina	278±15	316±18**	338±12
	NS-398	305±17	228±12	350±17

Figura 9. Avaliação da participação dos Prostanoides. Efeito do bloqueio da atividade da Cox 1 e 2 com Indometacina e NS 398 na curva de concentração-resposta à acetilcolina (ACh) nos três grupos (n: 8 a 10 por grupo). Os valores estão expressos como média ± EPM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle (sem bloqueio no respectivo grupo); # $p < 0,05$ vs. grupo controle.

5.7 Avaliação da participação das principais vias de produção de ROS nas células da Aorta

A figura 10 mostra que a contaminação por BPA provocou um aumento na produção de $\bullet O_2^-$ (1.942 ± 39 a.u.) (Figura 10A) e H_2O_2 (1.573 ± 146 a.u.) (Figura 10B), $ONOO^-/\bullet OH^-$ (2.078 ± 287 a.u.) (Figura 10C), em relação ao grupo controle ($\bullet O_2^-$: 1.302 ± 12 ; H_2O_2 : 1.047 ± 60 ; $ONOO^-/\bullet OH^-$: 1.052 ± 28 a.u.) (Figura 10A, B e C). Esse aumento do estresse oxidativo foi abolido pelo uso do kefir ($\bullet O_2^-$: 1.298 ± 57 ; H_2O_2 : 990 ± 21 ; $ONOO^-/\bullet OH^-$: 723 ± 20 a.u.), respectivamente (Figura 10A, B e C). A citometria de fluxo também foi utilizada para avaliar a produção de NO (através da utilização do corante DAF) na aorta dos três grupos de animais (Fig. 10D). A produção de NO foi significativamente menor nos animais contaminados por BPA (1.374 ± 50 a.u.), em comparação ao grupo controle (2.777 ± 96 a.u.) esse efeito foi revertido no grupo que recebeu o kefir (2.514 ± 57 a.u.).

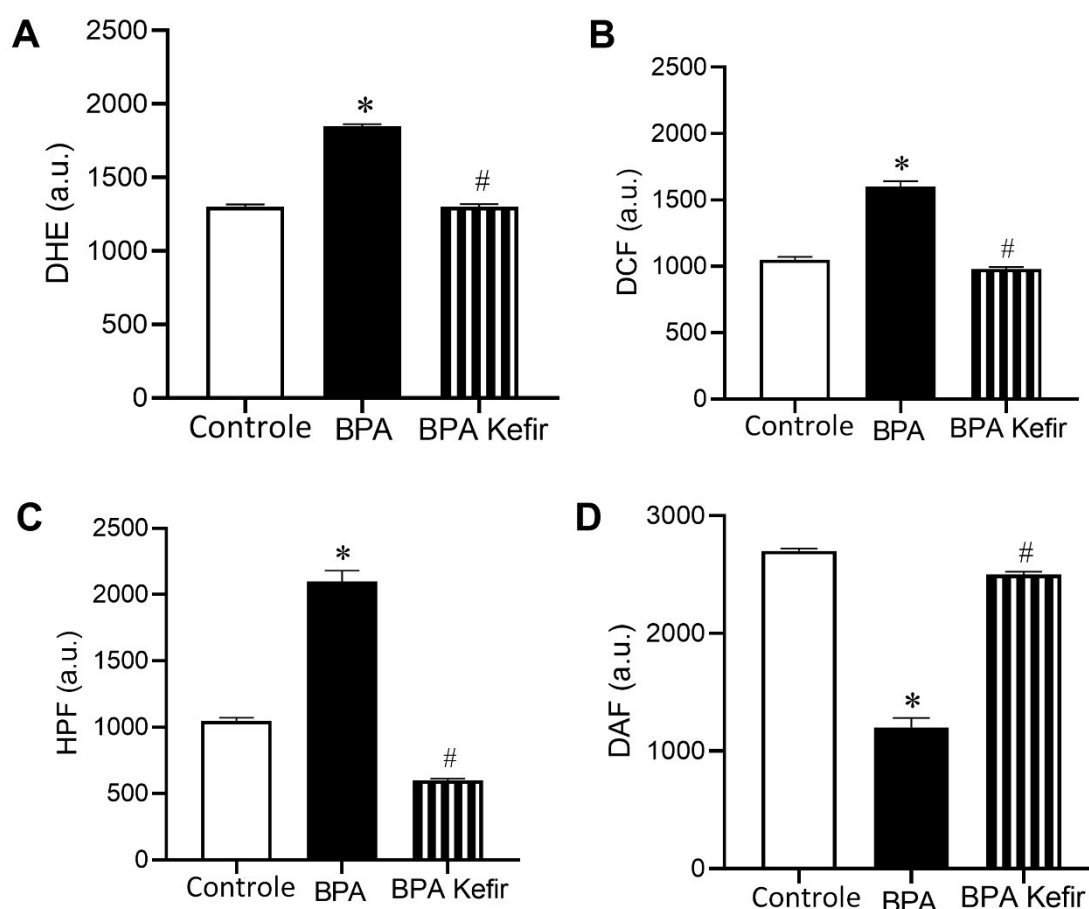


Figura 10. Avaliação da produção de ROS (O_2^- , B: H_2O_2 , C: $ONOO^-/\bullet OH^-$) e de NO pela intensidade de fluorescência emitida pelo DHE, DCF, HPF e DAF, por citometria de fluxo (figuras A, B, C, D, respectivamente) em células vasculares isoladas de aorta (n: 6 a 7 por grupo). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, *p<0,05 vs. grupo controle; #p<0,05 vs. grupo BPA.

5.8 Efeitos do BPA sobre a fragmentação do DNA em células de aorta

A análise do conteúdo de DNA em células isoladas da aorta dos animais, figura 7, revelou um aumento expressivo na taxa de fragmentação do DNA das células de animais contaminados com BPA ($37 \pm 2,3$ %) quando comparado com o grupo controle ($16 \pm 1,4$ %). A administração de kefir foi capaz de diminuir significativamente a fragmentação do DNA de células vasculares ($9,5 \pm 0,7$ %) em relação ao grupo controle.

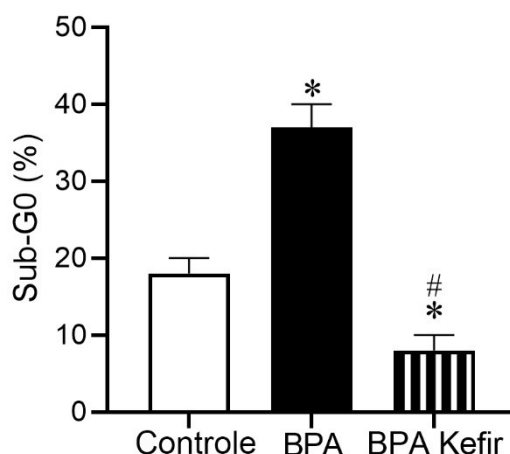


Figura 11. Quantidade de células na fase Sub-G0 do ciclo celular em células de aorta (n: 6 a 7 por grupo). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo BPA.

5.9 Efeitos do BPA sobre a viabilidade e apoptose de células da aorta

Na figura 12 observamos que a contaminação ambiental por BPA diminui a viabilidade celular. O grupo contaminado apresentou redução da viabilidade quando comparado ao controle ($61 \pm 2,85$ x $70 \pm 2\%$) e o tratamento com Kefir foi capaz de aumentar significativamente este parâmetro ($86 \pm 0,91\%$) (Figura 12A). O oposto foi observado em relação à células inviáveis (Figura 12C). Simultaneamente, houve um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas no grupo BPA ($11,6 \pm 1\%$) quando comparado ao grupo controle ($6,0 \pm 1\%$) (Figura 12B). O grupo contaminado que recebeu kefir apresentou diminuição significativa na apoptose ($3,0 \pm 0,9\%$).

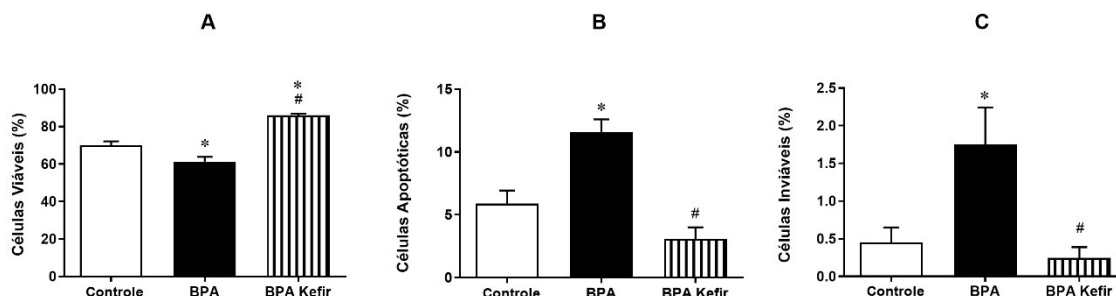


Figura 12. Efeitos do BPA sobre a viabilidade e apoptose das células de aorta. Os gráficos mostram a porcentagem de células viáveis, de células apoptóticas e células inviáveis (n: 6 a 7 por grupo). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo BPA.

5.10 Análise da arquitetura endotelial por microscopia eletrônica de varredura

A análise das fotomicrografias (Fig. 13) demonstrou que a aorta torácica dos animais do grupo BPA possuía uma evidente irregularidade na superfície endotelial que se apresentou descontínua e acidentada, com perda de sua estrutura normal, expondo a membrana elástica interna, observando-se a ocorrência de muitas lacunas (setas pretas). A administração do kefir conferiu proteção às células e à superfície endotelial dos animais que receberam esse tratamento, que embora ainda tenha apresentado algumas lacunas (seta preta) foi parcialmente coberta (seta branca), com menor extensão de áreas lesadas na camada íntima. Já o grupo controle mostrou uma camada de células endoteliais confluentes (seta branca) e superfície regular.

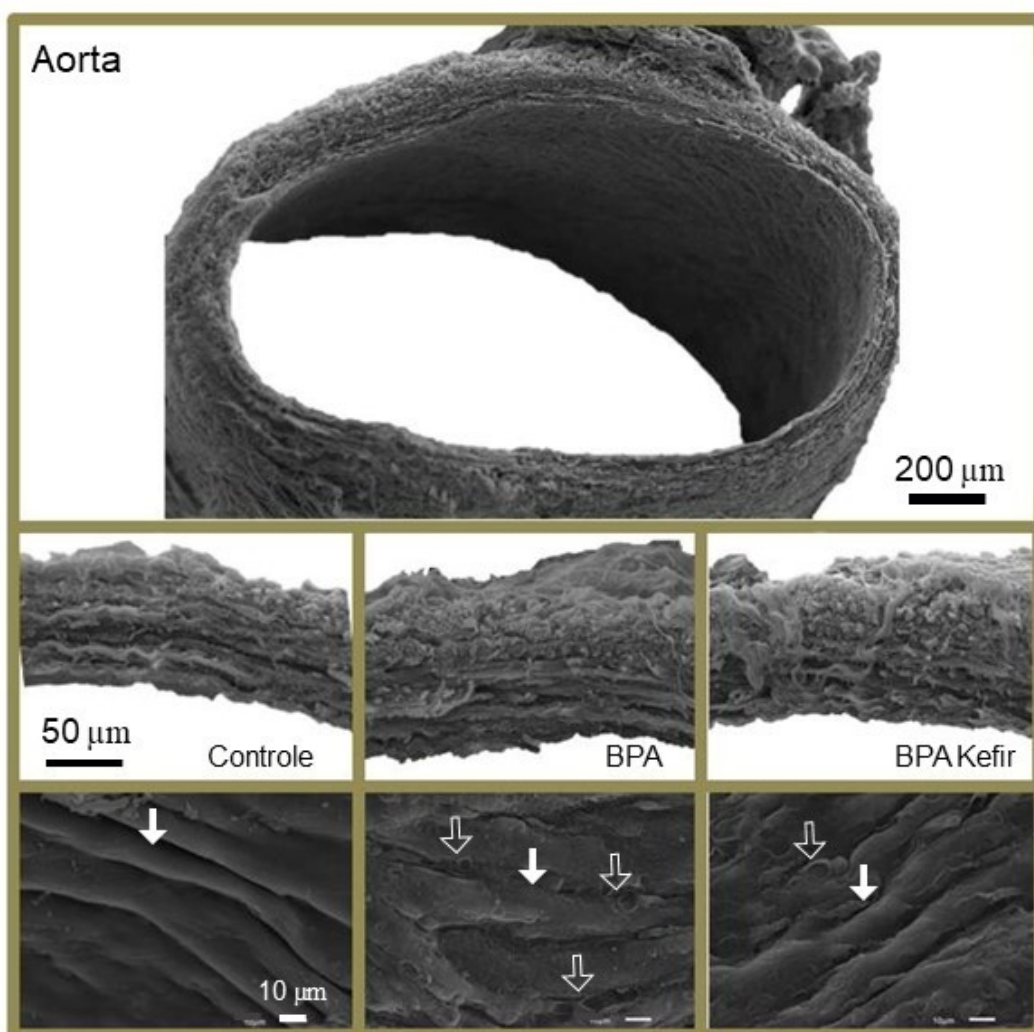


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a estrutura endotelial representativa de aorta de rato Wistar, BPA e BPA-kefir (n: 4 por grupo). Imagem superior: corte transversal da aorta de um animal do grupo controle. Abaixo: estrutura endotelial nos diferentes grupos. Barra de escala: 200, 50 e 10 µm. Seta branca: Células endoteliais. Seta preta: diminuição do espessamento da superfície endotelial.

6. DISCUSSÃO

Dentre os vários disruptores endócrinos conhecidos, o BPA é o composto mais utilizado pelo homem, com uma produção mundial anual de mais de 5 milhões de toneladas (9). Embora o contaminante esteja presente em muitas formas no dia a dia desse mundo moderno e extremamente industrializado, acredita-se que uma das maiores fontes de exposição ao BPA seja através da alimentação, por meio da contaminação dos alimentos e bebidas que ficam em contato com a substância durante seu armazenamento (56).

A instabilidade química entre as moléculas do BPA possibilita que o mesmo se desprenda da embalagem e contamine os alimentos, através de uma reação entre o BPA com o ácido ou base dos alimentos ou pela exposição a variações de temperaturas (10, 57).

Refletindo a dramática contaminação ambiental muitas vezes despercebida pela maioria das pessoas, Calafat *et al.* (58), demonstraram que o BPA estava presente em aproximadamente 95% das amostras de urina da população de referência de 394 adultos nos Estados Unidos (58). Ele também foi identificado no soro de mulheres grávidas, no líquido amniótico e no sangue do cordão umbilical durante o nascimento (14). Devido ao seu uso em grande escala pela indústria e o descaso dos órgãos fiscalizadores em diversos países, é possível que em muitos locais, o próprio meio ambiente, água, ar e solo estejam contaminados (12).

Tendo em vista o grande número de publicações alertando para os perigos do BPA, alguns países já baniram seu uso. Outros, como o Brasil, optaram por proibir a importação e fabricação de mamadeiras e artigos similares destinados à alimentação de lactentes que contenham BPA, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários destes produtos (24). Porém, sabe-se que hoje o BPA está presente na vida de praticamente todas as pessoas, medidas pontuais não têm sido eficazes no sentido de impedir a contaminação humana e ambiental.

Este estudo foi desenhado para investigar os efeitos da contaminação por BPA na função endotelial de ratos Wistar. Nosso principal objetivo foi avaliar a influência do Bisfenol-A na reatividade vascular e os possíveis efeitos do kefir nesse contexto. Sabe-se que a disfunção endotelial, na maioria das doenças cardiovasculares, pode ser caracterizada por uma perda na vasodilatação e/ou

aumento da resposta contrátil. Nesse sentido, verificamos primeiramente tanto a resposta contrátil ao agonista adrenérgico Fenilefrina quanto a resposta vasodilatadora ao agente padrão ouro para avaliação da reatividade vascular, Acetilcolina. Usando a abordagem padrão-ouro para avaliar a reatividade vascular dos anéis aórticos, observamos uma resposta de relaxamento prejudicada à ACh no grupo BPA, que ocorreu principalmente devido a um desequilíbrio nas vias NO/ROS, acompanhado por danos na superfície endotelial. Os animais contaminados tiveram menor produção de NO, apresentaram disfunção endotelial com aumento na participação de ROS no vaso e dos prostanóides vasoconstrictores. O BPA prejudicou a integridade da superfície endotelial vascular e, em células de aorta, causou danos ao DNA, diminuindo a viabilidade com simultâneo aumento da apoptose celular. A contaminação por BPA na infância também levou a um aumento no ganho de peso corporal e elevação na pressão arterial. Concomitantemente, demonstramos que a administração diária do kefir, causou uma melhora significativa da função endotelial vascular dos animais contaminados por BPA e minimizou de forma significativa os impactos causados pelo BPA.

Um estudo realizado por nosso grupo, avaliou os efeitos do tratamento crônico com kefir em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (26). Neste trabalho demonstramos, pela primeira vez, que o kefir é capaz de atenuar a disfunção endotelial em vasos de condutância de animais SHR, através da diminuição da produção de ROS e, conseqüentemente, reestabelecendo a biodisponibilidade de NO. Além disso, a administração de kefir também foi capaz de restaurar o endotélio da aorta, contribuindo para a reparação morfológica nos animais estudados (26).

Em relação ao efeito obesogênico do BPA, é importante enfatizar que estudos recentes experimentais (59) e clínicos (60-63) têm mostrado resultados semelhantes. A contaminação por BPA tem sido relacionada a uma tendência ao excesso de peso em diversos trabalhos (62, 63). Uma coorte realizada com 500 pares de mães e filhos mostrou aumento de peso associado à contaminação por BPA na Grécia (60). Neste estudo, os pesquisadores avaliaram as concentrações de BPA em amostras de urina coletadas da mãe durante a gestação e dos filhos 2,5 e 4 anos após o nascimento e observaram maior prevalência de sobrepeso/obesidade à medida que as crianças ficavam mais velhas.

Alguns mecanismos fisiológicos foram projetados tentando explicar a associação entre exposição ao BPA e obesidade. Por exemplo, estudo *in vitro* de Masuno *et al.* (64) mostraram que o BPA promove o acúmulo de gordura através da diferenciação de adipócitos. Além disso, Hugo *et al.* (65) demonstraram que O BPA se liga aos receptores de estrogênio nos adipócitos, inibindo a liberação do hormônio anti-obesidade, adiponectina, contribuindo para o ganho de peso.

Em relação à elevação dos níveis pressóricos causada pelo BPA, o mesmo foi observado em camundongos de 8 semanas de idade, contaminados por via oral, utilizando uma ampla gama de doses (4 nmol/L a 400 µmol/L em água potável) durante 30 dias. O grupo tratado apresentou aumento de pressão arterial sistólica e diastólica em relação ao não tratado (27). Em humanos, uma coorte prospectiva de 486 pares mãe-criança na Coreia, a maior exposição pré-natal ao BPA (medida na vigésima semanas de gestação) foi associada a um aumento significativo na pressão arterial aos 4 anos (66).

De forma ainda não evidenciada anteriormente, demonstramos a ação protetora do kefir contra a elevação dos níveis pressóricos causada pela contaminação por BPA em nossos animais. Estudos anteriores nossos e de outros grupos de pesquisa mostraram os efeitos benéficos do kefir em diminuir a pressão sanguínea (26, 67, 68, 69, 70), sugerindo que esta bebida de leite fermentado pode ser útil em diferentes eventos cardiovasculares. Estes efeitos benéficos foram explicados pelo menos em parte, pela presença de bactérias e fungos nos grãos de kefir, por haver neles uma relação simbiótica próxima, resultando na produção de elementos bioativos (26,71,72).

Estudos sugerem que o consumo crônico de produtos lácteos fermentados com compostos bioativos apresentam efeitos que impedem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo o risco de hipertensão (72, 73). Pesquisas ômicas, como as de proteômica, têm identificado moléculas provavelmente responsáveis pelos efeitos biológicos observados nos tratamentos com bebidas lácteas (70, 74, 75).

Este racional é corroborado por um estudo recente publicado por nosso laboratório realizado por Amorim *et al.* (70), no qual os efeitos do kefir foram avaliados em um modelo de hipertensão renovascular em animal. Nesse trabalho, o tratamento com kefir resultou em uma diminuição de 37mmHg na pressão arterial sistólica, com redução da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA) em

19%. Foram identificados 35 peptídeos anti-hipertensivos que através de uma análise “docking molecular” apresentaram interação com a enzima conversora de angiotensina sendo um possível inibidor da ECA (70).

Em nosso estudo, observamos que animais contaminados com BPA apresentaram um prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, ou seja, uma resposta diminuída à ACh quando comparados ao grupo controle, sendo que o principal mecanismo envolvido nesta vasodilatação reduzida é um desequilíbrio entre NO/ROS acompanhado de dano à estrutura do endotélio e alterações morfológicas. A contaminação por BPA resulta em deterioração da superfície do endotélio acompanhada por desequilíbrio NO/ROS e aumento de prostanóides vasoconstritores, como revelado através de bloqueadores específicos utilizados em protocolos clássicos de reatividade (76).

Esse é o primeiro estudo que demonstra esses efeitos da contaminação por BPA na infância e também que o tratamento com kefir é capaz de restaurar a função endotelial desses animais, reduzindo a produção de ROS, aumentando a biodisponibilidade de NO. Vários estudos epidemiológicos indicam que a exposição ao BPA na população adulta está associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, incluindo doença da artéria coronária cardíaca, angina, infarto, hipertensão e doença arterial periférica. Estudos experimentais sugerem que a exposição ao BPA tanto aguda como crônica poderia afetar o funcionamento fisiológico do sistema cardiovascular e diversos autores apontam para a necessidade de aprofundar a avaliação do potencial de toxicidade de BPA sob esse ponto de vista, incluindo a realização de pesquisas que investiguem os mecanismos celulares e moleculares pelos quais o tóxico do BPA levaria à uma disfunção endotelial e consequentes danos cardiovasculares (27,4,11).

Nossos dados contrariam os resultados encontrados no único estudo que investigou a reatividade vascular em animais contaminados por BPA publicado até o momento (28). Os autores avaliaram os efeitos da administração diária de BPA em camundongas prenhas correlacionando a contaminação com suas repercussões cardiovasculares. Os resultados desse trabalho mostram que a exposição pré-natal ao BPA resulta em alterações no crescimento, aumento da adiposidade e prejuízos na homeostasia da glicose em filhotes machos e fêmeas. A prole também teve pressão sistólica aumentada e, nos filhotes machos, isso foi acompanhado por um tônus vascular prejudicado. Ao contrário do nosso, naquele estudo, foi mostrado na

curva dose efeito ao agonista α_1 -adrenérgico, fenilefrina, uma exacerbação da resposta vasoconstrictora do grupo contaminado por BPA em relação ao controle. Na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, também diferentemente dos nossos resultados, não se verificou uma influência do contaminante sob o efeito da ACh. Por outro lado, na avaliação da resposta vasodilatadora independente do endotélio, através do doador de óxido nítrico, Nitroprussiato de Sódio (SNP), verificou-se uma atenuação da resposta vasodilatadora no grupo contaminado (28).

Para abordar os mecanismos pelos quais o kefir produz efeitos benéficos sobre a função endotelial, primeiro investigamos a participação da via do NO/cGMP neste processo, examinando a resposta vasodilatadora dos anéis aórticos à ACh dependente do endotélio, inibindo a NOS com L-NAME.

Ao estudarmos o papel da eNOS sobre o relaxamento vascular das aortas dos nossos animais utilizando o bloqueio farmacológico L-NAME, verificamos que o bloqueio da eNOS promoveu uma redução drástica na vasodilatação do grupo controle, o que demonstra a importância do NO em promover a vasodilatação nesses animais. O bloqueio de eNOS no grupo BPA aboliu o relaxamento induzido por ACh e levou a vasoconstricção dose dependente à ACh, indicando assim uma menor ação da acetilcolina em promover uma resposta vasodilatadora dependente do endotélio, prevalecendo sua ação vasoconstrictora no músculo liso vascular, que podemos atribuir à reduzida atividade da via da NOS no endotélio. O grupo que recebeu kefir apresentou resposta de relaxamento similar ao controle o que se refletiu na ΔAUC (diferença entre antes e depois do bloqueio L-NAME) que foi maior no grupo controle e no grupo kefir indicando um aumento significativo da via do NO na vasodilatação induzida por ACh em relação ao grupo BPA. O relaxamento residual sob o bloqueio de NOS com L-NAME pode ser atribuído aos fatores relaxantes da via dos prostanoídes, como a prostaciclina PGI₂.

Estudos realizados em diferentes modelos experimentais avaliaram o NO basal e verificaram sua redução em diversas doenças associadas à disfunção endotelial (77). Assim, nossos resultados apontam para uma diminuição da biodisponibilidade de NO e a disfunção endotelial nos animais contaminados por BPA e que o tratamento com kefir aumentou de maneira significativa o NO basal, acarretando numa melhora da função endotelial.

Verificamos também a influência das ROS em modular a vasodilatação, sabe-se que a maior produção de ROS ocorre por conta da NADPH oxidase no sistema

mitocondrial. Para avaliar a contribuição de ROS no prejuízo da função endotelial foi estudado em um grupo de animais a resposta de relaxamento à ACh pela incubação dos anéis aórticos com apocinina. Não houve diferença entre a curva dose-efeito antes e após o bloqueio com apocinina no grupo controle, porém, no grupo BPA, o bloqueio da ROS reverteu a diminuição da resposta vasodilatadora. No grupo BPA Kefir que já apresentava curva dose-efeito semelhante ao controle, o bloqueio com apocinina não resultou em qualquer alteração significativa.

Foi observado que os animais BPA apresentavam um aumento da participação de ROS em comparação aos animais controle, sendo que o kefir foi capaz de diminuir o aumento da participação das ROS no relaxamento, reduzindo então, o estresse oxidativo e promovendo uma melhora na vasodilatação. Nossos resultados estão de acordo com outros que relacionam a disfunção endotelial a um aumento da geração de ROS e uma diminuição da biodisponibilidade de NO (78, 79). Outros autores demonstram uma relação entre hipertensão e estresse oxidativo com o aumento da produção de ROS e também um prejuízo na reatividade vascular (80, 81).

Além das ROS, os prostanóides vasoconstritores derivados da ciclooxigenase 1 (COX-1) e 2 (COX-2) são mediadores que podem participar da disfunção endotelial (82). Diversos estudos têm demonstrado que há um aumento na expressão da COX-2 e da participação de seus derivados na vasoconstrição dependente do endotélio, assim como a resposta vasodilatadora em pessoas hipertensas e em vários modelos animais de hipertensão (83, 84). Em condições fisiológicas, a atividade da COX-1 parece estar envolvida na produção de PG12 que tem ação vasodilatadora, enquanto que na hipertensão a COX-1 sintetiza prostanoides vasoconstritores (85). Embora através de mecanismos ainda não completamente definidos, parece haver uma estreita relação entre ROS e produtos derivados da COX. As ROS podem aumentar a expressão e ou ativação da COX (86, 87) e tratamentos antioxidantes tendem a abolir o papel da COX na resposta contrátil dependente do endotélio (88).

Em nosso estudo avaliamos a participação dos derivados da COX na vasodilatação mediada pela ACh por meio do bloqueio com indometacina associado ao NS 398. Nossos dados mostram que a contaminação por BPA diminui a resposta vasodilatadora no grupo controle e que o bloqueio da indometacina, promoveu a mesma vasodilatação padrão do grupo não contaminado, mostrando a participação

dos prostanóides nesse contexto. O bloqueio específico da COX 2, com NS398, não mostrou diferença no grupo BPA o que nos diz que a via que está influenciando nessa redução da vasodilatação é via da COX 1. Quando comparamos a área abaixo da curva dos três grupos observamos que nos animais contaminados por BPA há uma menor participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico quando comparados com o grupo controle, sugerindo a participação desta via no relaxamento à ACh. O kefir foi capaz de aumentar a participação dos derivados da COX no relaxamento à ACh, conforme mostramos anteriormente, esse simbiótico pode diminuir a produção de ROS, aumentando a vasodilatação, promovendo uma melhora da função endotelial (26).

A disfunção endotelial geralmente está relacionada a um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (89) e nosso grupo comprovou anteriormente que a utilização do kefir reduz o estresse oxidativo, aumentando a biodisponibilidade de NO nas células endoteliais de aortas (26). Para confirmar a hipótese de que a contaminação por BPA na infância levaria a um desequilíbrio entre a produção de ROS/NO e que o kefir poderia ter um efeito protetor nesse contexto, utilizamos a citometria de fluxo para avaliar a produção de algumas espécies reativas de oxigênio ($\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 , e $\bullet\text{ONOO-}/\bullet\text{OH-}$) e a produção de NO na aorta dos animais. O BPA provocou um aumento na produção das ROS estudadas e uma diminuição significativa na produção de NO. O grupo que recebeu o simbiótico kefir e o BPA apresentou resultados similares ao controle, o que evidencia o poder antioxidante da bebida num contexto de disfunção endotelial causada pela contaminação por BPA na infância.

Os resultados encontrados estão de acordo com o observado em outros estudos que demonstraram que o tratamento com kefir em ratos e humanos foi capaz de reduzir o desenvolvimento de fatores de risco associados a doenças cardiovasculares (90, 91). Outros trabalhos têm observado uma melhora da reatividade vascular associada com a redução do estresse oxidativo em seres humanos e animais com distúrbios metabólicos quando tratados com probióticos *Lactobacillus* (69, 90).

Outro dado interessante obtivemos quando avaliamos a fragmentação do DNA em células de aorta. A análise do ciclo celular, mostra um aumento da taxa de fragmentação celular no grupo contaminado por BPA e a ação reparadora do Kefir nesse contexto. O mesmo ocorreu ao avaliarmos a viabilidade e apoptose nas

células de aorta, ou seja, o BPA diminui a viabilidade celular, e essa ação é abolida pela administração de Kefir. O aumento nos níveis de ROS se correlacionou positivamente com os níveis de apoptose indicando que o estresse oxidativo pode estar envolvido nas vias de ativação apoptóticas. O kefir foi capaz de proteger o DNA das células da aorta dos efeitos do estresse oxidativo. A restauração do equilíbrio NO/ROS observado na aorta contribuiu para o restabelecimento da função normal dessas células, conforme observado em estudos recentes de nosso laboratório (26, 52, 54, 77, 92-94) e por outros (80, 95, 96).

Os efeitos da contaminação por BPA também puderam ser observados na morfologia dos vasos estudados. Enquanto o grupo controle apresentava uma camada de células endoteliais confluentes, os contaminados por BPA exibiram superfície endotelial irregular, descontínua e acidentada e os animais que receberam tratamento com kefir apresentaram uma superfície endotelial contendo células regeneradas, que cobriam parcialmente a área íntima lesada. Diversos fatores levam às alterações estruturais e funcionais dos órgãos, o aumento na produção de ROS é muito comum nesses casos. Estudos mostram que a interação entre estresse oxidativo e inflamação influencia diretamente a mobilização de células progenitoras endoteliais (97) e, indiretamente, leva à desnudação da superfície endotelial (98). Em estudo anterior (26) mostramos que o kefir promove aumento da produção de NO pelas células endoteliais, aumentando a mobilização das EPC para locais onde há lesão endotelial, uma vez mobilizadas na circulação periférica, as EPC localizam as áreas lesadas da artéria e contribuem na sua re-endotelização (99, 100).

7. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra, pela primeira vez, que a contaminação por Bisfenol A na infância leva à uma disfunção endotelial em vasos de condutância de ratos Wistar, aumenta o ganho de peso corporal, eleva os níveis pressóricos e provoca dano às células da aorta. Nesse trabalho comprovamos também que, o simbiótico kefir é capaz de atuar positivamente no contexto da contaminação por BPA, atenuando a disfunção endotelial, abolindo o aumento na produção de ROS, reestabelecendo a biodisponibilidade de NO e contribuindo para a reparação morfológica nos vasos dos animais estudados. O presente trabalho é inovador no que tange a aplicação de um alimento funcional para prevenção dos efeitos da contaminação por BPA. Além disso, nossos animais foram contaminados a partir do desmame, por volta do vigésimo quinto dia de vida (o que em humanos equivaleria a cerca de 6 meses de idade) até por volta dos 3 meses (o que corresponderia a uma criança de 2 anos). Isso demonstra que quando a contaminação ocorre, mesmo após a gestação, período geralmente apontado como de maior suscetibilidade aos contaminantes ambientais, é suficiente para deixar marcas na saúde do indivíduo por toda a sua vida.

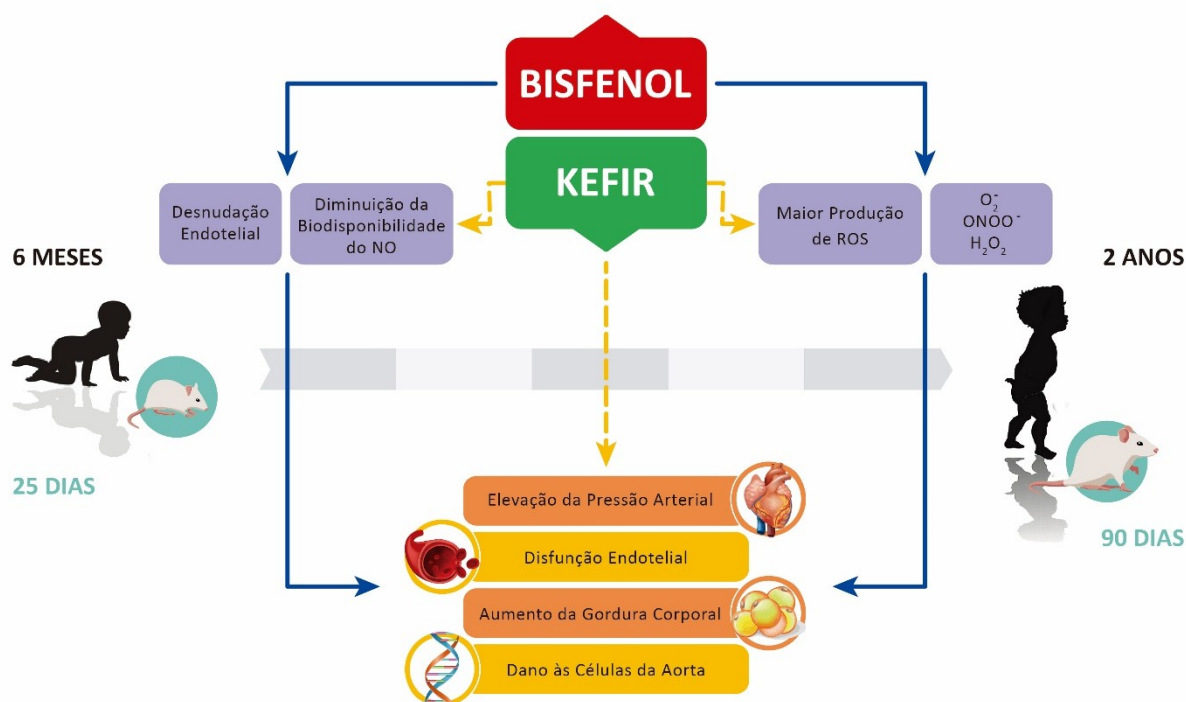
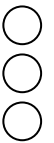


Figura 14. Esquema simplificado sobre os efeitos da contaminação por BPA na infância e a ação protetora do kefir. Fonte: Própria (2019).



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 - Angeli JK, Cruz Pereira CA, de Oliveira Faria T, Stefanon I, Padilha AS, Vassallo DV. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:838-48. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.167. Epub 2013 Aug 22. PubMed PMID: 23973752.

- 2 - Lemos NB, Angeli JK, Faria Tde O, Ribeiro Junior RF, Vassallo DV, Padilha AS, Stefanon I. Low mercury concentration produces vasoconstriction, decreases nitric oxide bioavailability and increases oxidative stress in rat conductance artery. *PLoS One*. 2012;7(11):e49005. doi: 10.1371/journal.pone.0049005. Epub 2012 Nov 7. PubMed PMID: 23145049; PubMed Central PMCID: PMC3492199.

- 3 - Nunes KZ, Nunes DO, Silveira EA, Almenara Cruz Pereira C, Broseghini Filho GB, Vassallo DV, Fioresi M. Chronic lead exposure decreases the vascular reactivity of rat aortas: the role of hydrogen peroxide. *PLoS One*. 2015 Mar 25;10(3):e0120965. doi: 10.1371/journal.pone.0120965. eCollection 2015. PubMed PMID: 25807237; PubMed Central PMCID: PMC4373949.

- 4 - Gao X, Wang HS. Impact of bisphenol a on the cardiovascular system - epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2014 Aug 15;11(8):8399-413. doi: 10.3390/ijerph110808399. Review. PubMed PMID: 25153468; PubMed Central PMCID: PMC4143868.

- 5 - Yang O, Kim HL, Weon JI, Seo YR. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J Cancer Prev*. 2015 Mar;20(1):12-24. doi: 10.15430/JCP.2015.20.1.12. Review. PubMed PMID: 25853100; PubMed Central PMCID: PMC4384711.

- 6 - Sui Y, Park SH, Wang F, Zhou C. Perinatal Bisphenol A Exposure Increases Atherosclerosis in Adult Male PXR-Humanized Mice. *Endocrinology*. 2018 Apr

1;159(4):1595-1608. doi: 10.1210/en.2017-03250. PubMed PMID: 29425287; PubMed Central PMCID: PMC5939635.

7 - Michałowicz J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014 Mar;37(2):738-58. doi: 10.1016/j.etap.2014.02.003. Epub 2014 Feb 8. Review. PubMed PMID: 24632011.

8 - Friques, AGF. *Epidemia do Plástico - Bisfenol A (BPA): Você precisa saber!* 1. ed. Vitória: Ed. Link, 2019.

9 - Jalal N, Surendranath AR, Pathak JL, Yu S, Chung CY. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol Rep*. 2017 Dec 16;5:76-84. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.12.013. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 29854579; PubMed Central PMCID: PMC5977157.

10 - Guida M, Troisi J, Ciccone C, Granozio G, Cosimato C, Di Spiezio Sardo A, Ferrara C, Nappi C, Zullo F, Di Carlo C. Bisphenol A and congenital developmental defects in humans. *Mutat Res*. 2015 Apr;774:33-9. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.02.007. Epub 2015 Mar 6. PubMed PMID: 25796969.

11 - Rancière F, Lyons JG, Loh VH, Botton J, Galloway T, Wang T, Shaw JE, Magliano DJ. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environ Health*. 2015 May31;14:46. doi: 10.1186/s12940-015-0036-5. PubMed PMID: 26026606; PubMed Central PMCID: PMC4472611.

12 - Berkner S, Streck G, Herrmann R. Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere*. 2004 Jan;54(4):575-84. PubMed PMID: 14581060.

13 - Xin L, Lin Y, Wang A, Zhu W, Liang Y, Su X, Hong C, Wan J, Wang Y, Tian H. Cytogenetic evaluation for the genotoxicity of bisphenol-A in Chinese hamster ovary cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 Sep;40(2):524-9. doi:10.1016/j.etap.2015.08.002. Epub 2015 Aug 7. PubMed PMID: 26318564.

14 - Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011 Nov;127(3-5):204-15. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.007. Epub 2011 Aug 27. Review. PubMed PMID: 21899826; PubMed Central PMCID: PMC3220783.

15 - Friques, AGF. *Nutrição Materno-Infantil: Um guia imprescindível para o período pré-gestacional, gestação e primeiro ano.* 1. ed. São Paulo: Ed. Pandorga, 2017.

16 - Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J; Maternal and Child Undernutrition Study Group. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet.* 2008 Jan 19;371(9608):243-60. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61690-0. Review. PubMed PMID: 18207566.

17 - Costa EM, Spritzer PM, Hohl A, Bachega TA. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014 Mar;58(2):153-61. Review. PubMed PMID: 24830592.

18 - Singh S, Li SS. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):10143-53. doi: 10.3390/ijms130810143. Epub 2012 Aug 15. Review. PubMed PMID: 22949852; PubMed Central PMCID: PMC3431850

19 - Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Quesada I, Nadal Á. Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: a new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. *Endocrinology.* 2015 May;156(5):1659-70. doi: 10.1210/en.2014-1952. Epub 2015 Apr 1. PubMed PMID:25830705.

20 - De Felice B, Manfellotto F, Palumbo A, Troisi J, Zullo F, Di Carlo C, Di SpiezioSardo A, De Stefano N, Ferbo U, Guida M, Guida M. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from pregnant women exposed to BPA. *BMC MedGenomics.* 2015 Sep 7;8:56. doi: 10.1186/s12920-015-0131-z. PubMed PMID: 26345457;PubMed Central PMCID: PMC4562201.

21 - Blesson CS, Yallampalli C. Pregnancy is a new window of susceptibility for bisphenol A exposure. *Endocrinology*. 2015 May;156(5):1611-2. doi:10.1210/en.2015-1253. PubMed PMID: 25886069; PubMed Central PMCID: PMC4398767.

22 - Sanders AP, Saland JM, Wright RO, Satlin L. Perinatal and childhood exposure to environmental chemicals and blood pressure in children: a review of literature 2007-2017. *Pediatr Res*. 2018 Aug;84(2):165-180. doi: 10.1038/s41390-018-0055-3. Epub 2018 Jun 9. Review. PubMed PMID: 29884847; PubMed Central PMCID: PMC6185812.

23 - Kataria A, Levine D, Wertenteil S, Vento S, Xue J, Rajendiran K, Kannan K, Thurman JM, Morrison D, Brody R, Urbina E, Attina T, Trasande L, Trachtman H. Exposure to bisphenols and phthalates and association with oxidant stress, insulin resistance, and endothelial dysfunction in children. *Pediatr Res*. 2017 Jun;81(6):857-864. doi: 10.1038/pr.2017.16. Epub 2017 Jan 18. PubMed PMID: 28099427; PubMed Central PMCID: PMC5618435.

24 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/28748>. Acesso em: 01/03/2019.

25 - Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 2008 Sep 17;300(11):1303-10. doi: 10.1001/jama.300.11.1303. Epub 2008 Sep 16. PubMed PMID: 18799442.

26 - Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, Nogueira BV, Dias AT, Andrade TU, Pereira TM, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med*. 2015 Dec 30;13:390. doi:10.1186/s12967-015-0759-7. PubMed PMID: 26715471; PubMed Central PMCID: PMC4696190.

27 - Saura M, Marquez S, Reventun P, Olea-Herrero N, Arenas MI, Moreno-Gómez-Toledano R, Gómez-Parrizas M, Muñoz-Moreno C, González-Santander M, Zaragoza C, Bosch RJ. Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS. *FASEB J*. 2014 Nov;28(11):4719-28. doi: 10.1096/fj.14-252460. Epub 2014 Aug 7. PubMed PMID: 25103225.

28 - Cagampang FR, Torrens C, Anthony FW, Hanson MA. Developmental exposure to bisphenol A leads to cardiometabolic dysfunction in adult mouse offspring. *J Dev Orig Health Dis*. 2012 Aug;3(4):287-92. doi: 10.1017/S2040174412000153. PubMed PMID: 25102149.

29 – Kirkley AG, Sargis RM. Environmental endocrine disruption of energy metabolism and cardiovascular risk. *Curr Diab Rep*. 2014 Jun;14(6):494. doi: 10.1007/s11892-014-0494-0. Review. PubMed PMID: 24756343; PubMed Central PMCID: PMC4067479.

30 - Kralova E, Jankyova S, Mucaji P, Gresakova E, Stankovicova T. Pycnogenol® and its fractions influence the function of isolated heart in rats with experimental diabetes mellitus. *Pathol Res Pract*. 2015 Feb;211(2):156-61. doi:10.1016/j.prp.2014.11.011. Epub 2014 Nov 27. PubMed PMID: 25532475.

31 - Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite*. 2008 Nov;51(3):456-67. doi: 10.1016/j.appet.2008.05.060. Epub 2008 Jun 4. Review. PubMed PMID: 18582508.

32 - Vieira, A. C. P.; Cornélio, A. R.; Salgado, J. M. Alimentos funcionais: aspectos relevantes para o consumidor. *Jus Navigandi*. Teresina, ano 10, n. 1123, julho. 2006.

33 - Candido, L. M. B.; Campos, A. M. Alimentos funcionais, Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. v. 29, n.2, p. 193- 203, 2005.

34 - Moraes, F. P.; Colla, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 109-122, 2006.

35 - de Oliveira Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VM. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol*. 2013 Oct 30;44(2):341-9. doi: 10.1590/S1517-83822013000200001. eCollection 2013. Review. PubMed PMID: 24294220; PubMed Central PMCID: PMC3833126.

36 - Pimenta FS, Luaces-Regueira M, Ton AM, Campagnaro BP, Campos-Toimil M, Pereira TM, Vasquez EC. Mechanisms of Action of Kefir in Chronic Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(5):1901-1914. doi: 10.1159/000492511. Epub 2018 Aug 9. PubMed PMID: 30092577.

37 - Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Jun;23(2):67-74. PubMed PMID: 16854180.

38 - Hertzler SR, Clancy SM. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc*. 2003 May;103(5):582-7. PubMed PMID: 12728216.

39 - Liu, J.R.; Chen, M.J.; LIN, C.W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *Journal of Food Science*, 2002; v.67, p.104-108.

40 - Lee MY, Ahn KS, Kwon OK, Kim MJ, Kim MK, Lee IY, Oh SR, Lee HK. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*. 2007;212(8):647-54. Epub 2007 Jul 10. PubMed PMID: 17869642.

41 - Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J Dairy Res*. 2001 Nov;68(4):639-52. PubMed PMID: 11928960.

42 – Tamai, Y.; Yashimitsu, N.; Watanabe, Y.; Kuwabara, Y.; Nagai, S. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996; v. 81, p. 181-182. 1996.

43 – St-Onge MP, Farnworth ER, Savard T, Chabot D, Mafu A, Jones PJ. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial [ISRCTN10820810]. *BMC Complement Altern Med*. 2002;2:1. Epub 2002 Jan 22. PubMed PMID: 11825344; PubMed Central PMCID: PMC65674.

44 - Mohammadkhah AI, Simpson EB, Patterson SG, Ferguson JF. Development of the Gut Microbiome in Children, and Lifetime Implications for Obesity and Cardiometabolic Disease. *Children (Basel)*. 2018 Nov 27;5(12). pii: E160. doi: 10.3390/children5120160. Review. PubMed PMID: 30486462.

45 - Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients*. 2014 Jun 2;6(6): 2165-78. doi: 10.3390/nu6062165. Review. PubMed PMID: 24892374; PubMed Central PMCID: PMC4073141.

46 - Ferreira, C. L.L.F. Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos. *Cadernos Didáticos*, 2005; nº 43, 3º ed, 112 p.. Viçosa: UFV, MG.

47 - Barboza KRM, Coco LZ, Alves GM, Peters B, Vasquez EC, Pereira TMC, Meyrelles SS, Campagnaro BP. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress. *Life Sci*. 2018 Sep 15;209:370-376. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.035. Epub 2018 Aug 16. PubMed PMID: 30120965.

48 - Brasil GA, Silva-Cutini MA, Moraes FSA, Pereira TMC, Vasquez EC, Lenz D, Bissoli NS, Endringer DC, de Lima EM, Biancardi VC, Maia JF, de Andrade TU. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. *Nutrition*. 2018 Jul - Aug;51-

52:66-72. doi: 10.1016/j.nut.2017.12.007. Epub 2018 Feb 7. PubMed PMID: 29605766.

49 - Baldo MP, Teixeira AK, Rodrigues SL, Mill JG. Acute arrhythmogenesis after myocardial infarction in normotensive rats: influence of high salt intake. *Food Chem Toxicol.* 2012 Mar;50(3-4):473-7. doi: 10.1016/j.fct.2011.11.033. Epub 2011 Nov 27. PubMed PMID: 22142697.

50 - Balarini CM, Leal MA, Gomes IB, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med.* 2013 Jan 5;11:3. doi: 10.1186/1479-5876-11-3. PubMed PMID: 23289368; PubMed Central PMCID: PMC3551739.

51 - Dias AT, Leal MAS, Zanardo TC, Alves GM, Porto ML, Nogueira BV, Gava AL, Campagnaro BP, Pereira TMC, Meyrelles SS, Campos-Toimil M, Vasquez EC. Beneficial Morphofunctional Changes Promoted by Sildenafil in Resistance Vessels in the Angiotensin II-Induced Hypertension Model. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(6):483-494. doi: 10.2174/1389201019666180625094704. PubMed PMID: 29938618.

52 - Dias AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, Palomino Z, Casarini DE, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *J Transl Med.* 2014 Feb 6;12:35. doi: 10.1186/1479-5876-12-35. PubMed PMID: 24502628; PubMed Central PMCID: PMC3922021.

53 - Yen CY, Chiu CC, Chang FR, Chen JY, Hwang CC, Hseu YC, Yang HL, Lee AY, Tsai MT, Guo ZL, Cheng YS, Liu YC, Lan YH, Chang YC, Ko YC, Chang HW, Wu YC. 4beta-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G2/M arrest. *BMC Cancer.* 2010 Feb 18;10:46. doi: 10.1186/1471-2407-10-46. PubMed PMID: 20167063; PubMed Central PMCID: PMC2830937.

54 - Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira BV, Casarini DE, Vasquez EC, Meyrelles SS. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from Angiotensin-dependent hypertensive mice. *Int J Hypertens*. 2013;2013:305202. doi: 10.1155/2013/305202. Epub 2013 Feb 14. PubMed PMID: 23476745; PubMed Central PMCID: PMC3586517.

55 - Fahning BM, Dias AT, Oliveira JP, Gava AL, Porto ML, Gomes IB, Nogueira BV, Campagnaro BP, Pereira TM, Vasquez EC, Balarini CM, Meyrelles SS. Sildenafil Improves Vascular Endothelial Structure and Function in Renovascular Hypertension. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;16(9):823-31. PubMed PMID: 26059106.

56 - Chang WH, Liu SC, Chen HL, Lee CC. Dietary intake of 4-nonylphenol and bisphenol A in Taiwanese population: Integrated risk assessment based on probabilistic and sensitive approach. *Environ Pollut*. 2019 Jan;244:143-152. doi: 10.1016/j.envpol.2018.10.040. Epub 2018 Oct 10. PubMed PMID: 30326386.

57 - von Goetz N, Pirow R, Hart A, Bradley E, Poças F, Arcella D, Lillegard ITL, Simoneau C, van Engelen J, Husoy T, Theobald A, Leclercq C. Including non-dietary sources into an exposure assessment of the European Food Safety Authority: The challenge of multi-sector chemicals such as Bisphenol A. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017 Apr;85:70-78. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.02.004. Epub 2017 Feb 7. PubMed PMID: 28185845.

58 - Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 2005 Apr;113(4):391-5. PubMed PMID: 15811827; PubMed Central PMCID: PMC1278476.

59 - Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb*. 2007 Oct;14(5):245-52. Epub 2007 Oct 12. PubMed PMID: 17938543.

60 - Vafeiadi M, Roumeliotaki T, Myridakis A, Chalkiadaki G, Fthenou E, Dermitzaki E, *et al.* Association of 603 early life exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic traits in childhood. *Environ Res.* 2016 Apr;146:379-87. doi: 10.1016/j.envres.2016.01.017. Epub 2016 Jan 25. PubMed PMID: 26821262.

61 - Do MT, Chang VC, Mendez MA, de Groh M. Urinary bisphenol A and obesity in adults: results from the Canadian Health Measures Survey. *Health Promot Chronic Dis Prev Can.* 2017 Dec;37(12):403-412. doi: 10.24095/hpcdp.37.12.02. English, French. PubMed PMID: 29236378; PubMed Central PMCID: PMC5765817.

62 - Desai M, Ferrini MG, Jellyman JK, Han G, Ross MG. In vivo and in vitro bisphenol A exposure effects on adiposity. *J Dev Orig Health Dis.* 2018 Dec;9(6):678-687. doi: 10.1017/S2040174418000600. Epub 2018 Aug 29. PubMed PMID: 30156179; PubMed Central PMCID: PMC6363869.

63 - Amin MM, Ebrahim K, Hashemi M, Shoshtari-Yeganeh B, Rafiei N, Mansourian M, *et al.* Association of 611 exposure to Bisphenol A with obesity and cardiometabolic risk factors in children and adolescents. *Int J Environ Health Res.* 2019 Feb;29(1):94-106. doi: 10.1080/09603123.2018.1515896. Epub 2018 Sep 11. PubMed PMID: 30203985.

64 - Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K. Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci.* 2005 Apr;84(2):319-27. Epub 2005 Jan 19. PubMed PMID: 15659569.

65 - Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect.* 2008 Dec;116(12):1642-7. doi: 10.1289/ehp.11537. Epub 2008 Aug 14. PubMed PMID: 19079714; PubMed Central PMCID: PMC2599757.

66 - Bae S, Lim YH, Lee YA, Shin CH, Oh SY, Hong YC. Maternal Urinary Bisphenol A Concentration During Midterm Pregnancy and Children's Blood Pressure at Age 4.

Hypertension. 2017 Feb;69(2):367-374. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08281. Epub 2016 Dec 5. PubMed PMID: 27920131.

67 - Vasquez EC. Functional dairy foods for promotion of health and prevention of diseases. *J Food Microbiol* 2018;2(1):7-8.

68 - Guven M, Akman T, Yener AU, Sehitoglu MH, Yuksel Y, Cosar M. The Neuroprotective Effect of Kefir on Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *J Korean Neurosurg Soc.* 2015 May;57(5):335-41. doi: 10.3340/jkns.2015.57.5.335. Epub 2015 May 31. PubMed PMID: 26113960; PubMed Central PMCID: PMC4479714.

69 - Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Utrilla MP, Garrido-Mesa N, Rodríguez-Cabezas ME, Olivares M, Gálvez J, Duarte J. The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice. *Clin Sci (Lond).* 2014 Jul;127(1):33-45. doi: 10.1042/CS20130339. PubMed PMID: 24410749.

70 - Amorim FG, Coitinho LB, Dias AT, Friques AGF, Monteiro BL, Rezende LCD, Pereira TMC, Campagnaro BP, De Pauw E, Vasquez EC, Quinton L. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chem.* 2019 Jun 1;282:109-119. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.010. Epub 2019 Jan 8. PubMed PMID: 30711094.

71 - Hamet MF, Londero A, Medrano M, Vercammen E, Van Hoorde K, Garrote GL, Huys G, Vandamme P, Abraham AG. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirianofaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiol.* 2013 Dec;36(2):327-34. doi: 10.1016/j.fm.2013.06.022. Epub 2013 Jul 5. PubMed PMID: 24010614.

72 - Ehlers PI, Kivimäki AS, Turpeinen AM, Korpela R, Vapaatalo H. High blood pressure-lowering and vasoprotective effects of milk products in experimental

hypertension. Br J Nutr. 2011 Nov;106(9):1353-63. doi: 10.1017/S0007114511001723. Epub 2011 May 10. PubMed PMID: 21736845.

73 - Jakala P, Pere E, Lehtinen R, Turpeinen A, Korpela R, Vapaatalo H. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. J Physiol Pharmacol. 2009;60(4):11-20. PubMed PMID: 20065492.

74 - Ebner, J., Aşçı Arslan, A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., & Pischetsrieder, M. (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. J Proteomics, 117, 41-57.

75 - Izquierdo-González JJ, Amil-Ruiz F, Zazzu S, Sánchez-Lucas R, Fuentes-Almagro CA, Rodríguez-Ortega MJ. Proteomic analysis of goat milk kefir: Profiling the fermentation-time dependent protein digestion and identification of potential peptides with biological activity. Food Chem. 2019 Oct 15;295:456-465. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.178. Epub 2019 May 25. PubMed PMID: 31174782.

76 - Vasquez EC, Gava AL, Graceli JB, Balarini CM, Campagnaro BP, Pereira TM, *et al.* Novel Therapeutic Targets for Phosphodiesterase 5 Inhibitors: current state-of-the-art on systemic arterial hypertension and atherosclerosis. Curr Pharm Biotechnol. 2016;17(4):347-64. PubMed PMID: 26696017.

77 - Leal MA, Balarini CM, Dias AT, Porto ML, Gava AL, Pereira TM, *et al.* Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. Curr Pharm Biotechnol. 2015;16(6):517-30. PubMed PMID: 25860063.

78 - Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. Br J Pharmacol. 2009 Feb;156(4):563-74. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00060.x. Epub 2009 Jan 19. Review. PubMed PMID: 19154435; PubMed Central PMCID: PMC2697704.

79 - Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004 Oct;122(4):339-52. Epub 2004 Aug 26. Review. PubMed PMID: 15338229.

80 - Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol.* 2015 May;31(5):631-41. doi: 10.1016/j.cjca.2015.02.008. Epub 2015 Feb 14. Review. PubMed PMID: 25936489.

81 - Hamza SM, Dyck JR. Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. *Front Physiol.* 2014 Aug 5;5:292. doi: 10.3389/fphys.2014.00292. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 25140155; PubMed Central PMCID: PMC4122172.

82 - Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011 Oct;164(3):894-912. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x. Review. PubMed PMID: 21323907; PubMed Central PMCID: PMC3195913.

83 - Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2005 May;23(5):1025-36. PubMed PMID: 15834289.

84 - Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang YX, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 α) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Feb 15;16(4):363-73. doi: 10.1089/ars.2010.3874. Epub 2011 Dec 2. PubMed PMID: 21951274; PubMed Central PMCID: PMC3584508.

85 - Viridis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M. Atorvastatin prevents

endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension*. 2009 Jun;53(6):1008-16. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.132258. Epub 2009 Apr 20. PubMed PMID: 19380610.

86 - Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1669-75. PubMed PMID: 7706475; PubMed Central PMCID: PMC295674.

87 - García-Redondo AB, Briones AM, Avendaño MS, Hernanz R, Alonso MJ, Salaices M. Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. *J Hypertens*. 2009 Sep;27(9):1814-22. doi: 10.1097/HJH.0b013e32832d23e6. PubMed PMID: 19491705.

88 - Wong SL, Wong WT, Tian XY, Lau CW, Huang Y. Prostaglandins in action indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions. *Adv Pharmacol*. 2010;60:61-83. doi: 10.1016/B978-0-12-385061-4.00003-9. Review. PubMed PMID: 21081215.

89 - Meyrelles, S. S.; Peotta, V. A.; Pereira, T. M.; Vasquez, E. C. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis*. 2011 Nov 14;10:211. doi: 10.1186/1476-511X-10-211. Review. PubMed PMID: 22082357; PubMed Central PMCID: PMC3247089.

90 - Hariri M, Salehi R, Feizi A, Mirlohi M, Kamali S, Ghiasvand R. The effect of probiotic soy milk and soy milk on anthropometric measures and blood pressure in patients with type II diabetes mellitus: A randomized double-blind clinical trial. *ARYA Atheroscler*. 2015 Feb;11(Suppl 1):74-80. PubMed PMID: 26261453; PubMed Central PMCID: PMC4530661.

91 – Maeda H, Zhu X, Suzuki S, Suzuki K, Kitamura S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefir produced by *Lactobacillus*

kefiranofaciens WT-2B(T). J Agric Food Chem. 2004 Aug 25;52(17):5533-8. PubMed PMID: 15315396.

92 - Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LP, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. Int J Mol Sci. 2013 Feb 5;14(2):3325-42. doi: 10.3390/ijms14023325. PubMed PMID: 23385237; PubMed Central PMCID: PMC3588046.

93 - de Souza Santos V, Peters B, Côco LZ, Alves GM, de Assis ALEM, Nogueira BV, Meyrelles SS, Porto ML, Vasquez EC, Campagnaro BP, Pereira TMC. Silymarin protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. Life Sci. 2019 Jul 1;228:305-315. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.061. Epub 2019 Apr 29. PubMed PMID: 31047898.

94 - Chisté LA, Pereira BP, Porto ML, de Oliveira JP, de Assis ALEM, Nogueira BV, Meyrelles SS, de Andrade TU, Campos-Toimil M, Vasquez EC, Campagnaro BP, Pereira TMC. Worsening of Oxidative Stress, DNA Damage, and Atherosclerotic Lesions in Aged LDLr(-/-) Mice after Consumption of Guarana Soft Drinks. Oxid Med Cell Longev. 2019 Jun 10;2019:9042526. doi: 10.1155/2019/9042526. eCollection 2019. PubMed PMID: 31281596; PubMed Central PMCID: PMC6590538.

95 - Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, *et al.* Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 May;292(5):H2417-24. Epub 2007 Jan 12. PubMed PMID: 17220179.

96 - Jin L, Yang H, Fu J, Xue X, Yao L, Qiao L. Association between oxidative DNA damage and the expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in lung epithelial cells of neonatal rats exposed to hyperoxia. Mol Med Rep. 2015 Jun;11(6):4079-86. doi: 10.3892/mmr.2015.3339. Epub 2015 Feb 12. PubMed PMID: 25672835; PubMed Central PMCID: PMC4394948.

97 – Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. Br J Clin Pharmacol. 2009 Oct;68(4):484-

92. doi: 10.1111/j.1365-2125.2009.03486.x. PubMed PMID: 19843051; PubMed Central PMCID: PMC2780273.

98 - Veresh Z, Racz A, Lotz G, Koller A. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway. *Hypertension*. 2008 Nov;52(5):960-6. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116731. Epub 2008 Oct 6. PubMed PMID: 18838625.

99 - Lin CP, Lin FY, Huang PH, Chen YL, Chen WC, Chen HY, Huang YC, Liao WL, Huang HC, Liu PL, Chen YH. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:845037. doi: 10.1155/2013/845037. Epub 2012 Dec 30. Review. PubMed PMID: 23484163; PubMed Central PMCID: PMC3591199.

100 - Porto ML, Lima LC, Pereira TM, Nogueira BV, Tonini CL, Campagnaro BP, Meyrelles SS, Vasquez EC. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. *Lipids Health Dis*. 2011 Sep 6;10:155. doi: 10.1186/1476-511X-10-155. PubMed PMID: 21896159; PubMed Central PMCID: PMC3179743.

ANEXO I

Carta de aceitação do artigo para publicação na revista

"The Journal of Nutritional Biochemistry"

De: "Joseph Richardson (The Journal of Nutritional Biochemistry)" <EvisSupport@elsevier.com>

Para: evasquez@terra.com.br

Assunto: Your manuscript JNB_2019_230_R1 has been accepted

Data: Seg 16/09/19 07:21

Ref: JNB_2019_230_R1

Title: Bisphenol A (BPA) Contamination in Infant Rats: molecular, structural and physiological cardiovascular changes and the protective role of kefir

Journal: The Journal of Nutritional Biochemistry

Dear Professor. Vasquez,

We are pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to The Journal of Nutritional Biochemistry . We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Joseph Richardson

Managing Editor

The Journal of Nutritional Biochemistry

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Revista: The Journal of Nutritional Biochemistry. **Fator de Impacto:** 4.490