

RESUMO

Evidências acumuladas indicam que a saúde dos seres humanos, animais e espécies selvagens pode sofrer conseqüências adversas da exposição a produtos químicos presentes no meio ambiente e que interação com o sistema endócrino, tais como bifenilas policloradas, dioxinas, estrogênios de ocorrência natural e sintéticos. Por outro lado, permanecem incertezas científicas com respeito aos dados relatados e, também, quanto à hipótese de haver níveis suficientemente elevados de exposição a estes agentes, a ponto de exercer efeito estrogênico generalizado sobre a população. Este trabalho revisa os principais tópicos relacionados a um dos xenoestrogênios que vem sendo mais recentemente estudado: o Bisfenol A (BFA), um monômero de plástico polycarbonato, com pouca homologia estrutural com o estradiol (E₂) mas semelhante ao dietilestilbestrol (DES), hexestriol e componente bisfenólico do tamoxifeno. O presente trabalho comenta e analisa criticamente os efeitos do BFA sobre o trato reprodutivo e função lactotrófica em animais de experimentação, à luz das informações disponíveis e experiência do grupo nesta área, e recomenda algumas necessidades de pesquisa. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 323-330**)

Unitermos: Xenoestrogênios; Bisfenol A; Prolactina; Útero; Ratas

ABSTRACT

Some evidences indicate that humans and domestic and wildlife species might suffer adverse consequences from exposure to environmental chemicals that interact with the endocrine system, including polychlorinated biphenyls, dioxins, synthetic and naturally occurring plant estrogens. However, considerable scientific uncertainty remains regarding the causes of these reported effects and whether sufficiently high levels of endocrine-disrupting chemicals exist in the ambient environment to exert adverse effects on the general population. This review summarizes the principal issues related to bisphenol A, an environmental endocrine disrupting chemical with estrogen activity. Bisphenol A is a monomer of plastics and has little structural homology with estradiol, sharing similarity with synthetic estrogens such as diethylstilbestrol and with the bisphenolic component of tamoxifen. In the light of available information and our laboratory experience in this field of research, this work comments and critically analyses the effects of BPA on the reproductive tract and lactotroph function in several rat strains, and also offers some recommendations for additional research. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 323-330**)

Keywords: Xenoestrogens; Bisphenol A; Prolactin; Uterus; Rats

ATUALMENTE EXISTE GRANDE INTERESSE na Toxicologia Endocrinológica, nova área de conhecimento que está situada entre a endocrinologia e a toxicologia. O principal objeto de estudo são as substâncias denominadas xenobióticos (*substâncias químicas de origem exógena: plantas, produtos sintéticos, poluentes ambientais, etc*) que interferem na produção,

Tatiana Goloubkova
Poli Mara Spritzer

*Unidade de Endocrinologia
Ginecológica, Serviço de
Endocrinologia, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre e Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.*

*Recebido em 04/10/1999
Revisado em 18/02/2000
Aceito em 10/04/2000*

liberação, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais, os responsáveis pela manutenção da homeostasia e regulação dos processos de desenvolvimento. Entre os xenobióticos incluem-se substâncias químicas que mimetizam os estrogênios, anti-androgênios e moléculas atuantes em componentes do sistema endócrino tais como tireóide, hipotálamo e hipófise (1-4), entre outros.

Até agora, a maioria dos estudos nesta área concentrou-se na ação estrogênica de várias substâncias químicas de origem sintética (1,5) (*xenoestrogênios: xenobióticos com estrutura não esteróide e com ação similar aos estrogênios endógenos*) (tabela 1). A idéia de que a exposição de homens e animais a substâncias do meio ambiente com ação estrogênica poderia resultar em alterações adversas no desenvolvimento reprodutivo, funcional e/ou comportamental, não é nova. A primeira preocupação com este assunto surgiu há trinta anos, em relação ao o,p'-1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil-etano) (DDT) (6). Ainda em 1938, foi feita a primeira demonstração de que alguns produtos químicos poderiam ter ação estrogênica quando administrados em animais (7). Este assunto foi retomado mais recentemente devido ao surgimento de hipóteses que levantam a possibilidade de a exposição a agentes químicos ambientais, com ação estrogênica, poder estar relacionada ao aumento da incidência de câncer de mama (8,9), queda da quantidade de esperma, diminuição da fertilidade (10,11) defeitos congênitos secundários à exposição fetal (12) e outras alterações (13).

Pode-se caracterizar uma substância como estrogênica a partir de duas propriedades: afinidade pelo receptor de estrogênios (ER), demonstrada tanto *in vitro* como *in vivo*, e demonstração de efeito trófico no trato reprodutivo feminino. O mecanismo de ação através do qual o estrogênio expressa seus efeitos é complexo e envolve sua ligação a ER α e/ou β seguido da ligação do complexo hormônio-receptor com os elementos de transcrição responsivos ao estrogênio (ERE). A estrutura dos EREs e a proporção dos subtipos de ER em células/tecidos específicos vão influen-

ciar a ativação dos genes específicos pelo estímulo de estrogênios naturais ou sintéticos (14).

Uma série de autores tem se dedicado à questão dos mecanismos de ação dos xenoestrogênios e vários artigos de revisão foram recentemente publicados (4,15-17). Essas substâncias químicas podem agir através de diferentes mecanismos, dependendo do período e extensão de exposição. Assim, os xenoestrogênios podem modificar a estrutura do DNA e expressão gênica, alterar a síntese/secreção, transporte/eliminação dos hormônios ou, ainda, interferir com as etapas de ligação ao receptor ou com eventos em nível pós-receptor.

BISFENOL A

Um dos compostos que tem, ultimamente, gerado ampla discussão é o bisfenol A (BFA) (18-20), um monômero de plástico policarbonato, cuja estrutura de dois anéis de fenol insaturados tem pouca homologia estrutural com o estradiol (E_2) mas é semelhante ao dietilestilbestrol (DES), ao hexestriol e ao componente bisfenólico do tamoxifeno (figura 1).

A atividade estrogênica do BFA foi descoberta ocasionalmente. Pesquisadores da Universidade de Stanford identificaram uma proteína ligadora de estrogênio em levedura e, posteriormente, estudaram a existência de um ligante endógeno acoplado a esta proteína. Depois do primeiro relato de que a levedura produzia E_2 (21), esses autores verificaram que a atividade estrogênica não era proveniente da levedura, mas sim do meio de cultura preparado com água autoclavada em frasco de policarbonato (22). A substância foi purificada e identificada como bisfenol A. Aproximadamente 2-3 μ g/L foram detectados em água autoclavada. A seguir, foi demonstrado que o BFA satisfaz todos os critérios para substância estrogênica, com dose mínima efetiva de 10-20nM.

Por causa da estabilidade superior, flexibilidade e resistência, as resinas epoxi-BFA são utilizadas em vários produtos, como camadas de revestimento inter-

Tabela 1. Exemplos conhecidos de xenoestrogênios (modificada de Roy D. et al, 1998 (13)).

	Exemplos
PESTICIDAS	Herbicidas: 2,4-Diclorofenol, Atrazina Inseticidas: Dicofol, Dieldrin, o,p'-DDT, Metoxiclor, Clordecone, Heptaclor
QUÍMICOS INDUSTRIAIS	Bifenilas policloratos (PCBs); Fitalatos; Alquilfenóis (octilfenol, bisfenol-A, naffol)
AGENTES QUÍMICOS NATURAIS	Fitoestrogênios; Micoestrogênios
FÁRMACOS	Cimetidina, digitálicos, sulfonamidas, aminoglutetimida, cetoconazol.

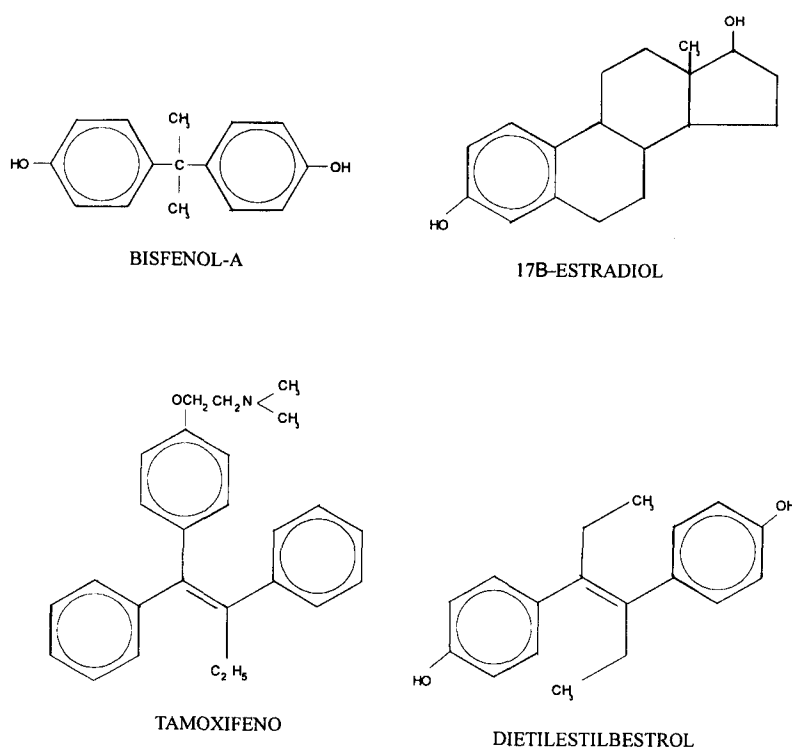


Figura 1. Estrutura do bisfenol A, estradiol, tamoxifeno e dietilestilbestrol.

no de latas de alimentos, complexos dentários para obturações e embalagens de remédios (23). O bisfenol A foi produzido em quantidades de mais de 700 mil toneladas em 1996, havendo aumento anual de 5-6% na produção.

Conhece-se ainda muito pouco a respeito da exposição ao BFA. Embora o BFA seja um material resistente, sua liberação no ambiente é possível quando a polimerização é incompleta ou através de hidrolização causada por altas temperaturas (22,24). A partir do revestimento das latas de alimentos, foi detectada liberação de BFA em concentrações na faixa de 0,004 a 0,023mg/kg de alimento (24). Constatou-se, também, que o BFA escapa dos dentes tratados com resinas para a saliva: até 950µg de BFA foram coletadas na saliva durante a primeira hora após a polimerização (25). A quantidade de BFA liberada de plásticos varia numa faixa que vai desde níveis indetectáveis até 139µg/g de alimento (24). Como a questão dos efeitos do BFA envolve os interesses da indústria química, existem outros trabalhos mostrando a segurança do uso de produtos contendo BFA (26-28). (A dose de referência para exposição oral crônica de BFA foi estabelecida em 0,05mg/kg de peso corporal/dia, pela Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados

Unidos para os Alimentos. Um limite específico para a migração de BFA proveniente de embalagens foi fixado em 3mg/kg de alimento. Considerando as normas da União Européia para poluentes orgânicos em águas, o limite é de 0,1ng/ml para BFA [29]).

Em estudos *in vitro* posteriores, foi demonstrado que o BFA é uma substância com ação estrogênica fraca, aproximadamente 1.000-15.000 vezes menos potente do que o estradiol ou o estriol (30). O BFA, efetivamente, compete com o E₂, ligando-se tanto ao receptor estrogênico α (31) como ao β (32), com afinidade pelo menos 1.000 vezes mais baixa do que o E₂. Tem havido um número cada vez maior de estudos afirmando que a sensibilidade a xenoestrogênios é dependente do período de desenvolvimento, do sexo dos animais e da variabilidade entre- e intra-espécies. Em ratas imaturas Alpk:AP, tratadas por via oral ou subcutânea, o BFA induziu a abertura vaginal em 70% dos animais expostos a injeções subcutâneas de 600-800mg/kg.dia, por 3 dias (33). Em ratas Wistar, o tratamento com doses significativamente menores de BFA induziu a abertura vaginal precoce em todas as ratas tratadas (34). Em outras condições experimentais, o tratamento com BFA por 3 dias induziu aumento nos níveis do receptor de progesterona (31).

O trato reprodutivo das ratas de diferentes cepas apresenta respostas muito similares ao tratamento com E_2 e DES (35,36), mas parece haver maior susceptibilidade ao BFA entre as ratas Fischer 344 (F344) que entre as ratas Sprague-Dawley (SD) (35). Para as ratas F344, a exposição ao BFA, mesmo em doses pequenas, é suficiente para exercer ação estrogênica similar à do E_2 , estimulando a proliferação do epitélio do útero e vagina, induzindo e mantendo de forma prolongada a expressão do proto-oncogene *c-fos*, embora sem aumento no peso do útero (35). Além disso, o BFA demonstrou seletividade celular, em ratas F344, estimulando a secreção de prolactina mas, diferentemente do E_2 , sem alterar os pesos hipofisário e uterino.

Poucos dados estão disponíveis sobre os efeitos do BFA em ratas Wistar. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento de ratas adultas castradas com BFA em doses diárias tão baixas como 11mg/kg.dia, por via subcutânea, resultou em aumento do peso uterino, mantendo relação direta com a dose e tempo de tratamento (37,38). Esta dose foi 36 vezes menor do que a relatada como tendo efeito estrogênico em ratas Alp:AP imaturas, avaliando-se a abertura vaginal precoce e o aumento do peso uterino (33), mas aproximadamente 35 vezes maior do que foi relatada para ratas F344 (39). Por outro lado, cabe salientar a dificuldade de avaliar, com precisão, as comparações dos resultados gerados em diferentes laboratórios. É bem conhecido que a administração de BFA varia tanto em relação a dose, duração e via de administração, quanto à utilização de cepas mais ou menos sensíveis à ação dos estrogênios (40,41).

Constatou-se, recentemente, que o efeito estrogênico do BFA pode ser somente 100-500 vezes menor do que o de E_2 , quando se estudam a proliferação celular de mama em ratas Nobel (42) e a indução de secreção de prolactina sérica em ratas F344 (39). O aspecto relevante destes dados é que estes efeitos foram observados em doses muito mais baixas do que o esperado com base em resultados de estudos anteriores, particularmente ensaios *in vitro* e bioensaios que mediam efeitos uterotróficos em ratas (33). Além disso, os estudos levantaram a questão de que as cepas de ratas F344, Wistar e SD podem apresentar diferenças na susceptibilidade do eixo neuroendócrino e dos órgãos reprodutivos ao BFA (34,38,39), supondo a existência de polimorfismo genético também entre a população humana.

DIFERENÇAS NA SUSCEPTIBILIDADE À AÇÃO DE ESTROGÊNIOS E BFA ENTRE CEPAS DE RATAS

Existem diferenças pouco compreendidas a respeito do aumento na resposta de proliferação e/ou diferenciação de tecidos-alvo ao estímulo estrogênico em algumas cepas de roedores (36). Assim, ratas F344 servem como modelo experimental extremamente sensível a estrogênios, desenvolvendo rapidamente prolactinomas e hiperprolactinemia. Em comparação com ratas F344 e ACI, as ratas das cepas Holzman (Hn), SD e Wistar respondem aos estrogênios com aumento moderado de prolactina sérica e de proliferação dos lactotrofos (39,43-45). As diferenças entre as cepas F344 e Hn podem ser específicas para a proliferação celular da hipófise, porque a resposta de crescimento do útero e secreção de prolactina é muito similar em ambas as cepas (36). Estes achados sugerem que as células hipofisárias das ratas F344, por fatores genéticos determinantes, perderam o(s) mecanismo(s) de controle de proliferação celular que limita(m) o desenvolvimento de prolactinomas em hipófise das ratas Hn. Em ratas Wistar, o valerato de estradiol, já aos 7 dias de tratamento, foi eficaz em elevar significativamente os níveis séricos de prolactina e, a partir dos 14 dias, em elevar o percentual de lactotrofos (43,46-48).

As bases moleculares deste polimorfismo genético ainda não foram identificadas. Recentemente, foram descritos cinco sítios característicos nos cromossomas (*quantitative trait loci*, - QTL) que afetam o crescimento tumoral em hipófise de ratas F344 (49). Entretanto, não foi detectada diferença na expressão dos receptores estrogênicos α e β entre hipófises de ratas F344 e SD (50). Foi, ainda, sugerido que as diferenças de sensibilidade do tecido hipofisário ao estímulo estrogênico pudessem ser atribuídas à presença de variantes do *splicing* dos ER, ou de coativadores/repressores e afinidade de ligação de receptores em genes-alvo (51). Além disso, em comparação com ratas SD, as ratas F344 mostraram aumento na atividade enzimática da RNA polimerase I em hipófise como resposta ao estímulo estrogênico (52). A relevância destes dados ainda não está bem esclarecida.

Já foi demonstrado que, assim como ocorre com o estímulo estrogênico, a hipersecreção de prolactina poderia ser induzida pelo BFA através da ligação com EREs, aumentando a transcrição do gene da prolactina, a liberação de PRF e estimulando a liberação de prolactina em células GH₃ (39). Para as ratas F344, a exposição ao BFA (0,3mg/kg.dia, por três dias) foi suficiente para elevar os níveis séricos de prolactina em 7-8 vezes. Já as ratas SD e Wistar, que

respondem ao E₂ com aumento moderado na secreção de prolactina, mostraram-se resistentes ao tratamento com BFA (37,39) (tabela 2). Entretanto, quando foram utilizadas doses mais altas e por tempo mais prolongado, foi possível induzir hiperprolactinemia e proliferação dos lactotrofos em ratas Wistar (38). Para estimar o efeito estrogênico do BFA em comparação ao E₂ foram feitos cálculos utilizando dados de experimentos realizados com o mesmo modelo animal, tratado com valerato de estradiol. A dose de valerato de estradiol que resultou no mesmo efeito estrogênico, em termos de indução de hiperprolactinemia, foi 600 vezes menor que a de BFA (43,48).

O tratamento de ratas Wistar com BFA em doses altas não somente elevou os níveis de prolactina sérica mas também aumentou o peso da hipófise em comparação às ratas castradas. É interessante notar que, similarmente ao E₂, o aumento da prolactina em 6-8 vezes fez-se acompanhar de aumento nos pesos da hipófise e do útero na ratas Wistar, mas não nas ratas F344 (43). Esta diferença pode ser explicada, pelo menos em parte, pelas diferenças em protocolos experimentais utilizados nos trabalhos (doses de 77mg/kg.dia por 7 dias, após 14 dias pós-OVX [37,38] *versus* 55µg/rata.dia, por 3 dias, logo após OVX [39]).

MECANISMOS DE AÇÃO DO BFA - HIPÓTESES

É possível que o mecanismo de ação do BFA envolva vias clássicas de ação estrogênica. Por outro lado, o BFA exerce atividade similar, mas nem sempre idêntica, ao E₂ que pode ser decorrente de ligação mais firme com proteínas ligadoras dos hormônios sexuais e/ou da ativação de um mecanismo distinto do E₂ em relação a receptores de estrogênio α (31). O BFA desencadeia as reações imediatas características para estrogênios, aumentando a expressão do proto-oncogene *c-fos* por período mais longo do que o E₂ em

vagina (35), sugerindo a dissociação mais lenta do ER no epitélio da vagina e/ou intermediação de cofatores que têm associação específica com a ativação do receptor pelo BFA mas não pelo E₂.

O mecanismo exato para os efeitos do BFA observados nos trabalhos descritos até agora ainda não pôde ser explicado com precisão. A farmacocinética do BFA ainda não está bem estabelecida, portanto é difícil interpretar as consequências do fato de a liberação de BFA dos implantes ser mais rápida em comparação ao E₂ (0,05mg/dia para BFA e 0,0011mg/dia para E₂, respectivamente) (28). Entretanto, com base no conhecimento atual, pode-se estabelecer algumas hipóteses, que deverão ser testadas em estudos posteriores. Pelo menos em parte, a atividade biológica do BFA é mais alta em testes *in vivo* e as diferenças na susceptibilidade ao estímulo estrogênico do BFA entre as diversas cepas de ratas poderiam ser explicadas pela conversão do BFA para um metabólito mais ativo, bem como pelo polimorfismo em uma ou mais enzimas metabólicas.

Pouco se conhece sobre ativação metabólica ou inativação dos xenoestrogênios, sobre a farmacocinética e o metabolismo do BFA. Foi demonstrado, em ratos, que o BFA é quimicamente convertido para bisfenol-o-quinona (53,54), via 5-hidroxifenol (55) e bisfenol semiquinona, que são capazes de se ligarem covalentemente ao DNA. A ligação do BFA com DNA acontece, *in vitro*, em presença de um sistema de ativação de peroxidase (56) ou de um sistema de ativação dos citocromos P450 (CYP) microsomais hepáticos (53). Foi sugerido que um membro da família CYP1 poderia ser responsável pela hidroxilação de BFA. O complexo microsomal P450, presente em quase todos os tecidos (especialmente no fígado e nas adrenais), consiste de uma superfamília de isoenzimas, intimamente relacionadas, que catalisam o metabolismo oxidativo de uma grande variedade de substratos hidrofóbicos, tanto

Tabela 2. Comparação de efeitos hipofisários do BFA entre ratas ovariectomizadas Fisher 344, Sprague-Dawley e Wistar.

Cepa	Tempo de tratamento	Tratamento (dose/rata.dia)	Peso hipofisário (mg)	Prolactina sérica (ng/ml)
Fisher 344 (39)	3 dias	Veículo (n=12)	6,2±1,0	50±10
		BFA, 300µg (n=12)	8,0±1,1	310±90*
Sprague-Dawley (39)	3 dias	Veículo (n=8)	8,8±0,8	20±5
		BFA, 50µg (n=8)	9,0±0,3	25±30
Wistar (37)	3 dias	Veículo (n=5)	8,7±0,6	8,7±2,2
		BFA, 50µg (n=7)	8,4±0,5	10,3±1,3
	7 dias ^φ	Veículo (n=6)	6,8±0,6	14±4
		BFA, 25mg (n=8)	11,0±0,5**	73±4,6**

^φ ratas tratadas 14 dias após ovariectomia bilateral.

* p<0,05 e **p<0,001 em relação ao grupo controle tratado com veículo.

de origem endógena (hormônios esteróides, prostaglandinas, vitamina D) quanto exógena (drogas, poluentes ambientais). Uma ou mais formas de citocromo P450, geralmente com especificidades de substrato amplas e superpostas, podem ser induzidas por drogas ou substâncias encontradas no meio ambiente. Consequentemente, o espectro das isoenzimas específicas da oxidação microsomal pode influenciar o metabolismo e toxicidade de drogas ou de outros xenobióticos ou, ainda, o metabolismo de substratos endógenos tais como hormônios esteróides (57). O BFA pode também interferir nos efeitos dos hormônios esteróides, inibindo as proteínas-chave do metabolismo no fígado. Portanto, ainda não pode ser descartada a hipótese de que o BFA, bem como o DES, sejam convertidos *in vivo*, pelo fígado e adrenais, para metabólitos com ação estrogênica e tumorigênica aumentada.

Finalmente, no que concerne ao potencial tumorigênico, o BFA, sendo uma substância exógena, poderia interferir na regulação da síntese do material genético (58), levando a um estado de proliferação celular patológica na hipófise, na mama e, possivelmente, no útero. Além disso, sendo uma substância com ação estrogênica poderia, por mecanismos similares a outros estrogênios, promover os mesmos efeitos através de indução de fatores de crescimento e proto-oncogenes (58,59).

PERSPECTIVAS EM SAÚDE PÚBLICA

A relevância e extrapolação à população humana, dos dados sobre BFA, demonstrados em trabalhos científicos, espera estudos mais detalhados para avaliar as fontes, o risco de exposição a BFA e outros xenoestrogênios e os mecanismos de ação do BFA. Tanto estudos epidemiológicos como experimentais fazem-se necessários para obter-se esclarecimentos sobre o papel desencadeador dos xenoestrogênios em diferentes tipos de neoplasias hormônio-dependentes e o surgimento ou progressão de certas doenças. Contudo, deve-se ao menos considerar que os efeitos observados em espécies selvagens (19,20) possam trazer alertas premonitórios quanto às consequências da exposição humana aos xenobióticos.

REFERÊNCIAS

1. Sonnenschein C, Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1998;65:143-50.
2. Harrison PT, Holmes P, Humfrey CD. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? **Sci Total Environ** 1997;205:97-106.
3. Brucker-Davis F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. **Thyroid** 1998;8:827-56.
4. Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. **Environ Health Perspect** 1998;106(1):11-56.
5. Stone R. Environmental estrogens stir debate. **Science** 1994;265:308-10.
6. Durham WF. Body burden of pesticides in man. **Ann NY Acad Sci** 1969;160:183-95.
7. Dodds EC, Lawson W. Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without phenanthrene nucleus. **Proc Royal Soc London** 1938;118:222-32.
8. Davis DL, Bradlow HL. Can environmental estrogens cause breast cancer? **Sci Am** 1995;273:167-72.
9. Aschengrau A, Coogan PF, Quinn M, Cashins LJ. Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: an exploratory analysis. **Am J Ind Med** 1998;34:6-14.
10. Jensen TK, Toppari J, Keiding N, Skakkebaek NE. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? **Clin Chem** 1995;41:1896-901.
11. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environ Health Perspect** 1996;104:741-76.
12. Saunders PT, Majdic G, Parte P, Millar MR, Fisher JS, Turner KJ, et al. Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on testis gene expression. **Adv Exp Med Biol** 1997;424:99-110.
13. Roy D, Colerangle JB, Singh KP. Is exposure to environmental or industrial endocrine disrupting estrogen-like chemicals able to cause genomic instability? **Front Biosci** 1998;3:D913-D921.
14. Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN. Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. **J Endocrinol** 1998;158:R11-4.
15. Ben-Jonathan N, Cooper RL, Foster P, Hughes CL, Hoyer PB, Klotz D, et al. An approach to the development of quantitative models to assess the effects of exposure to environmentally relevant levels of endocrine disruptors on homeostasis in adults. **Environ Health Perspect** 1999;107(4):605-11.
16. Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. **J Endocrinol** 1997;152:159-66.
17. Cheek AO, Vonier PM, Oberdörster E, Burow BC, McLachlan JA. Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption. **Environ Health Perspect** 1999;106(1):5-10.
18. Ben Jonathan N, Steinmetz R. Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. **Trends Endocrinol Metab** 1998;9:124-8.
19. Controversy over bisphenol A research. **Endocrine/Estrogen Letter** 1997;3:1-4.
20. Reproductive toxicology. Bisphenol A. **Environ Health Perspect** 1997;105:273-4.

21. Feldman D, Tokes L, Stathis PA, et al. Identification of 17 β -estradiol as the estrogenic substance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci USA** **1984**;81:4722-6.
22. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology** **1993**;132:2279-86.
23. Brotons JA, Olea Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. **Environ Health Perspect** **1995**;103:608-12.
24. Feldman D. Estrogens from plastic - are we being exposed? **Endocrinology** **1997**;138:1777-9.
25. Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. **Environ Health Perspect** **1996**;104:298-305.
26. Mountfort KA, Kelly J, Jickells SM, Castle L. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. **Food Addit Contam** **1997**;14:737-40.
27. Ashby J. Bisphenol A dental sealants: the inappropriate use of continued reference to a single female patient. **Environ Health Perspect** **1997**;105:362.
28. Howe SR, Borodinsky L. Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of polycarbonate resins. **Food Addit Cont** **1998**;15:370-5.
29. EU Commission. Synoptic Document No.7 Draft of Provisional List of Monomers and Additives Used in the Manufacture of Plastics and Coatings Intending to come into Contact with Foodstuffs (updated 15 May 1994). Document CS/PM/2356. Commission of the European Communities, Directorate-General III, Industry, Industrial Affairs. III: Consumer Goods Industries, Foodstuffs Legislation and Scientific and Technical Aspects. **1994**.
30. Milligan SR, Balasubramanian AV. Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute *in vivo* mammalian assay. **Environ Health Perspect** **1998**;106:23-6.
31. Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. **Mol Cell Endocrinol** **1998**;142:203-14.
32. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology** **1998**;139:4252-63.
33. Ashby J, Tinwell H. Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. **Environ Health Perspect** **1998**;106:719-20.
34. Moretto M, Goloubkova TD, Cardoso Filho ML, Spritzer PM. Induction of sexual maturation in the female Wistar rat. (1999, submetido).
35. Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben Jonathan N. The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. **Endocrinology** **1998**;139:2741-7.
36. Wiklund J, Wertz N, Gorski J. A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. **Endocrinology** **1981**;109:1700-7.
37. Goloubkova T. Efeitos do xenoestrogênio bisfenol A sobre os pesos uterino e hipofisário, a proliferação de lactotrofos e a secreção de prolactina em ratos Wistar ovariectomizadas. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas: Endocrinologia/UFRGS, Porto Alegre, **1999**.
38. Goloubkova T, Ribeiro MFM, Rodrigues LP, Cecconello AL, Spritzer PM. Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactive prolactin cells in ovariectomized Wistar rats. **Arch Environm Cont Toxicol** **2000**;74:92-8.
39. Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben Jonathan N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. **Endocrinology** **1997**;138:1780-6.
40. Ashby J, Elliott HM. Reproducibility of endocrine disruption data. **Regul Toxicol Pharm** **1997**;26:94-5.
41. Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, et al. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonylphenols, comparison with a yeast estrogenic assay. **Regul Toxicol Pharm** **1997**;25:176-88.
42. Colerangle JB, Roy D. Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. **J Steroid Biochem Mol Biol** **1997**;60:153-60.
43. Spritzer PM, Ribeiro MF, Oliveira MC, Barbosa-Coutinho LM, Silva IS, Dahlem N, et al. Effects of tamoxifen on serum prolactin levels, pituitary immunoreactive prolactin cells and uterine growth in estradiol-treated ovariectomized rats. **Horm Metab Res** **1996**;28:171-6.
44. de Nicola AF, von Lawzewisch ISE, Kaplan, Libertum C. Biochemical and ultrastructural studies of estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. **J Natl Cancer Inst** **1978**;61:753-63.
45. Stone J.P, Holtzman S, Shellabarger CJ. Neoplastic responses and correlated plasma prolactin levels in diethylstilbestrol-treated ACI and Sprague-Dawley rats. **Cancer Res** **1979**;39:773-8.
46. Spritzer PM, Barbosa-Coutinho LM, Poy M, Orsi V, Dahlem N, Silva ISB. Effect of norethisterone acetate and tamoxifen on serum prolactin levels, uterine growth and on the presence of uterine immunoreactive prolactin in estradiol-treated ovariectomized rats. **Braz J Med Biol Res** **1995**;28:125-30.
47. Ribeiro MF, Spritzer PM, Barbosa-Coutinho LM, Oliveira MC, Pavanato MA, Silva ISB, et al. Effect of bromocriptine on serum prolactin levels, pituitary weight and immunoreactive prolactin cells in estradiol-treated ovariectomized rats: an experimental model of estrogen-dependent hyperprolactinemia. **Braz J Med Biol Res** **1997**;30:113-7.
48. Oliveira MC, Spritzer P, Poy M, Coronel AX, Dahlem N, Moraes JT, et al. Progestin effects on prolactin secretion and on immunoreactive prolactin cells in estradiol-treated ovariectomized rats. **Horm Metab Res** **1993**;25:600-2.
49. Wendell DL, Gorski J. Quantitative *trait loci* for estrogen-dependent pituitary tumor growth in the rat. **Mamm Genome** **1997**;8:823-9.
50. Atkinson A, Roy D. *In vivo* DNA adduct formation by bisphenol A. **Environ Mol Mutagen** **1995**;26:60-6.

51. Mitchner NA, Garlick C, Ben Jonathan N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors α and β in the rat pituitary gland. **Endocrinology** 1998;139:3976-83.
52. Ying C, Gregg DW, Gorski J. Estrogen-induced changes in rRNA accumulation and RNA polymerase I activity in the rat pituitary: correlation with tumor susceptibility. **Mol Cell Endocrinol** 1996;118:207-13.
53. Atkinson A, Roy D. *In vitro* conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). **Biochem Biophys Res Commun** 1995;210:424-33.
54. Spivack J, Leib TK, Lobos JH. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A: rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism. **J Biol Chem** 1994;269:7323-9.
55. Knaak J, Sullivan LJ. Metabolism of bisphenol A in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol** 1966;8:175-84.
56. Lewis FV, Ioannides C, Parke DV. Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. **Environ Health Perspect** 1998;106:633-40.
57. Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E, Hasegawa K, Takahashi M, Maizumi N, et al. Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. **Int J Cancer** 1998;75:290-4.
58. Gorski J, Wendell D, Gregg D, Chun TY. Estrogens and the genetic control of tumor growth. **Prog Clin Biol Res** 1997;396:233-43.
59. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. **Ann Rev Pharmacol Toxicol** 1996;36:203-32.

Endereço para correspondência:

Poli Mara Spritzer
Serviço de Endocrinologia,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350/2030
90.035-007 Porto Alegre, RS
Fax: (051) 332-5188 / 316-3166
e.mail: spritzer@vortex.ufrgs.br