



**Universidade Federal do Rio Grande- FURG**  
**Instituto de Ciências Biológicas – ICB**  
**Curso Superior de Ciências Biológicas -**  
**Bacharelado**



**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE HEPATÓCITOS DE**  
***Danio rerio* AO BISFENOL A**

**Graduanda: Gizielen Rodrigues Gonçalves**

**Orientador(a): Profa. Dra. Isabel Soares Chaves**

**Co- orientador(a): Prof. Dr. Pablo Elias Martinez**

**Rio Grande – RS**

**Novembro/2015**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar sou grata aos meus pais, Gizelda Rodrigues Gonçalves e Carlos Alberto Bastos Gonçalves, por terem sempre me proporcionado o melhor na vida, por me deixarem livre para que escolhesse minha carreira profissional, pelo apoio e compreensão nos momentos de dificuldade. Também a minha dinda, Goretti Rodrigues por sempre incentivar e se mostrar interessada, ajudando da forma que pudesse e torcendo pelo meu sucesso.

A Lauryane Jacinto, por ter me ajudado e acompanhado em vários momentos quando precisei, pela compreensão mesmo que às vezes seja difícil abrir mão de certas para se dedicar a outras. E principalmente por ter estado ao meu lado apesar de todos os problemas e dilemas que enfrentamos.

Aos meus colegas de curso, Daison Conceição, Elisa Birguiman e Liana Guedes, que durante a graduação sempre me incentivaram a ter pensamento positivo, pois no final tudo daria certo, pelas conversas nos momentos difíceis para cada um de nós e também por aquela opinião que pode nos ajudar.

Agradeço a todos aqueles do Laboratório de Cultura que dê alguma forma contribuíram com o aprendizado e treinamento. Mais ainda a Fernanda Lopes que nos deu grande apoio doando material e ensinando os protocolos de exposições. Profa. Ana Votto pela ajuda sempre que possível e disponibilidade de esclarecer nossas dúvidas. Meu braço direito Barbara Fagundes que foi de grande ajuda, trabalhando junto comigo nesses quase 2 meses corridos, além do mais aprendemos juntas e nos momentos em que eu não tinha disponibilidade sempre esteve pronta a me socorrer.

A todos os professores que participaram do meu aprendizado desde o fundamental até agora a graduação, aprendi muito mais que os conteúdos, aprendi como me dedicar cada vez mais. Sem esquecer a equipe do CRAM, que é como uma família para mim, sempre me incentivaram a não desistir, muito compreensivos com a minha ausência durante o tempo de realização do TCC e com os quais aprendi muito durante o período de graduação quando realizei estágio voluntário.

A minha orientadora, Isabel Chaves pela paciência e dedicação para que pudéssemos realizar este trabalho e sempre me incentivando a me esforçar mais para ir mais adiante. Pelos momentos em que confiou na minha capacidade de realizar as tarefas e conseguir fazer dar certo, apesar de alguns empecilhos ao longo do trajeto.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma participaram dessa jornada, incentivando e torcendo para que tudo desse certo. Muito obrigada!

## **Sumário**

Lista de Abreviaturas	4
Resumo	5
Abstract	6
Introdução geral	7
Artigo	13
Abstract	13
1. Introdução	14
2. Metodologia	15
2.1 Manutenção da linhagem ZFL	15
2.2 Exposição das células ao BPA	15
2.3 Avaliação da Viabilidade Celular por teste de exclusão do Azul de Tripan	16
2.4 Avaliação da Viabilidade Celular por Ensaio de MTT	16
2.5 Avaliação da Viabilidade Celular por Teste de Vermelho Neutro (VN)	16
2.6 Análises estatísticas	17
3. Resultados	17
3.1 Avaliação da Viabilidade Celular pelo método de Azul de Tripan	17
3.2 Avaliação da Viabilidade e Proliferação Celular por Ensaio de MTT	17
3.3 Avaliação da estabilidade da membrana lisossomal pelo método de Vermelho Neutro	18
4. Discussão	20
5. Conclusão	22
6. Referências	23
Considerações finais	25
Referências citadas	26

### Lista de Abreviaturas

ANOVA	ANÁLISE DE VARIÂNCIA
ANVISA	AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA
BPA	BISFENOL A
DEs	DESRUPTORES ENDOCRINOS
DMSO	DIMETILSULFÓXIDO
EFSA	EUROPEAN FOOD SAFE AUTHORITY
EPA	ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
HCl	ÁCIDO CLORÍDRICO
ICB	INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MTT	(3-(4,5-DIMENTHYLTHIAZOL-2-YL)-2-5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE)
NOAEL	NO OBSERVOL ADVERSE EFFECT LEVEL
RE	RECEPTORES DE ESTRÓGENOS
RPMI	ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE
SCF	SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD
SFB	SORO FETAL BOVINO
TDI	INGESTÃO DIÁRIA TOLERÁVEL
VN	VERMELHO NEUTRO
ZFL	HEPATÓCITOS DE ZEBRAFISH

## Avaliação da exposição de hepatócitos de *Danio rerio* ao Bisfenol A

### Resumo

A introdução de substâncias tóxicas no ambiente pode causar efeitos locais e alterações sistêmicas dos ambientes. Entre estas substâncias estão os desruptores endócrinos (DEs), que são descartados de forma indevida no meio ambiente, e estão presentes no solo e sedimentos onde podem ser causadores de graves problemas aos organismos, incluindo os seres humanos. O bisfenol A (BPA) é um DEs comumente encontrado no ambiente e no corpo humano e provoca efeitos na fertilidade, imunidade, sistema nervoso e comportamento. O fígado é o principal órgão para o metabolismo e detoxificação de BPA, desta forma podendo estar mais exposto aos seus efeitos, e alterações hepáticas podem ser úteis como marcadores que indicam a exposição a estressores ambientais/xenobióticos. A linhagem celular ZFL é derivada de fígados de peixes adultos da espécie *Danio rerio*, e fornecem um sistema importante para estudos *in vitro* do efeito de agentes tóxicos em células hepáticas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição de hepatócitos de Zebrafish a diferentes concentrações de BPA (0,1µg/L; 1µg/L; 10µg/L; 50µg/L), avaliando a viabilidade celular através de três metodologias: teste de exclusão de Azul de Tripán, teste de MTT e teste de incorporação do corante Vermelho Neutro (VN). Pelo método de exclusão do Azul de Tripán comparando-se os tratamentos de BPA no mesmo tempo, foi observado diminuição significativa na viabilidade celular em 30min nas concentrações 10µg/L e 50µg/L, o que não foi observado para os tempos de 24h e 48h. A baixa viabilidade observada no tempo 30 min pode estar relacionada a mecanismos de detoxificação (MXR) que só foram ativados nos tempos de 24h e 48h devido ao curto tempo de exposição, podendo estes mecanismos serem tempo e concentração dependentes em ZFL expostos ao BPA. Pelos métodos de MTT e VN foi observado um aumento significativo ao longo do tempo para todos os tratamentos, provavelmente devido à proliferação celular, entretanto, a concentração 50µg/L de BPA foi estatisticamente menor que os demais tratamentos em 30 min, 24h e 48h (MTT) e 24h e 48h (VN) em relação ao controle, o que pode indicar que as mitocôndrias, e mais tardiamente as membranas lisossomais, sejam alvos mais imediatos do efeito do BPA em ZFL. Pode-se concluir que o BPA induziu efeitos de diminuição de proliferação em ZFL expostas às concentrações 10µg/L e 50µg/L verificado pelos métodos de viabilidade celular analisados, sendo que os testes MTT e VN foram mais sensíveis ao verificar efeitos em maior tempo de exposição.

**Palavras – chave:** Desruptores Endócrinos, MTT, Vermelho Neutro, BPA, ZFL.

## Assessment of exposure to Bisphenol A in *Danio rerio* hepatocytes

### ABSTRACT

The introduction of toxic substances in the environment can cause local effects and systemic changes of environments. Among these substances are the endocrine disruptors (EDs), which are improperly disposed in the environment, and are present in soil and sediment which may be causing serious problems for organisms, including humans. Bisphenol A (BPA) is an EDs commonly found in the environment and in the human body and causes effects on fertility, immunity, nervous system and behavior. The liver is the main organ for metabolism and detoxification of BPA, in this way may be more exposed to its effects. Liver abnormalities may be useful as markers that indicate exposure to environmental / xenobiotics stressors. The ZFL cell is derived from fish liver of adult zebrafish, and provide an important system for in vitro studies of toxic agents effect in liver cells. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of exposure of zebrafish hepatocytes to different concentrations of BPA (0.1µg/L; 1µg/L, 10mg/L; 50mg/L), assessing cell viability through three methods: Trypan Blue exclusion assay, MTT assay and Neutral Red test (VN). By Trypan Blue exclusion method comparing the BPA treatments at the same time, a significant decrease was observed in the cell viability for 30min at concentrations of 10mg/L and 50mg/L, which was not observed for 24h and 48h. The low viability observed in time 30min can be related to detoxification mechanisms (MXR) that were activated only in times of 24h and 48h due to the short exposure time, these mechanisms can be time- and concentration- dependent in ZFL exposed to BPA. For the MTT and VN methods was observed a significant increase over time for all treatments, probably due to cell proliferation, however, concentration 50 mg/L of BPA was statistically lower than the other treatments for 30min, 24h and 48h (MTT) and 24h and 48h (VN) compared to the control group, which may indicate that mitochondria, and later the lysosomal membranes, are targets of more immediate effect of BPA in ZFL. It can be concluded that BPA induced proliferation lowering effects in ZFL exposed to concentrations of 10mg/L and 50mg/L verified by the analyzed methods of cell viability, and the MTT and VN tests were more sensitive to verify effects of longer exposition.

**Key-words:** Endocrine Disruptors, MTT test, Neutral Red test, BPA, ZFL.

## Introdução Geral

A introdução de substâncias tóxicas no ambiente, tanto de origem antrópica doméstica como agrícola, pode causar efeitos locais imediatos, bem como resultar em alterações sistêmicas como a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de reservatórios subterrâneos, o que pode levar a disseminação desta contaminação (Balinova, 1993, Brambilla *et al.*, 1993).

Essas substâncias tóxicas são também conhecidas como xenobióticos, que são substâncias químicas de origem exógena como plantas, produtos sintéticos, e poluentes ambientais, que quando incorporados pelos organismos, podem resultar em efeitos sobre muitos órgãos, como o sistema cardiovascular, sistema nervoso central, fígado e trato gastrointestinal (Zinedine *et al.*, 2007).

Dentre os diversos compostos químicos produzidos no mundo existem compostos de ordem doméstica, industrial e agrícola que possuem atividade hormonal, e estão presentes em repelentes, inseticidas, detergentes, solventes, dentre tantos outros produtos. (Sodré *et al.*, 2007). Essas substâncias são denominadas Desreguladores Endócrinos (DEs), pois são capazes de mimetizar os estrogênios e anti-androgênios e desta forma interferir em componentes do sistema endócrino como tireóide, hipotálamo e hipófise (Sonnenschein and Soto, 1998). Sua exposição pode estar relacionada com redução da fertilidade, queda da quantidade de esperma e aumento na incidência de câncer de mama, entre outros fatores (Aschengrau *et al.*, 1998).

Grande parte dos DEs é destinada de forma indevida no meio ambiente, estando presentes nas Estações de Tratamento de Esgoto, no solo e sedimentos marinhos (Clara, *et al.*, 2004), onde podem ser causadores de graves problemas aos organismos como plantas, aves e peixes. Os DEs também podem atingir lençóis freáticos (Steinmetz, *et al.*, 1998) e, desta forma interferir na vida dos seres humanos principalmente no período de reprodução, provocando início precoce da maturação sexual, redução da produção espermática, desenvolvimento de tecidos alterados na organização da glândula mamária (Stocker *et al.*, 2003), crescimento da próstata (Prins, 2008), desenvolvimento de problemas neurológicos (Leranth *et al.*, 2008), e mau funcionamento da tireoide, bloqueando os receptores do hormônio desta glândula (Zoeller, 2007).

A grande preocupação em relação aos desreguladores endócrinos se deve não apenas aos seus efeitos no meio ambiente, mas também pelo fato de causarem diversos efeitos aos organismos mesmo quando expostos a concentrações muito baixas (Bila and Dezotti,

2007). Os receptores de estrogênio (RE) tornam-se mais suscetíveis à ativação por uma variedade de compostos ambientais, tais como os xenoestrógenos, devido ao fato de serem pouco específicos (Bolger *et al.* 1998).

Um exemplo de DEs comumente encontrado tanto no ambiente como na alimentação é o Bisfenol A (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano, BPA). O BPA foi sintetizado pela primeira vez em 1891 pelo químico russo Alexander Dianin, e durante a década de 1930 já existiam estudos sobre o potencial uso comercial do BPA como um estrógeno sintético. Embora a atividade estrogênica do BPA tenha sido confirmada, testes realizados no mesmo período com outro composto sintético estruturalmente relacionado, o diethylstilbestrol (DES) indicaram que o DES exercia ação estrogênica bem mais potente que o BPA. O uso do BPA como estrogênio sintético foi então abandonado em favor do DES, o qual passou a ser administrado a mulheres grávidas desde o final da década de 1940 (como tratamento terapêutico contra problemas relacionados à menstruação, menopausa, náuseas durante a gravidez, e para prevenção de abortos) até 1971, quando seu uso foi relacionado a problemas incluindo abortos, nascimentos prematuros, bem como o desenvolvimento de cânceres vaginal e cervical nas filhas de mulheres expostas (Vogel, 2009).

A partir do desenvolvimento da química orgânica e sintética, houve um aumento na produção de plásticos e polímeros sintéticos, que se tornaram muito utilizados em nossas vidas. Devido ao baixo custo e praticidade, o plástico logo passou a ser incorporado em diversos tipos de embalagens, porém o visual não era atrativo, as embalagens apresentavam aspecto quebradiço demonstrando fragilidade do material (Beserra *et al.*, 2012). Entretanto, a partir dos anos de 1940 foi identificada a utilidade do BPA na indústria dos plásticos, proporcionando maior resistência e maleabilidade aos produtos. Com o passar do tempo, o BPA passou a ser utilizado em ampla gama de produtos, constituindo a unidade básica de polímeros e revestimentos de alto desempenho e durabilidade sendo utilizado na produção de plásticos policarbonatos, selantes dentários à base de resina (Tsai, 2006), resinas epóxi em revestimento interno de enlatados (Erickson, 2008), tampas de garrafas, frascos de comida de bebês (Kang *et al.*, 2006; Benachour and Aris, 2009). Podem ser encontrados também em adesivos, papéis para fax, tubulações, painéis de carros e produtos eletrônicos (Biles *et al.*, 1997).

O BPA é quimicamente obtido pela condensação de acetona com duas moléculas de fenol em presença de ácido clorídrico (HCl), utilizando cloreto de zinco como catalisador (Kang *et al.*, 2006; Vanderberg *et al.*, 2009). Devido à sua polimerização incompleta e degradação dos polímeros pela exposição a temperaturas extremas, a contaminação por

BPA, tanto via ambiente como alimentar, ocorre principalmente através da lixiviação de polímeros de embalagens em contato com alimentos e água, especialmente quando aquecidos e/ou congelados (García-Díaz and Macías-Matos, 2008; Le *et al.*, 2008). Já é bem documentada a ação estrogênica do BPA devido a sua ligação à receptores de estrógeno (Ghiselli and Jardim, 2007).

O BPA pode ser absorvido por via oral, através de dieta. Contudo, alguns estudos têm demonstrado que o BPA pode ser absorvido também por via dérmica quando presente no ambiente (Kang *et al.*, 2006; Von Goetz *et al.*, 2010), além disso, quando ingerido agregado a alimentos ou bebidas, o BPA é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal e fígado, e parte dele é imediatamente conjugada com ácido glucurônico para BPA-glucuronido, não ativo, na parede do intestino e fígado. Quantidades pequenas de BPA podem ainda reagir com sulfato formando BPA-sulfato. A formação desses conjugados de BPA constituem o processo de detoxificação (Matthews *et al.*, 2001, Snyder *et al.*, 2000), portanto somente as formas livres de BPA possuem atividade estrogênica. Em seres humanos, posterior a sua formação, os conjugados de BPA são liberados na corrente sanguínea, atingem o rim e desta forma são excretados na urina (Völkel *et al.*, 2002, 2005). O processo de detoxificação em humanos resulta em baixas doses de BPA estrogênico, quando em absorção oral de baixas doses.

Segundo a revisão de Erler and Novak (2010), a exposição humana, mesmo a baixas doses de BPA, provocam efeitos sobre a fertilidade, sistema nervoso e comportamento, e pode provocar prejuízos a saúde, como diabetes, câncer, puberdade precoce, obesidade e doenças cardíacas. Outros estudos mostraram que a exposição de camundongos ao BPA, desencadeou a diferenciação de células fibroblásticas em adipócitos (Sakurai *et al.*, 2004), maturação acelerada de camadas de gordura e aumento no número de adipócitos em glândulas mamárias (Vandenberg *et al.*, 2007).

Por ser um estrógeno não esteroide, o BPA interfere com a ligação de 17  $\beta$ -estradiol ao seu receptor nos tecidos-alvo. Além disso, é capaz de mimetizar, amplificar, inibir a atividade de estrógenos endógenos ou interferir na ação de receptores nucleares de estrógeno, tendo efeitos na função tireoidiana, no desenvolvimento do sistema imune, na diferenciação e função do sistema nervoso, efeitos no metabolismo e efeitos androgênicos (Wetherill *et al.*, 2007).

Em 2002 uma avaliação publicada por especialistas do Scientific Committee on Food (SCF) da União Europeia estabeleceu com base em seus estudos, a dose diária de 0,01 mg de BPA/Kg de massa corporal. Nos anos posteriores foram publicados estudos da EFSA

(European Food Safe Authority), considerando efeitos do BPA em humanos levando a redefinição dos parâmetros toleráveis de BPA no organismo (T.D.I. – Ingestão Diária Tolerável) em 0,05 mg/Kg de massa corporal (Gatti, 2009). Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos (EPA) estabeleceu que a NOAEL (Nível de Efeito Adverso Não Observado) para exposição crônica de Bisfenol A é de 50mg/kg de peso corporal por dia (IRIS 1988), mas como segurança é considerada uma dose 1000x inferior, isto é, 50µg/kg/dia.

No Brasil, somente em 2011, a ANVISA proibiu, por meio da Resolução RDC n.41/2011, a fabricação de mamadeiras plásticas contendo o BPA em sua composição a partir de Janeiro de 2012 (ANVISA, 2015). O principal argumento desta Instituição é que estudos realizados mostraram que o BPA poderia causar problemas neurológicos e hormonais principalmente em crianças expostas nos anos iniciais de vida (Beserra *et al.*, 2012).

Contudo, significativo número de estudos tem sido publicado nos últimos anos mostrando o efeito prejudicial do Bisfenol A, tanto em diferentes espécies animais como culturas celulares, tanto primárias quanto estabelecidas (Dimastrogiovanni *et al.*, 2015; Erler *et al.*, 2010; Maffini *et al.*, 2006; Vom Saal and Hughes, 2005). Quando administrado *in vivo*, além de importantes danos no sistema reprodutor, também têm sido observados efeitos no sistema nervoso (MacLusky *et al.*, 2005), no comportamento (Farabollini *et al.*, 1981) e no sistema imune (Sawai *et al.*, 2003, Yoshino *et al.*, 2004). Estes resultados preocupam ainda mais considerando que em muitos estudos a administração do BPA aconteceu em doses inferiores às consideradas permitidas nos alimentos (Vom Saal and Hughes, 2005). Além disso, ainda são poucos os trabalhos que abordam efeitos do BPA não relacionadas ao sistema reprodutor, e desta forma, o potencial impacto de sua exposição em diferentes funções se não aquelas relacionadas à reprodução, não deve ser negligenciado. Devido às diversas variáveis encontradas em estudos com os mais variados modelos experimentais, a ingestão diária tolerável (TDI) continua ainda sendo discutida por agências regulamentadoras.

Desta forma devido a crescente ocorrência de substâncias exógenas incluindo os DES contaminando tanto o ambiente e alimentos, é imprescindível que haja investigação quanto a seus efeitos nos organismos que podem estar constantemente expostos a essas substâncias. Como o fígado é o principal órgão para o metabolismo e detoxificação de DES (Lang *et al.*, 2008), vários autores sugerem o estudo de tecidos/células hepáticas como modelo para o estudo das interações entre meio ambiente e estruturas/funções hepáticas,

onde as alterações poderiam ser úteis como marcadores que indicam a exposição a estressores ambientais ou xenobióticos (Brusle and Anadon, 1996; Dimastrogiovanni *et al.* 2015; Huc *et al.* 2012; Moon *et al.* 2012; Pritchett *et al.* 2002).

A linhagem celular ZFL é derivada de fígados de peixes adultos da espécie *Danio rerio*, também conhecida como *peixe-zebra* ou *paulistinha*. Essa linhagem apresenta morfologia típica de células epiteliais e são células aderentes. As células ZFL continuam a exibir propriedades do parênquima hepático após 100 gerações em cultura, podendo fornecer um sistema *in vitro* muito importante para estudos toxicológicos, de metabolismo e de formação de metabólitos em células hepáticas (Ghosh *et al.*, 1994; Miranda *et al.*, 1993). Atualmente, muitos estudos toxicológicos envolvendo células ZFL estão sendo realizados e o uso dessas células nas pesquisas está em constante crescimento (Chan *et al.*, 2006; Chen and Chan., 2011; Cheuk *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2012; Seok *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2009;).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da exposição de hepatócitos de *Danio rerio* da linhagem celular ZFL, a diferentes concentrações de BPA, através da viabilidade celular avaliada pelo teste de exclusão do Azul de Tripán (Adaptado de Goulart *et al.*, 2015); da proliferação celular e atividade mitocondrial, avaliadas pelo método de MTT (Goulart *et al.*, 2015), e da estabilidade da membrana lisossomal avaliada pelo Teste de Vermelho Neutro (Rogerio *et al.*, 2003). O teste de exclusão de Azul de Tripán permite detectar células não viáveis, cuja membrana, por apresentar danos, permite a incorporação do corante e coram-se em azul; enquanto que as células viáveis, por apresentarem membrana íntegra, bloqueiam a passagem do corante ficando transparentes. O método de MTT baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria. Deste modo, quanto menor a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico. Outro parâmetro muito utilizado na estimativa da toxicidade celular é a avaliação da viabilidade celular evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro (VN), que é solúvel em água e que passa através da membrana celular, ficando retido nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias tóxicas danificam as membranas resultando no decréscimo de ligação e retenção do vermelho neutro no lisossomo. A captação do VN pelas células viáveis pode ser quantificada por espectrofotometria, e desta

forma é possível se fazer a distinção entre células vivas e células danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular.

## Artigo a ser submetido à revista *Toxicological Sciences*

### Avaliação da Exposição de Hepatócitos de *Danio rerio* ao Bisfenol A

Gizielen Rodrigues Gonçalves<sup>a</sup>; Isabel Soares Chaves<sup>b</sup>; Pablo Elias Martinez<sup>ab</sup>.

<sup>a</sup> Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado - Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil;

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

#### Resumo

Entre as diversas substâncias tóxicas introduzidas no ambiente estão os desruptores endócrinos (DEs), que são descartados de forma indevida e estão presentes no solo e sedimentos, onde podem ser causadores de graves problemas aos organismos, incluindo os seres humanos. O bisfenol A (BPA) é um DEs comumente encontrado no ambiente, e no corpo humano e provoca efeitos na fertilidade, imunidade, sistema nervoso e comportamento. O fígado é o principal órgão para o metabolismo e detoxificação de Bisfenol A (BPA), desta forma pode estar mais exposto aos seus efeitos. Os hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) fornecem um sistema importante para estudos *in vitro* do efeito de agentes tóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição da linhagem ZFL ao BPA, através da avaliação de viabilidade celular por testes de exclusão de Azul de Tripán, teste de MTT e teste de Vermelho Neutro (VN). Pelo método de Azul de Tripán, se observou diminuição da viabilidade em 10µg/L e 50µg/L de BPA apenas no tempo de 30 min. Estes resultados podem estar relacionados a mecanismos de detoxificação que podem ser tempo e concentrações dependentes. Pelos métodos de MTT e VN foi observado uma diminuição de proliferação celular na concentração de 50µg/L de BPA em 30 min, 24h e 48h (MTT) e 24h e 48h (VN), o que pode indicar que as mitocôndrias, e mais tardiamente as membranas lisossomais, sejam alvos mais imediatos do efeito do BPA em ZFL. Pode-se concluir que o BPA induziu efeitos na inibição da proliferação em hepatócitos ZFL expostas às concentrações 10µg/L e 50µg/L verificado pelos métodos viabilidade celular analisados, sendo que os dois últimos testes foram mais sensíveis ao verificar efeitos em maior tempo de exposição.

Palavras-chave: Desruptores Endócrinos, MTT, Vermelho Neutro, BPA, ZFL, *Danio rerio*

## 1. Introdução

Com o aumento da produção de diversas classes de produtos químicos e, conseqüentemente, da sua utilização (Andrady and Neal, 2009), a geração de resíduos tem aumentado abruptamente. A falta de conhecimento e muitas vezes o descuido e/ou descaso por parte do ser humano para com o meio ambiente tem levado à degradação da qualidade ambiental pela contaminação por xenobióticos e agentes químicos de origem antropogênica. Essa contaminação tem exercido uma série de efeitos adversos nos organismos vivos, no funcionamento dos ecossistemas e conseqüentemente na saúde humana (Vom Saal and Hughes, 2005).

O Bisfenol A é um desregulador endócrino com atividade estrogênica (xenoestrógeno) muito utilizado como estabilizante na produção de plásticos, inclusive embalagens de alimentos, policarbonatos, epóxi, poliéster insaturado e resinas polisulfonadas, entre muitos outros produtos (Cousins *et al.*, 2002). Os efeitos da exposição ao BPA não são restritos à fisiologia reprodutiva, apresentando ações em uma ampla variedade de funções fisiológicas (Oehlmann *et al.*, 2009). Em ratos, além de importantes danos no sistema reprodutor, também têm sido observados efeitos no sistema nervoso (MacLusky *et al.*, 2005), no comportamento (Farabollini *et al.*, 1981) e no sistema imune (Rogers *et al.*, 2013, Sawai *et al.*, 2003, Yoshino *et al.*, 2004). Estes dados preocupam ainda mais considerando que em muitos estudos a administração do BPA aconteceu em doses inferiores às consideradas permitidas nos alimentos (0,05mg/Kg/dia) (Vom Saal and Hughes, 2005). Além disso, ainda são poucos os trabalhos que abordam efeitos do BPA não relacionados ao sistema reprodutor, e desta forma, o potencial impacto de sua exposição em diferentes funções se não aquelas relacionadas à reprodução, não deve ser negligenciado.

O BPA pode ser absorvido por via oral, através de dieta. Contudo, alguns estudos demonstraram que o BPA pode ser absorvido também por via dérmica quando presente no ambiente (Kang *et al.*, 2006; Von Goetz *et al.*, 2010), além disso, quando ingerido agregado a alimentos ou bebidas, o BPA é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal e fígado, e parte dele é imediatamente conjugada com ácido glucurônico para BPA-glucuronido, não ativo, na parede do intestino e fígado. Pequenas quantidades de BPA podem reagir com sulfato formando BPA-sulfato. A formação desses conjugados de BPA constituem o processo de desintoxicação (Matthews *et al.*, 2001, Snyder *et al.*, 2000), portanto somente as formas livres de BPA possuem atividade estrogênica. Em seres humanos, posterior a sua formação, os conjugados de BPA são liberados na corrente sanguínea, atingem o rim e

desta forma são excretados na urina (Völkel *et al.*, 2002, 2005). O processo de detoxificação em humanos resulta em baixas doses de BPA estrogênico, quando em absorção oral de baixas doses.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da exposição de hepatócitos da linhagem ZFL a diferentes concentrações de BPA.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Manutenção da linhagem ZFL**

A linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) foi adquirida da American Type Culture Collection – American collection (ATCC), depositada no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Maria Monserrat. No Laboratório de Cultura do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) da FURG, as células foram mantidas em garrafas de cultura celular (25cm<sup>2</sup>) em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Antibiótico (penicilina/estreptomicina) em estufa a 28°C. As células foram repicadas uma vez por semana.

### **2.2 Exposição das células ao BPA**

Após o repique, as células foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo teste de exclusão de Azul de Tripán, assumindo-se viabilidade maior que 95% para realização dos experimentos. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços com a concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI sem vermelho fenol contendo 1% de antibiótico/antimicótico e 5% de SFB tratado com carvão ativado para descartar a possibilidade de hormônios esteroides interferirem com a ação do BPA. As células foram deixadas aderindo por cerca de 24h em estufa a 28°C antes das exposições.

Após o período de adesão as células foram expostas à diferentes concentrações de BPA: 0,1µg/L (0,438µM); 1µg/L (4,38µM); 10µg/L (43,8µM); 50µg/L (219µM) e tratamentos Controle (CTR) e Controle veículo (CTR DMSO), todos os tratamentos contendo meio RPMI sem vermelho fenol. As células foram expostas a estes tratamentos durante 30 min, 24hs e 48hs. Para a solução estoque de BPA foi utilizado DMSO como diluente, em concentração final de 0,05%. O controle veículo recebeu a mesma concentração de DMSO. Ao final de cada exposição realizou-se a avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão de Azul de Tripán, o teste de MTT e o teste de Vermelho Neutro. Para todas as análises, foram realizados 5 experimentos com 5 réplicas para cada tratamento.

### **2.3 Avaliação da Viabilidade Celular por teste de exclusão do Azul de Tripán**

(Adaptado de Goulart *et al.*, 2015)

Após a exposição das células ao BPA, as placas foram centrifugadas a 1600rpm por 5 minutos, retirado o meio com a exposição e as poças foram lavadas com PBS e as células ressuspensas com tripsina e após sua ação neutralizada com a mesma quantidade de meio RPMI sem soro, depois foram diluídas em Azul de Tripán (0,08%) para contagem em câmara de Neubauer, onde foi registrado o número de células viáveis (não coradas) e de células não viáveis (coradas de azul).

### **2.4 Avaliação da Viabilidade Celular por Ensaio de MTT (Goulart *et al.*, 2015)**

Após a exposição das células ZFL ao BPA, as placas foram centrifugadas a 1600rpm por 5 minutos, retirado o sobrenadante e as células foram lavadas com PBS em temperatura ambiente. Em cada poço, foi adicionado 200µL de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma Aldrich, St Louis – USA] diluído em meio RPMI em uma concentração final de 0,5mg/mL e incubado por 3 horas em estufa a 28°C protegido da luz. Após a incubação com MTT, foi realizada nova centrifugação (1600 rpm, 5 minutos), removido o sobrenadante e adicionados 200µL de DMSO às poças, e então lida a absorbância em leitora de microplaca em 550nm.

### **2.5 Avaliação da Viabilidade Celular por Teste de Vermelho Neutro (VN)**

(Rogerio *et al.*, 2003)

Após a exposição das células ZFL ao BPA, as placas de exposição foram centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos, o sobrenadante removido e as poças lavadas com PBS em temperatura ambiente. Em cada poço foi adicionado 200µL de VN (3-amino-2-methyl phenazine-amino-7dimetil chloride, Sigma Aldrich, St Louis – USA) diluído em meio RPMI em uma concentração final de 0,04 mg/mL, e incubado por 3 horas em estufa a 28°C protegido da luz. Após a incubação com VN, foi realizada nova centrifugação, removido o sobrenadante e adicionado às poças 200µL de Formaldeído 0,5% em solução de Cloreto de Cálcio 1% e deixado agir por 5 minutos. A placa foi novamente centrifugada (1600rpm, 5 minutos), e depois de removido o sobrenadante foi adicionado 100µL de solução álcool-ácido (1% de ácido acético em etanol 50%) e então lida a absorbância em leitora de microplaca em 550nm.

## **2.6 Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Os resultados foram comparados através do teste de ANOVA para amostras independentes, seguido por teste *a posteriori* de Tukey. Os pressupostos da ANOVA (normalidade e homogeneidade de variâncias) foram previamente testados (Zar, 1984). O nível de significância utilizado em todos os casos foi de 5%.

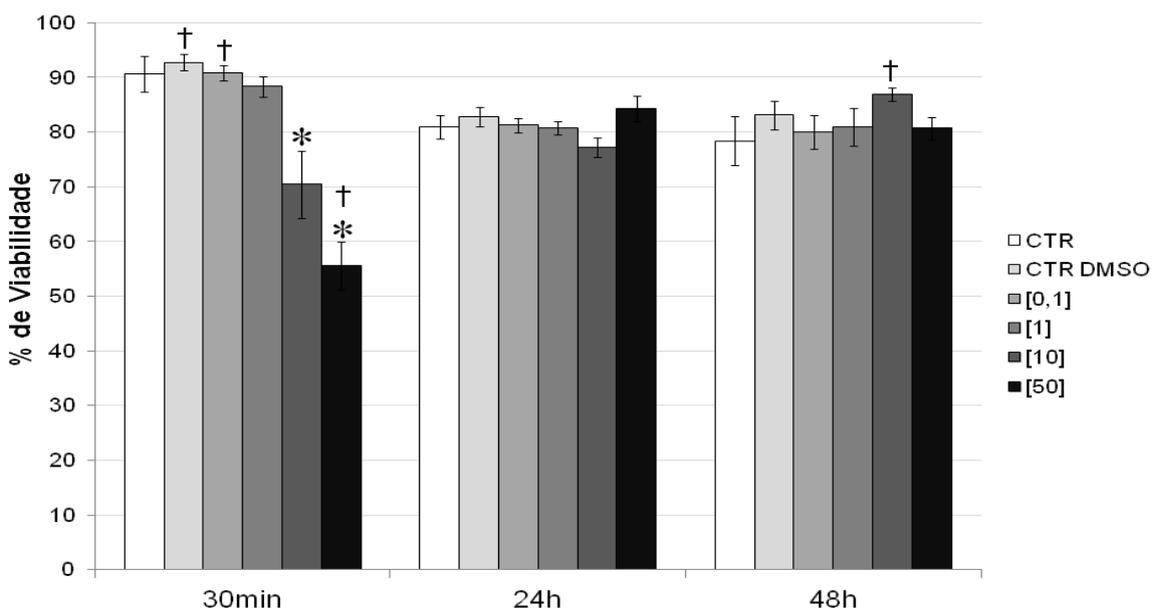
## **3. Resultados**

### **3.1 Avaliação da Viabilidade Celular pelo método de Azul de Tripán**

Os resultados de Viabilidade Celular pelo método de exclusão por Azul de Tripán são apresentados na Figura 1. Ao comparar-se a viabilidade dos diferentes tratamentos no mesmo tempo, não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) nos tempos de 24h e 48h. Entretanto, no tempo de 30 minutos foi observada diminuição significativa da viabilidade nos tratamentos 10 $\mu$ g/L e 50 $\mu$ g/L de BPA. Quando comparado o mesmo tratamento nos diferentes tempos, apesar de ter sido observada diminuição significativa na viabilidade celular, no tratamento CTR DMSO ao longo do tempo, quando este tratamento é comparado ao controle no mesmo tempo, não existe diferença significativa na viabilidade. Quando comparado o mesmo tratamento nos diferentes tempos foi observada diminuição significativa na viabilidade no tratamento de 0,1 $\mu$ g/L de BPA, sendo o tempo 30 min significativamente mais alto dos tempos 24h e 48h. Já nas duas maiores concentrações foi observado um aumento na viabilidade, onde em 10 $\mu$ g/L de BPA a viabilidade em 48h foi significativamente maior que 30 min e 24h, e em 50 $\mu$ g/L de BPA a viabilidade em 30 min foi significativamente menor que em 24h e 48h.

### **3.2 Avaliação da Viabilidade e Proliferação Celular por Ensaio de MTT**

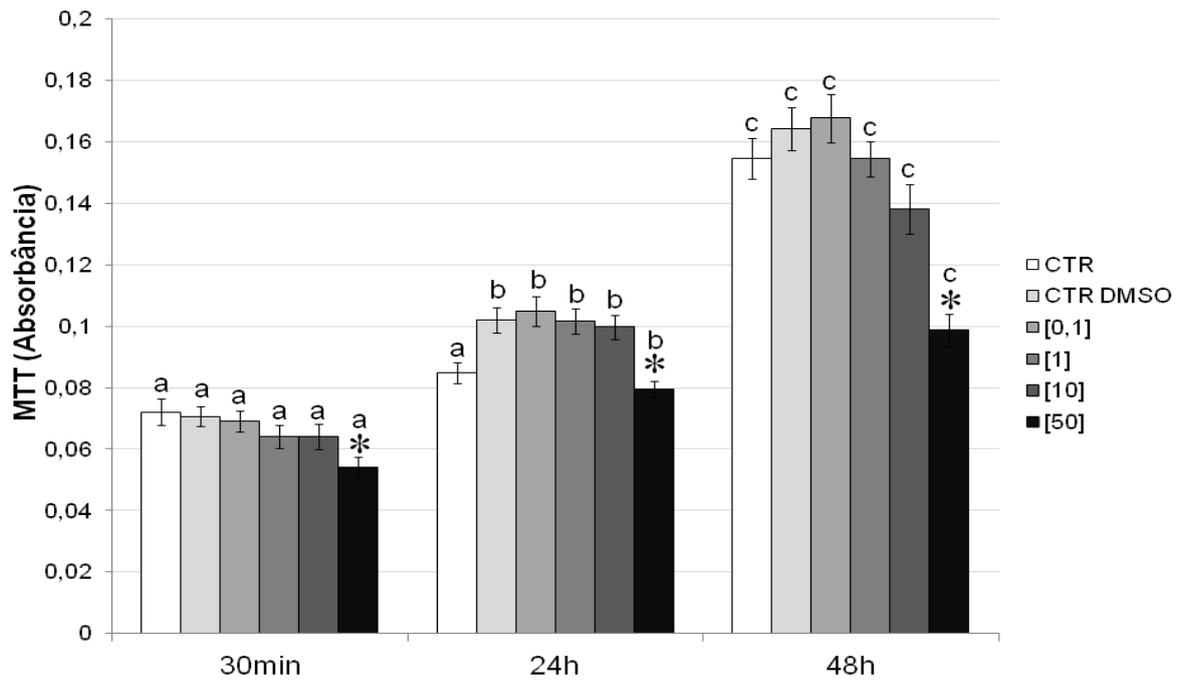
Os resultados relativos ao teste de MTT estão apresentados na Figura 2. Quando comparados os diferentes tratamentos no mesmo tempo, foi observado que o tratamento de 50 $\mu$ g/L de BPA foi significativamente menor que os demais ( $p < 0.05$ ) em todos os tempos avaliados. Porém quando se comparou cada tratamento ao longo do tempo, ainda foi observado um aumento significativo na absorbância para todos os tratamentos, de 30 min às 48h.



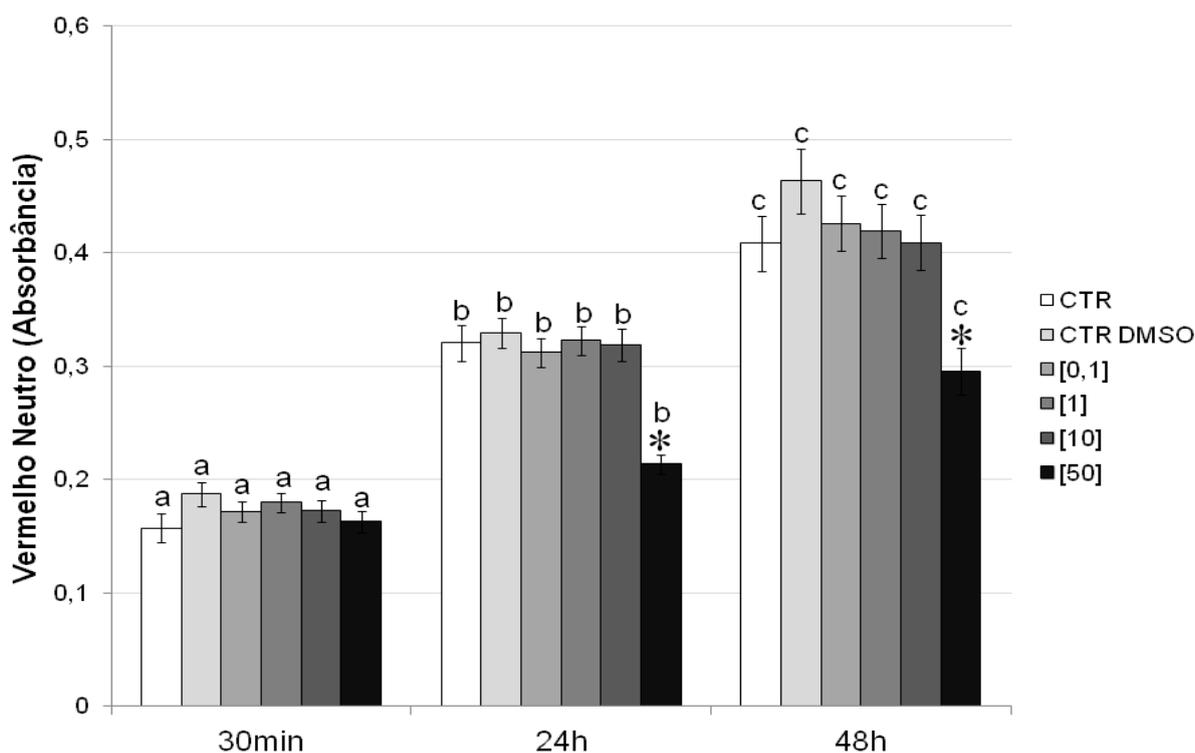
**Figura 1** - Viabilidade Celular pelo método de exclusão por Azul de Tripán em células ZFL expostas a 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L e 50µg/L de BPA e grupos Controles. Dados são expressos como média ± erro padrão. n=15. Símbolo (\*) indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias dos tratamentos no mesmo tempo ( $p < 0.05$ ) e (†) indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias do mesmo tratamento nos tempos de 30 min, 24h e 48h ( $p < 0.05$ ).

### 3.3 Avaliação da estabilidade da membrana lisossomal pelo método de Vermelho Neutro

Os resultados de estabilidade da membrana lisossomal são apresentados na Figura 3. Ao se comparar os diferentes tratamentos em um mesmo tempo, não foi observada diferença significativa ( $p < 0.05$ ) no tempo de 30 minutos. Porém nos tempos de 24h e 48h foi observada redução significativa da estabilidade da membrana lisossomal na concentração de 50µg/L de BPA quando comparado ao controle. Quando comparado cada tratamento ao longo do tempo, foi observado um aumento significativo na absorbância para todos os tratamentos, de 30 min às 48h.



**Figura 2** - Viabilidade e Proliferação Celular por Ensaio de MTT em células ZFL expostas a 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L e 50µg/L de BPA e grupos Controles. Dados são expressos como média ± erro padrão. n=25. Símbolo (\*) indica diferenças estatísticas significativas entre as médias dos tratamentos no mesmo tempo ( $p < 0.05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias do mesmo tratamento nos tempos de 30 min, 24h e 48h ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3** – Estabilidade da membrana lisossomal por Ensaio de Vermelho Neutro em células ZFL expostas a 0,1µg/L, 1µg/L, 10µg/L e 50µg/L de BPA e grupos Controles. Dados são expressos como média ± erro padrão. n=25. Símbolo (\*) indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias dos tratamentos no mesmo tempo ( $p < 0.05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias do mesmo tratamento nos tempos de 30 min, 24h e 48h ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussão

Os resultados de viabilidade celular avaliados pelos três métodos empregados mostram diferenças significativas tanto quando analisados os tratamentos no mesmo tempo de exposição, quanto quando analisados cada tratamento ao longo do tempo de exposição (Figuras 1,2 e 3).

Pelo método de exclusão do Azul de Tripán (Figura 1) se comparando os tratamentos de BPA no mesmo tempo, foi observado que em 30 min as duas maiores concentrações de BPA (10µg/L e 50µg/L) apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular, o que não foi observado para os tempos de 24h e 48h. Ainda, quando se analisou essas mesmas concentrações ao longo do tempo, foi observado no tempo 30min viabilidade significativamente menor que 24h (10µg/L e 50µg/L) e 48h (10µg/L). Esta baixa viabilidade, observada no tempo 30min, pode estar relacionada a mecanismos de

detoxificação ativados nos tempos de 24h e 48h e que em 30 min ainda não havia sido possível tal ativação pelo curto tempo de exposição.

Os organismos aquáticos desenvolveram mecanismos de defesa conhecidos como resistência a múltiplos xenobióticos (MXR) (Kurelec, 1992; Bard, 2000), tendo em vista que estão expostos a uma grande variedade de compostos tóxicos tanto de origem natural como antropogênica. O princípio da MXR é comparável ao mecanismo de resistência a múltiplas drogas (MDR) primeiramente descritas em linhagens celulares tumorais, onde as bombas glicoproteínas-P (P-gp) são as mais extensivamente estudadas responsáveis pelo mecanismo MDR. Estas P-gps são proteínas de transporte de membrana responsáveis pelo efluxo ativo de uma vasta gama de substratos endógenos e xenobióticos, e atuam reduzindo o acúmulo intracelular dessas substâncias e, desta forma, protegendo a célula de efeitos potencialmente tóxicos. Hormônios esteroides podem agir como moduladores deste mecanismo, e existem estudos demonstrando que o BPA é capaz de modular a atividade de mecanismos de detoxificação como os associados à MDR, dependendo da sua concentração e tipo celular (Anselmo *et al.*, 2012).

Quando avaliada a viabilidade celular pelo método de MTT, comparando cada tratamento ao longo do tempo, foi observado um aumento significativo no número de células para todos os tratamentos, incluindo os controles, nos tempos de 30 min à 48h (Figura 2). Esses resultados apontam para a possibilidade de o BPA estar influenciando na diminuição da proliferação celular, pois apesar de todas as leituras de MTT aumentarem significativamente ao longo do tempo, a concentração de 50µg/L aumenta menos em relação ao controle. A diminuição da atividade mitocondrial, resultando nos mais baixos valores de MTT observados na maior dose de BPA pode representar uma estratégia celular na exposição ao BPA, onde as células poupam energia para manterem-se vivas.

Os resultados de viabilidade celular avaliada pela estabilidade da membrana lisossomal (Figura 3) corroboram os resultados do ensaio de MTT, mostrando que houve um aumento da retenção do vermelho neutro em todos os tratamentos ao longo do tempo, e também que apesar deste aumento, a retenção do corante pelos lisossomos dos hepatócitos foi menor na maior concentração de BPA testada (50µg/L) quando comparada com os demais tratamentos nos tempos de 24h e 48h, confirmando a possível inibição de proliferação celular, reforçada pela ausência de redução na viabilidade por Azul de Tripan.

Apesar de ser bem documentada a ação estrogênica do BPA na proliferação de células (Keri *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012; Rivas *et al.*, 2002) mesmo em doses consideradas muito baixas (Sheng *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2013) atuando nas mesmas vias

de resposta dos hormônios esteroides através da ligação com RE, vários trabalhos relatam a ação citotóxica do BPA em células hepáticas de diferentes espécies. Em Pritchett *et al.* (2002) foi verificada citotoxicidade em cultura primária de hepatócitos de ratos, camundongos e humanos através do teste de LDH (teste de lactato desidrogenase), na concentração de 50 $\mu$ M de BPA, uma concentração muito próxima da segunda maior concentração de BPA utilizada em nosso trabalho (10 $\mu$ g/L). Ainda, Yang and Chan (2014) estabeleceram a concentração de 367,1 $\mu$ M como LC50 para a linhagem ZFL, e nesta concentração foi observado que o BPA afetou a transcrição de enzimas de metabolização hepática de fase II, o que pode prejudicar os processos de detoxificação que ocorrem nesta fase, como a conjugação do BPA com ácido glucurônico resultando em BPA-glucuronido não ativo, na parede do intestino e fígado (Matthews *et al.*, 2001, Snyder *et al.*, 2000), e portanto, não detoxificando as formas livres de BPA que possuem atividade estrogênica. O processo eficiente de detoxificação em humanos, resulta em baixas doses de BPA estrogênico, quando em absorção oral de baixas doses.

De fato, com os resultados encontrados neste trabalho e aqueles encontrados por outros autores, é possível se deduzir que apesar das diferentes abordagens de avaliação da toxicidade provocada pelo BPA, todas as informações convergem para a mesma opinião de que a exposição ao BPA é capaz de provocar prejuízos em diferentes linhagens e tipos celulares podendo seus efeitos ser dependentes da dose e do tempo.

## 5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o BPA induziu efeitos de diminuição de proliferação celular em ZFL expostos às concentrações 10 $\mu$ g/L e 50 $\mu$ g/L verificado pelos métodos viabilidade por Azul de Tripán, ensaio de MTT e estabilidade da membrana lisossomal por ensaio de Vermelho Neutro, sendo que os dois últimos testes foram mais sensíveis ao verificar efeitos em maior tempo de exposição, possivelmente devido à mitocôndria ser um alvo mais imediato do efeito do BPA. É crescente a importância dada a assuntos relacionados aos efeitos dos DEs nos diferentes sistemas e organismos. Desta forma, torna-se de extrema importância a realização de mais estudos para elucidar os possíveis efeitos do BPA, bem como de outros DEs, em ZFL, tanto por períodos mais prolongados de exposição, como também a avaliação de outros parâmetros importantes, como a expressão de receptores de estrógenos e parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

## 6. Referências

- Andrady A.L., and Neal M.A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 1977–1984.
- Anselmo, H.M.R., Van den bereg, J.H.J., Rietjens, I.M.C.M., Murk, A.T.J. (2012). Inhibition of cellular efflux pumps involved in multi xenobiotic resistance (MXR) in echinoid larvae as a possible mode of action for increased ecotoxicological risk of mixtures. *Ecotoxicol.* 21, 2276–2287.
- Bard, S.M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat Toxicol.* 48, 357–389.
- Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8, 1107-1135.
- Farabolini, F., Lupo Di Prisco, C., Dessì-Fulgheri, F. (1981). Modifications of brain steroidogenesis and plasma steroids after p-chlorophenylalanine-methyl-ester treatment in male rats and rabbits. *Pharmacol Biochem Be.* 14, 911–914.
- Goulart, T.L.S., Boyle, R.T., Souza, M.M. (2015). Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb and Furadan 350 SC on the zebrafish cell line, ZFL. *Toxicology in Vitro.* 29, 1377–1384.
- Keri, R.A., Ho, S., Hunt, P.A., Knudsen, K.E., Soto, A.M., Prins, G.S. (2007). An Evaluation of Evidence for the Carcinogenic Activity of Bisphenol A. *Reprod Toxicol.* 24, 240–252.
- Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol.* 22, 23–43.
- Lee, H., Hwang, K., PARK, M., Yi, B., Jeung, E., Choi, K. (2012) Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. *Int J Mol Med.* 29, 883-890.
- Maclusky, N.J., Hajszan, T., Leranthy, C. (2005). The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect.* 113,
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J., Tyler, C.R. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 2047-2062.

- Pritchett, J.J., Kuester, R.K., Sipes, I.G. (2002). Metabolism Of Bisphenol A In Primary Cultured Hepatocytes From Mice, Rats, and Humans. *Drug Metab Dispos.* 30, 1180–1185.
- Rivas, A., Lacroix, M., Olea-Serrano, F., Latorres, I., Leclercq, G., Olea, N. (2002). Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*82, 45–53.
- Rogero, O.S., Lugão, A.B., I.T.I., Cruz, A.S. (2003). Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research.* 3, 317-320.
- Rogers, J.A., Metz, L., Yong, V.W. (2013). Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol -A and its potential mechanisms. *Mol Immunol.* 53, 421–430.
- Sawai, C., Anderson, K., Walser-Kuntz, D. (2003). Effect of bisphenol A on murine immune function: modification of interferon- $\gamma$ , IgG2a, and disease symptoms in NZB x NZW F1 mice. *Environ Health Perspect.* 111, 1883-1887.
- Sheng, Z.G., Huang, W., Liu, Y.X., Zhu, B.Z. (2013). Bisphenol a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 267, 88-94.
- Vom Saal, F.S., and Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Persp*, 113, 8.
- Wu, M., Wang, L., Xu, G., Liu, N., Tang, L., Zheng, J., Bu, T., Lei, B. (2013). Seasonal and spatial distribution of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in the Huangpu River and its tributaries, Shanghai, China. *Environ Monit Assess.* 185, 3149–3161
- Yang, J., and Chan, K.M. (2014). Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99,209, TBBPA) and bisphenol A (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL *Aquatic Toxicol.* 159, 138–147.
- Yoshino, S., Yamaki, K., Li X., Sai, T., Yanagisawa, R., Takano, H., Hayashih, T.S., Mori, Y. (2004). Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunol.* 112, 489–495.
- Zar, J.H. (1984). Biostatistical analysis. Ed. Prentice Hall, 2a. ed., New Jersey. 718 pp.

## Considerações finais

Apesar de vários trabalhos realizados *in vivo* demonstrarem efeitos deletérios da exposição ao BPA em diferentes espécies (Chitra and Maiby, 2014, Hassan *et al.*, 2012, Kausch *et al.*, 2008, Keri *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2012), os métodos utilizados *in vitro* apresentam vantagens em relação aos estudos *in vivo* tais como limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente, além do período de teste, em muitos casos, ser mais curto.

A investigação sobre os efeitos causados por BPA ou a outros DEs em linhagens de hepatócitos, assim como outras linhagens celulares, é importante já que é sabido que a exposição a essas substâncias ocorre constantemente. Desta forma, o presente trabalho buscou investigar os efeitos do BPA em diferentes concentrações de exposição, a ponto de causar danos à células, mas não levando a morte. Nossos resultados demonstraram que o BPA causa prejuízos às células diminuindo a proliferação celular e estabilidade da membrana lisossomal em hepatócitos de Zebrafish expostos as concentrações de 10µg/L e 50µg/L de BPA, como verificados pelos ensaios de MTT e de Vermelho Neutro.

Como a variedade de compostos DEs a serem avaliados tem crescido muito, há necessidade de se estudar novas metodologias e escolher entre elas as que possam responder melhor quanto à presença e efeitos destes compostos. Estudos com os métodos apresentados neste e em vários outros trabalhos, demonstraram que testes com culturas celulares podem ser utilizadas com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução de estudos *in vitro*.

Culturas celulares, como a de hepatócitos ZFL, que são derivadas de tecidos específicos, têm se mostrado como instrumentos de grande importância na medida em que auxiliam na compreensão de processos tanto celulares como moleculares, com a possibilidade de serem referenciados aos tecidos correspondentes quando *in vivo*. Estas culturas, sendo utilizadas de forma adequada, fornecem uma alternativa relativamente de baixo custo e muitas vezes com resultados mais rápidos no estudo de mecanismos que frequentemente podem ser complexos e difíceis de serem desenvolvidos *in vivo*.

## Referências citadas

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/90666300462a38a5ba4abfec1b28f937/Embalagens.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 01/08/2015.
- Aschengrau, A., Coogan, P.F., Quinn, M., Cashins, L.J. (1998). Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: an exploratory analysis. *Am J Ind Med.* 34, 6-14.
- Balinova, A.A. (1993). A solid phase extraction followed by high performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. *J Chromatogr.* 643, 203-207.
- Benachour, N., and Aris, A. (2009). Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 241, 322-328.
- Beserra, M.R., Schiavini, J.A., Rodrigues, W.C., Pereira, C.S.S.O. (2012). Bisfenol A: Sua Utilização e a Atual Polêmica em Relação aos Possíveis Danos à Saúde Humana, *Rev. Eletrônica TECCEN.* 5, 37-46.
- Bila, D.M., and Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Quím. Nova vol.30*, 651.
- Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H., Hollifield, H.C. (1997). Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids *J. Agric. Food Chem.* 45, 3541–3544.
- Bolger, R., Wiese, T.E., Ervin, K., Nestich, S., Checovich., W. (1998). Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect.* 106, 551-7.
- Brambilla, A., Rindone, B., Polesello, S., Galassi, S., Balestrini, R. (1993). The rate of triazine pesticides in river po water. *Sci Total Environ.* 132, 339-348.
- Bruslè, J., and Anadon, G.G. (1996). The Structure and function of fish liver. In: Munshi, J.S.D., and Dutta, H.M. (Ed.). *Fish morphology horizon of new research.* Lebanon: *Science Publishers Inc.* 77-93.
- Chan, K.M., Ku, L.L., Chan, P.C., Cheuk, W.K. (2006). Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. *Marine Environ Res.* 62, 83–87.
- Chen, D.S., and Chan, K.M. (2011). Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. *Aquat Toxicol.* 104, 270-277.

- Cheuk, W.K., Chana, P.C., CHANA, K.M. (2008). Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions. *Aquat. Toxicol.* 89, 103–112.
- Chitra, K.C., and Maiby, Sr. (2014). Oxidative stress of bisphenol- A and its adverse effect on the liver of fresh water fish, *Oreochromis Mossambicus*. *Int J Scient Reser.* 3, 1-7.
- Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E., Kreuzinger, N. (2004). *Chemosphere*, 56, 843.
- Costa, C.L.A., Chaves, I.S., Ventura-Lima, J., Ribas, J., Carvalho, L.M., Monserrat, J.M. (2012). In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C60) in zebrafish hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C.* 155, 206–212.
- Dimastrogiovanni, G., Cordobab, M., Navarrob I., Jaureguic, O., Portea, C. (2015) Alteration of cellular lipids and lipid metabolism markers in RTL-W1 cells exposed to model endocrine disrupters. *Aquatic Toxicol.* 165, 277–285.
- Erickson, B.E. (2008). Bisfenol A under scrutiny. *Chemical and Engineering News.* 86, 36-39.
- Erler C., and Novak, J. (2010). Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy. *J Pediatr Nurs.* 25, 400–407.
- Erler C., and Novak, J. (2010). Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy. *J Pediatr Nurs.* 25, 400–407.
- Farabollini, F., Lupo Di Prisco, C., Dessì-Fulgheri, F. (1981). Modifications of brain steroidogenesis and plasma steroids after p-chlorophenylalanine-methyl-ester treatment in male rats and rabbits. *Pharmacol Biochem Be.* 14, 911–914.
- García-Díaz, G., and Macías-Matos, C. (2008). Peligros toxicológicos de los envases de plásticos. En: Temas de Higiene de los alimentos. Caballero AE. (ed). Capítulo 11, Ciencias médicas La Habana (Cuba). 154.
- Gatti, J.B. (2009). A presença de Bisfenol A proveniente de vernizes em alimentos e sua implicação na saúde, *Informativo CETEA/ITAL.* Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens.
- Ghiselli, G., and Jardim, W.F. (2007). *Interferentes endócrinos no meio ambiente.* Campinas SP. *Química Nova.* 30, 695-706.
- Ghosh, C., Zhou, Y.L., Collodi, P. (1994). Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 167–176.

- Hassan, Z.K., Elobeid, M.A., Virk, P., Omer, S.A., ElAmin, M., Daghestani, M.H., AlOlayan, E.M., (2012) Bisphenol A Induces hepatotoxicity through Oxidative Stress in Rat Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume, 11.
- Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F., Héliers-Toussaint, C. (2012). Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 26, 709–717.
- IRIS. (1988). Bisphenol A (CASRN 80-05-7). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. Available: <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>.
- Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicol.* 226, 79-89.
- Kausch, U., Alberti, M., Haindl, S., Budczies, J., Hock, B. (2008) Biomarkers for Exposure to Estrogenic Compounds: Gene Expression Analysis in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol.* 23, 15-24.
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA.* 300, 1303-10.
- Le, H.H., Carlson, E.M., Chua, J.P., Belcher, S.M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett.* 176, 149–156.
- Leranth, C., Hajszan, T., Szigeti-Buck, K., Bober, J., Maclusky, N.J. (2008). Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14187-14191.
- Liu, J., Wang, R., Huang, B., Lin, C., Zhou, J., Pan, X. (2012). Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents. *Environ Pollut.* 162, 325-331.
- MacLusky, N.J., Hajszan, T., Leranth, C. (2005). The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect*, 113, 675-679.
- Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol* 254–255, 179–186.

- Matthews, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R., (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157.
- Miranda, C.L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D.W., Buhler, D.R. (1993). Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell line from zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Arch Biochem.* 305, 320–327.
- Moon, M.K., Kim, M.J., Jung, I.K., Koo, Y.D., Ann, H.Y., Lee, K.J., Kim, S. H., Yoon, Y.C., Cho, B., Park, K.S., Jang, H.C., Park, Y.J. (2012) Bisphenol A Impairs Mitochondrial Function in the Liver at Doses below the No Observed Adverse Effect Level. 2012. *J Korean Med Sci.* 27, 644-652.
- Prins, G. (2008). "Developmental exposure to bisphenol a increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated". *Fertil Steril*, 89, 41-41.
- Pritchett, J.J., Kuester, R.K., Sipes, I.G. (2002). Metabolism Of Bisphenol A In Primary Cultured Hepatocytes From Mice, Rats, and Humans. *Drug Metab Dispos.* 30, 1180–1185.
- Sakurai, K., Kawazuma, M., Adachi, T. (2004). "Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes," *Br J Pharmacol*, 141, 209–214.
- Sawai, C., Anderson, K., Walser-Kuntz, D. (2003). Effect of bisphenol A on murine immune function: modification of interferon- $\gamma$ , IgG2a, and disease symptoms in NZB x NZW F1 mice. *Environ Health Perspect.* 111, 1883-1887.
- Seok, S.H., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Yr, N.A., Noh, K.J., Park, S.H., Lee, H.K., Lee, B.H., Ryu, D.Y., Park, J.H. (2007). Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicol. in Vitro* 21, 870–877.
- Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Summer, S.C.J., Fennell, T.R. (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 225–234.
- Sodré, F.F., Montagner, C.C., Locatelli, M.A.F., Jardim, W.F. (2007). Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas. *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2, 187-96.
- Sonneschein, C., and Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen mimics and antagonists, *J Steroid Biochem Mol Bio.* 65, 143-50.

- Steinmetz, R., Mitchner, N.A., Grant, A., Allen, D.L., Bigsby, R.M., Benjonathan, N. (1998). The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinol.* 139, 2741- 2747.
- Stocker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Ramos, J.G., Sirosky, P., Larriera, A., Luque, E.H., Toro, M.M.D. (2003). Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol*, 133, 287-296.
- Tsai, W.T. (2006). Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a review. *J. Environ. Sci. Health C.* 24, 225-255.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev.* 30, 75-95.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Wadia, P.R., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M. (2007). "Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol- A alters development of the fetal mouse mammary gland," *Endocrinology*, 148, 116–127.
- Vogel, S.A. (2009). The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A "Safety". *Am J Public Health.* 99, 559-566.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanady, G.A., Filser, J.G., Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1281–1287.
- Völkel, W., Bittner, N., Dekant, W. (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* 33, 1748– 1757.
- Vom Saal, F.S., and Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Persp*, 113, 8.
- Von Goetz, N., Wormwuth, M., Scheringer, M., Hungerbühler, K., (2010). Bisphenol A: How the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal.* 30, 473-487.
- Wan, G., Cheuk, W.K., Chan, K.M. (2009). Differential regulation of zebrafish metallothionein- II (zMT-II) gene transcription in ZFL and SJD cell lines by metal ions. *Aquat. Toxicol.* 91, 33–43.

- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* 24, 178-98.
- Yoshino, S., Yamaki, K., Li X., Sai, T., Yanagisawa, R., Takano, H., Hayashih, T.S., Mori, Y. (2004). Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunol.* 112, 489–495.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C., Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol.* 45, 1–18.
- Zoeller, R. (2007). "Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences". *Thyroid.* 9, 811–817.