UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LARA FERREIRA AZEVEDO

**Uso de abordagens ômicas (proteômica e metabolômica) para
elucidação de mecanismos de toxicidade dos bisfenóis A e S em
modelos *in vivo* e *in vitro***

Ribeirão Preto, 2020

LARA FERREIRA AZEVEDO

**Uso de abordagens ômicas (proteômica e metabolômica) para
elucidação de mecanismos de toxicidade dos bisfenóis A e S em
modelos *in vivo* e *in vitro***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa
Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Maria
Fernanda Hornos Carneiro

Ribeirão Preto, 2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira Azevedo, Lara

Uso de abordagens ômicas (proteômica e metabolômica) para elucidação de mecanismos de toxicidade dos bisfenóis A e S em modelos *in vivo* e *in vitro*. Ribeirão Preto, 2020.

162 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. Contaminantes emergentes. 2. Bisfenol A. 3. Bisfenol S. 4. Proteômica. 5. Metabolômica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Lara Ferreira Azevedo

Título do trabalho: Uso de abordagens ômicas (proteômica e metabolômica) para elucidação de mecanismos de toxicidade dos bisfenóis A e S em modelos *in vivo* e *in vitro*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese a todas as pessoas que buscam incessantemente por conhecimento, o maior bem que se pode deter e que nos proporciona todas as outras coisas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

a Deus por me conceder a sabedoria necessária para viver em plenitude e por me agraciar com uma jornada cheia de aventuras e desafios.

a minha mãe e melhor amiga, Brígida, e ao meu querido pai, Luiz Antônio, pelo amor, carinho, proteção e cuidado. Obrigada por me darem forças para continuar. Com vocês tudo foi possível e muito mais feliz!

ao meu amor e companheiro, André, por me apoiar, suportar e amar. Obrigada pela amizade, pelos conselhos diários, pela ajuda com os gráficos, tabelas e com a formatação deste trabalho. Obrigada por me acalmar nos momentos difíceis e por compartilhar dos bons momentos.

aos meus avós, tios, tias, primos e primas, que muito amo, pela reciprocidade no amor, pela amizade, carinho, acolhimento e por me admirarem e amarem tanto.

em especial aos meus tios Gabriel e Baby, com os quais pude compartilhar das dificuldades e desafios desta carreira, por serem admiráveis farmacêuticos e estudiosos, exemplos de esforço e dedicação. Obrigada pelos conselhos e por me ajudarem sempre.

ao Professor Dr. Fernando Barbosa Júnior, por me receber em seu laboratório, pelos ensinamentos, conselhos, pela paciência e por exercer um papel fundamental no meu crescimento acadêmico e profissional. Obrigada pela oportunidade e confiança no trabalho desenvolvido.

a professora e amiga, Maria Fernanda Hornos Carneiro, pelo carinho, amizade, cumplicidade e por todos os ensinamentos. Obrigada por me acompanhar desde o início dessa trajetória, por compartilhar seus conhecimentos e por me ajudar a desenvolver um trabalho de excelência.

A professora e amiga, Roseli Soncini, pela amizade e cumplicidade e por me apresentar essa incrível carreira.

A todos os colegas de laboratório, em especial ao Carlos Dechandt, Cecília Rocha, Bruno Rocha, Juliana Cassoli, Marília Oliveira, Juliana Oliveira, Andréia Ávila, Ana Carolina Paulelli, Airtton Martins, Cibele Cesila, Paula Devóz, João Carlos Souza, Mariana Zuccherato, Vanessa de Souza, pela amizade, companheirismo, parceria, por me acolherem e ajudarem sempre.

A todos os integrantes do Instituto de Biologia de Sistemas Moleculares do Instituto Federal de Tecnologia de Zurique, na Suíça, em especial ao meu supervisor Dr. Nicola Zamboni, e aos colegas, Mauro Masiero, Daniela Ledezma, Sarah Cherkaoui, Michele Reid, Laurentz Schunknecht e Sammy Pontrelli, por me receberem tão bem e por me ensinarem tanto.

as queridas amigas e também cientistas Carla Brigagão, Marília Oliveira, Juliana Oliveira, Andréia Ávila e Ana Paulelli, pela amizade, por compartilharem das alegrias e dificuldades desta carreira e da vida. Obrigada por tornarem a trajetória leve e agradável e por colorirem meus dias.

aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Rosemary e Rosana, pela presteza e eficiência.

e, finalmente, ao CNPq, à CAPES e a FAPESP (processos n. 2016/10456-0 e 2018/19554-0) pelo financiamento concedido e pela confiança em meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

***'O cientista não estuda a natureza porque ela é útil;
ele a estuda porque se deleita nela,
e se deleita nela porque ela é bela.
Se a natureza não fosse bela,
não valeria a pena ser conhecida,
e se não valesse a pena ser conhecida,
a vida não valeria a pena ser vivida.'***

Henry Poincaré

RESUMO

AZEVEDO, L. F. **Uso de abordagens ômicas (proteômica e metabolômica) para elucidação de mecanismos de toxicidade dos bisfenóis A e S em modelos *in vivo* e *in vitro***. 2020. 162p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Bisfenol A (BFA) e bisfenol S (BFS) são desreguladores endócrinos que podem levar ao desenvolvimento de diversos distúrbios metabólicos, tais como obesidade, diabetes e dislipidemias. No entanto os mecanismos associados aos efeitos tóxicos ainda não estão completamente elucidados. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo elucidar mecanismos de toxicidade do BFA e BFS, em modelos *in vivo* e *in vitro*, através de avaliações de alterações bioquímico-metabólicas e fisiopatológicas a partir da análise das vias metabólicas afetadas e por meio de ferramentas ômicas (proteômica e metabolômica). Para tanto, o trabalho foi dividido em 2 estudos principais: (I) Ratos machos *Wistar* foram cronicamente expostos (20 semanas) a doses aproximadas de 50 ou 500 µg/kg/dia de BFA e/ou BFS através da água de beber (aprovação ética n. 15.1.979.60.7). O ganho de massa corporal foi determinado semanalmente e testes de tolerância à insulina (TTI) e tolerância à glicose (TTG) foram realizados, respectivamente, nas 18ª e 19ª semanas de exposição. Após a eutanásia, amostras de sangue foram coletadas para a determinação de parâmetros bioquímicos em todos os grupos experimentais e amostras de fígado e pâncreas foram obtidas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS para quantificação de alterações na expressão de proteínas através de análises proteômicas não-direcionadas por nanoUPLC-nanoESI-HDMS^E (n=3) e na expressão gênica por experimentos de RT-qPCR (n=6). (II) células HepG2 e INS-1E foram expostas por 72 h a BFA ou BFS (100; 10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 µM) para determinação da proliferação e viabilidade celular e extratos polares intracelulares de ambas as linhagens foram obtidos após 24, 48 e 72 h de exposição a BFA ou BFS (10 - 0,001 µM) para a caracterização metabólica basal através de análises metabolômicas não-direcionadas por FIA-qTOF. Ao final do estudo I, a exposição a menor dose dos contaminantes levou ao desenvolvimento de intolerância à glicose e os animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA+BFS e 500 µg/kg/dia de BFS apresentaram aumento da massa corporal. A exposição a 50 µg/kg/dia de BFA causou hiperglicemia, 50 µg/kg/dia de BFA e BFA+BFS causaram aumento de colesterol total e HDL-colesterol e 500 µg/kg/dia de BFA também levou ao aumento deste último. A exposição ao BFS (500 µg/kg/dia) aumentou o LDL-colesterol. Proteínas hepáticas diferencialmente expressas nos grupos expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS, em comparação ao grupo controle, estão relacionadas com a síntese de triglicérides (*glucokinase activity-related sequence 1*, *fold-change* 1,8 para BFA e 2,4 para BFS) e com biossíntese do mevalonato (*hydroxymethylglutaryl-CoA synthase cytoplasmic*, *fold-change* 2 para BFS). Proteínas da cadeia transportadora de elétrons bem como enzimas antioxidantes também apresentaram expressão desregulada após a exposição a ambos contaminantes. Análises proteômicas do tecido pancreático mostraram que ambos os compostos reduziram drasticamente a expressão de diversas proteínas ribossomais, bem como de proteínas essenciais para a homeostase energética, tais como *insulin-1* (*fold-change* 0,01 para BFA), *insulin-2* (*fold-change* 0,01 para BFS) e *glucagon* (*fold-change* 0,01 para BFS) em comparação ao controle. Os ensaios de RT-qPCR confirmaram os resultados obtidos nas análises proteômicas para as

proteínas analisadas. Os resultados do estudo II demonstraram efeitos anti-proliferativos e citotóxicos em células HepG2 após a exposição a altas e baixas concentrações dos bisfenóis (curvas de dose-resposta não-lineares), enquanto os mesmos regimes de exposição produziram efeitos mais brandos na proliferação e viabilidade de INS-1E, exceto para a mais alta concentração estudada de ambos compostos. As análises do metaboloma de HepG2 e de INS-1E revelaram tanto alterações moleculares tempo e dose-dependentes como vias semelhantes de toxicidade para os dois compostos. Este estudo mostra a importância da condução de estudos ômicos para a elucidação de mecanismos de toxicidade e a necessidade de se reavaliar o uso do BPS em substituição ao análogo BPA, uma vez que o BPS também produz alterações metabólicas importantes *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes; bisfenol A; bisfenol S; proteômica; metabolômica; estudos *in vivo*; *in vitro*.

ABSTRACT

AZEVEDO, L. F. **Use of omic approaches (proteomics and metabolomics) to elucidate bisphenols A and S mechanisms of toxicity in *in vivo* and *in vitro* models**. 2020. 162p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) are endocrine disruptors that can lead to the development of several metabolic disorders such as obesity, diabetes and dyslipidemias. Nonetheless the mechanisms associated to the toxic effects are not yet fully understood. In this context, this work aimed at elucidating BPA and BPS mechanisms of toxicity in *in vivo* and *in vitro* models, through evaluation of biochemical-metabolic and pathophysiological alterations by the analysis of affected metabolic pathways and by means of omic tools (proteomics and metabolomics). To this end, this work was divided into 2 main studies: (I) Male *Wistar* rats were chronically exposed (20 weeks) to approximately 50 or 500 µg/kg/day of BPA and/or BPS through drinking water (ethical approval n. 15.1.979.60.7). Body mass gain was weekly determined and Insulin Tolerance Test (ITT) and Glucose Tolerance Test (GTT) were performed, respectively, at the 18th and 19th weeks of exposure. Following euthanasia, blood samples were collected to determine biochemical parameters in all experimental groups and liver and pancreas samples were obtained from animals exposed to 50 µg/kg/day of BPA or BPS to quantify changes in protein expression through non-targeted proteomic analyses by nanoUPLC-nanoESI-HDMS^E (n=3) and gene expression by RT-qPCR (n=6). (II) HepG2 and INS-1E cells were exposed for 72 h to BPA or BPS (100; 10; 1; 0.1; 0.01 and 0.001 µM) to assess cellular proliferation and viability; and intracellular polar extracts from both strains were obtained following 24, 48 and 72 h of exposure to BPA or BPS (10 - 0.001 µM) for basal metabolic characterization through non-targeted metabolomic analyses by FIA-qTOF. Data from study I indicates that exposure to the lowest dose of the contaminants led to the development of glucose intolerance and animals exposed to 50 µg/kg/day of BPA+BPS and 500 µg/kg/day of BPS showed an increase in body mass. Exposure to 50 µg/kg/day of BPA caused hyperglycemia, 50 µg/kg/day of BPA and BPA+BPS caused an increase in total cholesterol and HDL-cholesterol and 500 µg/kg/day of BPA also increased this last parameter. Exposure to BPS (500 µg/kg/day) increased LDL-cholesterol. Hepatic proteins differentially expressed in groups exposed to 50 µg/kg/day of BPA or BPS, compared to the control group, are related to triglyceride synthesis (glucokinase activity-related sequence 1, 1.8-fold change for BPA and 2.4-fold change for BPS) and with mevalonate biosynthesis (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase cytoplasmic, 2-fold change for BPS). Proteins from electron transport chain as well as antioxidant enzymes also presented dysregulated expression following exposure to both contaminants. Proteomic analyses from pancreatic tissues evidenced that both compounds drastically reduced expression of several ribosomal proteins as well as of essential proteins for energy homeostasis such as insulin-1 (0.01-fold change for BPA), insulin-2 (0.01-fold change for BPS) and glucagon (0.01-fold change for BPS) compared to the control group. RT-qPCR assays confirmed the results obtained in proteomic analyses for the proteins analyzed. Results from study II showed antiproliferative and cytotoxic effects in HepG2 cells after exposure to the highest and lowest-concentrations of the contaminants (nonlinear dose-response curve), while the same exposure regimens produced milder effects on INS-1E proliferation and viability, except for the highest concentration studied of both contaminants. HepG2 and INS-1E

metabolome analyses revealed time- and dose-dependent molecular changes and similar toxicity pathways for both compounds. This study shows the importance of conducting omic studies for the unveiling of mechanisms of toxicity and the need to reevaluate the use of BPS as a substitute for BPA, since the first produced significant metabolic changes *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: Emerging contaminants; bisphenol A; bisphenol S; proteomics; metabolomics; *in vivo*; *in vitro* studies.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Média $\pm$ EPM do ganho de massa dos animais do grupo controle e grupos expostos a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS ao longo do estudo. ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni*. * $p \leq 0,05$ versus controle; ** $p \leq 0,01$ versus controle, # $p \leq 0,05$ versus BFA 50, # $p \leq 0,01$ versus BFA 50.32
- Figura 2. Média $\pm$ EPM do ganho de massa dos animais do grupo controle e grupos expostos a 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS ao longo do estudo. ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni*. * $p \leq 0,05$ versus controle, ** $p \leq 0,01$ versus controle, *** $p \leq 0,001$ versus controle, # $p \leq 0,05$ versus BFA 500, ### $p \leq 0,01$ versus BFA 500, ° $p \leq 0,05$ versus BFA + BFS 500, °° $p \leq 0,01$ versus BFA + BFS 500, °°° $p \leq 0,001$ versus BFA + BFS 500.33
- Figura 3. Média $\pm$ EPM da concentração de glicose no sangue obtida após realização do teste de tolerância à glicose (TTG). Os testes foram realizados após 19 semanas do protocolo experimental. **(A)** Curvas com as concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. **(B)** Curvas com as concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. ANOVA 2 vias, $p \leq 0,05$36
- Figura 4. Média $\pm$ EPM da concentração de glicose no sangue obtida após realização do teste de tolerância à insulina (TTI). Os testes foram realizados após 18 semanas do protocolo experimental. **(A)** Curvas de decaimento das concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. **(B)** Curvas de decaimento das concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. ANOVA 2 vias, $p \leq 0,05$37
- Figura 5. Média $\pm$ EPM do ganho de massa dos animais do grupo controle e grupos expostos a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS (Estudo II). ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni* * $p \leq 0,05$ versus controle, ** $p \leq 0,01$ versus controle, *** $p \leq 0,001$ versus controle.40
- Figura 6. Média $\pm$ EPM das concentrações de glicose sanguíneas obtidas após realização do teste de tolerância à glicose (TTG). Curvas com as concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS (Estudo II). ANOVA 2 vias seguida do teste de *Bonferroni*. * $p \leq 0,05$ versus controle, ** $p \leq 0,01$ versus controle, *** $p \leq 0,001$ versus controle.41
- Figura 7. Média $\pm$ EPM das concentrações de glicose sanguíneas obtida após realização do teste de tolerância à insulina (TTI). Curvas de decaimento das concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS (Estudo II). ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni*, $p \leq 0,05$43
- Figura 8. Concentrações de glicose no sangue do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Bonferroni*. ** $p \leq 0,01$ versus controle; # $p \leq 0,05$ versus BFA+BFS 50; #### $p \leq 0,001$ versus BFA 500, BFS 500 e BFA+BFS 500.45

- Figura 9. Concentrações de colesterol total no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Dunnett*. * $p \leq 0,05$ versus controle.47
- Figura 10. Concentrações de HDL colesterol no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Dunnett*. * $p \leq 0,05$ versus controle; ** $p \leq 0,01$ versus controle.47
- Figura 11. Concentrações de LDL colesterol no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Dunnett*. * $p \leq 0,05$ versus controle.48
- Figura 12. Concentrações de triglicérides no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA uma via, $p \leq 0,05$49
- Figura 13. Atividade da enzima hepática aspartato aminotransferase no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, $p \leq 0,05$51
- Figura 14. Atividade da enzima hepática alanina aminotransferase no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, $p \leq 0,05$51
- Figura 15. Diagrama de Venn representando todas as proteínas identificadas e quantificadas nos extratos proteicos de tecido hepático obtidos dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA, 50 µg/kg/dia de BFS e/ou do grupo controle.57
- Figura 16. Classificação das proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle de acordo com o banco de dados do *Gene Ontology* (GO). A) Processos biológicos B) Função molecular.59
- Figura 17. Classificação das proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle de acordo com o banco de dados do *Gene Ontology* (GO) A) Processos biológicos B) Função molecular.60
- Figura 18. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no fígado de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle. PPI enrichment p-value = 0,0137.61
- Figura 19. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no fígado de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle. As vias mais enriquecidas nessas redes foram “Metabolismo de drogas - citocromo P450” (FDR = $6,03 \times 10^{-6}$) e “Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450” (FDR = $1,75 \times 10^{-4}$). PPI enrichment p-value = 0,0142.62
- Figura 20. Expressão relativa de mRNA de Glycerol kinase-like 1 (Gykl1), Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_mitochondrial (Sdhb), Ubiquinone biosynthesis protein COQ9_mitochondrial (Coq9) e Aldo-keto reductase family 1 member C21 (Akr1c2) no tecido hepático de ratos Wistar expostos a 50 µg/kg/dia de BFA, 50 µg/kg/dia de BFS e grupo controle. Os valores estão expressos como média

± EPM. ANOVA 1 via seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * $p \leq 0.05$ versus controle, ** $p \leq 0.01$ versus controle, *** $p \leq 0.001$ versus controle.....	63
Figura 21. Diagrama de Venn representando todas as proteínas identificadas e quantificadas no extrato proteico do tecido pancreático dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA e/ou do grupo controle.....	68
Figura 22. Diagrama de Venn representando todas as proteínas identificadas e quantificadas no extrato proteico do tecido pancreático dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFS e/ou do grupo controle.....	69
Figura 23. Classificação quanto às funções moleculares das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).....	70
Figura 24. Classificação quanto aos processos biológicos das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).....	71
Figura 25. Classificação quanto às funções moleculares das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).....	72
Figura 26. Classificação quanto aos processos biológicos das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).....	73
Figura 27. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no pâncreas de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle. A via mais enriquecida foi “ <i>Ribosome</i> ”. PPI enrichment p -value = 0,000408, FDR para via “ <i>Ribosome</i> ” = $7,61 \cdot 10^{-8}$	74
Figura 28. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no pâncreas de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle. STRING identificou 4 vias enriquecidas nesta análise, dentre as quais se destacam as vias “ <i>Ribosome</i> ” (FDR = $7,15e-12$) e “ <i>PPAR signaling pathway</i> ” (0,0278). PPI enrichment p -value = $7,61 \cdot 10^{-12}$	75
Figura 29. Quantificação das expressões relativas de mRNA dos genes <i>Hmgcs2</i> , <i>Ins1</i> e <i>Ins2</i> no pâncreas de ratos <i>Wistar</i> expostos a 50 µg/kg/dia de BFA, a 50 µg/kg/dia de BFS e controle, determinadas por RT-qPCR e normalizadas pela expressão do gene constitutivo <i>Hprt1</i> . Média ± EPM. * $p \leq 0,05$ vs controle; ** $p \leq 0,01$ vs controle.	77
Figura 30. Curvas de crescimento de HepG2 após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 µM de BFA; 0,1% v/v DMSO; 0,1 µM de DES e 100 µM de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.	98
Figura 31. Curvas de crescimento de HepG2 após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 µM de BFS; 0,1% v/v DMSO; 0,1 µM de DES e 100 µM de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.	99
Figura 32. Curvas dose-resposta não-monotônicas (% de confluência celular) 72 horas após a exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 µM de BFA ou BFS.	99
Figura 33. Taxas de crescimento de HepG2 obtidas nas primeiras 12 horas de exposição às diferentes concentrações [100 - 0,001 µM] de BFA; diferentes	

concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS; 0,1 μ M de DES; 0,1% v/v DMSO e 100 μ M de MTX. Teste de normalidade de Shapiro, seguido pelos testes T de Student (para dados paramétricos) ou Wilcoxon (dados não paramétricos). * $p \leq 0,05$ vs controle, ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.101

Figura 34. Viabilidade celular de HepG2 após 72 horas de exposição a (A) diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFA, 0,1% v/v DMSO, 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX; (B) diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS, 0,1% v/v DMSO, 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. * $p \leq 0,05$ vs controle, ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.103

Figura 35. Curvas de crescimento de INS-1E após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μ M de BFA; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.104

Figura 36. Curvas de crescimento de INS-1E após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μ M de BFS; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.105

Figura 37. Taxas de crescimento de INS-1E obtidas para a janela 1 de exposição à diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFA; diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS; 0,1 μ M de DES; 0,1 % v/v DMSO e 100 μ M de MTX. Teste de normalidade de Shapiro, seguido pelos testes T de Student (para dados paramétricos) ou Wilcoxon (dados não paramétricos). ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.106

Figura 38. Taxas de crescimento de INS-1E obtidas para a janela 2 de exposição à diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFA; diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS; 0,1 μ M de DES; 0,1 % v/v DMSO e 100 μ M de MTX. Teste de normalidade de Shapiro, seguido pelos testes T de Student (para dados paramétricos) ou Wilcoxon (dados não paramétricos). * $p \leq 0,01$ vs controle, ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.107

Figura 39. Viabilidade celular de INS-1E após 72 horas de exposição a (A) diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFA; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX; (B) diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. *** $p \leq 0,001$ vs controle.108

Figura 40. Variação de íons interamostra dos 25 íons mais intensos detectados em todas as amostras de extratos celulares incluídas para as análises de qTOF.110

Figura 41. Principal Component Analysis representando o primeiro e segundo componentes principais de todos os datasets obtidos antes do pré-processamento dos dados. Método de normalização: z-score.111

Figura 42. Principal Component Analysis representando o primeiro e segundo componentes principais de todos os dados normalizados pela média e log transformados. Método de normalização: z-score.111

Figura 43. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de HepG2 entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFS vs DMSO; e 0,1 μ M de DES vs DMSO após

24, 48 e 72 horas de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa $\log_2(FC)$. Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [$FC = 1,5$; $p \leq 0,01$].113

Figura 44. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de HepG2 entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFS vs DMSO; e 0,1 μM de DES vs DMSO após 48 de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa $\log_2(FC)$. Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [$FC = 1,5$; $p \leq 0,01$].114

Figura 45. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de HepG2 entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFS vs DMSO; e 0,1 μM de DES vs DMSO após 72 de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa $\log_2(FC)$. Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [$FC = 1,5$; $p \leq 0,01$].115

Figura 46. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de INS-1E entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFS vs DMSO; e 0,1 μM de DES vs DMSO após 24, 48 e 72 horas de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa $\log_2(FC)$. Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [$FC = 1,5$; $p \leq 0,01$].117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingestão diária aceitável (IDA) de BFA.....	3
Tabela 2 – Proteínas selecionadas para a validação por RT-qPCR.	30
Tabela 3 – Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para a quantificação de mRNA dos genes selecionados.	30
Tabela 4 – Concentrações protéicas dos extratos obtidos a partir de amostras de tecido hepático do grupo controle e dos grupos expostos à 50 µg/kg/dia de BFA e 50 µg/kg/dia de BFS. Valores expressos como média ± DP, em mg/mL de cada amostra, obtidos pela leitura em triplicada das mesmas.....	54
Tabela 5 – Concentrações protéicas dos extratos obtidos a partir de amostras de tecido pancreático do grupo controle e dos grupos expostos à 50 µg/kg/dia de BFA e 50 µg/kg/dia de BFS. Valores expressos como média ± DP, em mg/mL de cada amostra, obtidos pela leitura em triplicada das mesmas.....	55
Tabela 6 – Vias enriquecidas na análise da rede de interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle, obtida na análise do STRING, de acordo com a base de dados fornecida pelo banco de dados da <i>KEGG Pathways</i>	62
Tabela 7 – Vias enriquecidas na análise da rede de interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle, obtida na análise do STRING, de acordo com a base de dados fornecida pelo banco de dados da <i>KEGG Pathways</i>	74
Tabela 8 – Vias enriquecidas na análise da rede de interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle, obtida na análise do STRING, de acordo com a base de dados fornecida pelo banco de dados da <i>KEGG Pathways</i>	76
Tabela 9 – Parâmetros de operação do instrumento para as análises de espectrometria de massas por injeção em fluxo.	93
Tabela 10 – Análise de reprodutibilidade realizada antes e após a normalização dos dados representando a FDR dos controles de “batch”. Variância Desigual do teste t (Welch).....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16:0	ácido palmítico
18:2n-6	ácido linoleico
¹H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
3Rs	Refinar, Reduzir e Substituir
Aas	aminoácidos
AGs	ácidos graxos
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BFA	bisfenol A
BFS	bisfenol S
BSA	albumina sérica bovina
C1	concentração 1
C2	concentração 2
C22:6	ácido docosahexaenóico
Ca²⁺	Íon de Cálcio
cDNA	DNA complementar
CER	ceramidas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-propano sulfonato
CO₂	gás carbônico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CT	Colesterol total

DES	dietilestilbestrol
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DHT	5 α -di-hidrotestosterona
DMSO	dimetilsulfóxido
DMT2	diabetes <i>mellitus</i> tipo II
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRNM	dose-resposta não-monotônicas
DTT	ditiotreitol
E2	estradiol
EDC	Endocrine Disrupting Chemical
EFSA	European Food Safety Authority
EPM	erro padrão da média
EREs	Elementos de Resposta ao Estrogênio
ERK/MAPK	Extracellular regulated kinase/Mitogen-activated protein kinase
EROs	espécies reativas de oxigênio
ETC	cadeia de transporte de elétrons
FC	fold-change
FCFRP/USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo
FDR	taxa de falso descoberta
FIA-qTOF	Análise de espectrometria de massas por injeção em fluxo
G3P	glicerol-3-fosfato
GCG	glucagon
Glu-Fib	[Glu1]-Fibrinopeptide B human
GLUT2	proteínas transportadoras de glicose
GLUT4	proteínas transportadoras de glicose
GMP	guanosina-5'-monofosfato
GO	Gene Ontology

GPD1	glicerol-3-fosfato desidrogenase 1
GPR30	receptor de estrogênio acoplado à proteína G
GR	Taxa de crescimento
GST	Glutathionas-S-Transferases
HDL-C	HDL colesterol
HDMS^E	High Definition Mass Spectrometry
HMDB40	Human Metabolome Database 40
HMG-CoA	hidroximetil-glutaril-CoA
i.p.	injeção intraperitoneal
IAA	iodoacetamida
IDA	ingestão diária aceitável
Ile	isoleucina
IMS	Ion-mobility spectrometry
iPLA2β	fosfolipase A2 independente de cálcio
IRS	substrato do receptor de insulina
J1	janela 1 de exposição
J2	janela 2 de exposição
KEGG	Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas
LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDL-C	LDL colesterol
Leu	leucina
m/z	massa/carga
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de Massas em Tandem
MTX	metotrexato
nanoESI	nanoeletrospray ionization

nanoLC-MS/MS	nano cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
ncmER	receptor de membrana não-clássico
NHANES	National Health and Nutritional Examination Survey
NH₄HCO₃	bicarbonato de amônio
NH₄OH	hidróxido de amônio
NOAEL	No Adverse Effect Level
NSMase	esfingomielinase neutra
PANTHER	Protein Analysis Through Evolutionary Relationships
PCA	Principal Component Analysis
Phe	fenilalanina
PI3K/ AKT	fosfatidilinositol-3-quinase/AKT
PKG	proteína quinase dependente de cGMP
PLA₂	fosfolipase A2
PND	dias pós-natais
PPAR	receptor ativador de proliferação de peroxissomos
PPAR_γ	receptor ativador de proliferação de peroxissomos gamma
PPI	interação proteína-proteína
PUFAs	ácidos graxos poliinsaturados
Q	Quadrupolo
qTOF	Quadrupolo-tempo de voo
REs	receptores de estrogênio
RE_α	RE alpha
RE_β	RE beta
RT-qPCR	Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction
SDH	succinato desidrogenase
SOD	superóxido dismutase
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins

TC	taxas de crescimento
TCA	ciclo do ácido tricarboxílico
TFA	ácido trifluoroacético
TGs	Triglicérides
Thr	treonina
TOF	Time-of-Flight
TTG	Teste de Tolerância à Glicose
TTI	Teste de Tolerância à Insulina
UHPLC-MS	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas
UMP	monofosfato de uridina
UPLC	cromatografia líquida de ultra eficiência
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USGS	United States Geological Survey
Val	valina

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contaminantes emergentes.....	1
1.2. Bisfenol A.....	2
1.3. Bisfenol S.....	4
1.4. A exposição aos bisfenóis e o desenvolvimento da síndrome metabólica - estudos epidemiológicos, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	6
1.5. Bisfenóis e possíveis alvos moleculares em células e tecidos que regulam o metabolismo energético.	8
1.6. Estudos Ômicos	10
1.7. Proteômica	11
1.8. Metabolômica	13
2. HIPÓTESE	16
Capítulo I. Avaliação da expressão proteica e parâmetros bioquímicos relacionados ao diabetes mellitus tipo II e dislipidemias em ratos expostos aos bisfenóis A e S.....	17
1. OBJETIVO	18
1.1. Objetivos específicos	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Equipamentos, reagentes e soluções	19
2.2. Delineamento experimental	20
2.2.1. Animais	20
2.3. Escolha das doses e tratamento dos animais	21
2.4. Teste de tolerância à insulina	22
2.5. Teste de tolerância à glicose	23
2.6. Obtenção de amostras de sangue e órgãos dos animais	23
2.7. Ensaios bioquímicos	23
2.8. Análise Proteômica	24
2.8.1. Obtenção das amostras de proteínas dos tecidos.....	24
2.8.2. Troca do solvente das amostras	24
2.8.3. Quantificação de proteínas totais dos tecidos	25

2.8.4.	Preparo das amostras	25
2.8.5.	Análise de peptídeos por nano cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (nanoLC-MS/MS)	26
2.8.6.	Processamento e busca em banco de dados	26
2.8.7.	Classificação das proteínas de acordo com o banco de dados do Gene Ontology	27
2.8.8.	Análise das redes de interações entre as proteínas diferencialmente expressas no fígado e pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou 50 µg/kg/dia de BFS pelo STRING	28
2.9.	Validação das Análises Proteômicas: Quantificação da expressão de mRNA das proteínas diferencialmente expressas por RT-qPCR	28
2.9.1.	Extração de RNA	28
2.9.2.	Síntese de cDNA	28
2.9.3.	RT-qPCR	29
2.10.	Análise Estatística	30
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1.	Avaliação da variação da massa corporal dos animais	32
3.2.	Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina	35
3.3.	Comparação dos resultados de ganho de massa corporal e TTG/TTI entre os Estudos I e II e a literatura	39
3.4.	Análise dos parâmetros bioquímicos	45
3.5.	Análise Proteômica	51
3.5.1.	Seleção de amostras de fígado e pâncreas para a análise proteômica	51
3.5.2.	Extração de proteínas totais do fígado e pâncreas	52
3.5.3.	Troca do solvente das amostras para digestão	53
3.5.4.	Quantificação de proteínas totais dos tecidos	54
3.5.5.	Identificação e quantificação das proteínas do fígado através do software Progenesis Q1	55
3.5.6.	Características das proteínas identificadas e quantificadas no fígado dos grupos estudados quanto à função molecular e processos biológicos nos quais estão envolvidas.	57
3.5.7.	Análise das redes de interações entre as proteínas diferencialmente expressas no fígado dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou 50 µg/kg/dia de BFS pelo STRING.	60
3.5.8.	Quantificação da expressão de mRNA das proteínas diferencialmente expressas no fígado dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS por RT-qPCR.	63
3.5.9.	Identificação e quantificação das proteínas do pâncreas através do software Progenesis Q1.....	68
3.5.10.	Características das proteínas identificadas e quantificadas no tecido pancreático dos grupos estudados quanto à função molecular e processos biológicos nos quais estão envolvidas.	69
3.5.11.	Análise das redes de interações entre as proteínas diferencialmente expressas no pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou 50 µg/kg/dia de BFS pelo STRING.	73
3.5.12.	Quantificação da expressão de mRNA das proteínas diferencialmente expressas no pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS por RT-qPCR.....	76
4.	CONCLUSÕES	83
Capítulo II. Avaliação dos efeitos da exposição ao BFA ou BFS no crescimento, viabilidade e no metaboloma intracelular de células HepG2 e INS-1E.		84
1.	INTRODUÇÃO	85
2.	OBJETIVO	88
2.1.	Objetivos específicos	88
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	89
3.1.	Compostos químicos e reagentes	89

3.2.	Manutenção das linhagens celulares	89
3.3.	Contaminantes ambientais - escolha das doses biologicamente relevantes	90
3.4.	Regime de exposição aos contaminantes	90
3.4.1.	HepG2	90
3.4.2.	INS-1E	90
3.5.	Curvas de Crescimento e Taxas de Crescimento	91
3.6.	Estudo de viabilidade celular	91
3.7.	Análise Metabolômica	92
3.7.1.	Preparação da amostra para análise de espectrometria de massas por injeção em fluxo (Flow Injection Analysis coupled to mass spectrometry – FIA-qTOF).....	92
3.7.2.	FIA-qTOF e método de aquisição de amostras	92
3.7.3.	Processamento e análise de dados de metabolômica	93
3.8.	Análise Estatística	95
4.	RESULTADOS	97
4.1.	Curvas e taxas de crescimento de HepG2 após a exposição a diferentes concentrações de BFA e BFS	97
4.2.	Viabilidade celular de HepG2	102
4.3.	Curvas de crescimento e taxas de crescimento de INS-1E após a exposição a diferentes concentrações de BFA ou BFS.....	104
4.4.	Viabilidade celular de INS-1E	107
4.5.	Análise dos dados de metabolômica	108
4.5.1.	Análise dos dados de metabolômica de HepG2	112
4.5.2.	Análise dos dados de metabolômica de INS-1E.....	116
5.	DISCUSSÃO.....	118
6.	CONCLUSÕES.....	126
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contaminantes emergentes

Nos últimos anos, com a intensa atividade humana e rápido crescimento e desenvolvimento industrial houve um aumento na produção de diversas mercadorias e bens de consumo, o que expôs o homem e o ambiente a uma nova categoria de contaminantes, os chamados contaminantes emergentes, também conhecidos como contaminantes de preocupação emergente (YANG, 2014).

Os contaminantes emergentes são definidos pela “*United States Geological Survey*” (USGS) como qualquer substância química sintética ou natural, ou ainda microrganismos, que não são comumente monitorados no ambiente, mas que possuem a capacidade de contaminar o ambiente e causar riscos à saúde humana e ao ecossistema (USGS, 2014). Eles podem ser tanto compostos químicos novos como também compostos que somente agora estão sendo detectados e quantificados em diferentes matrizes, devido ao desenvolvimento de métodos de detecção mais sensíveis (RICHARDSON e TERNES, 2011).

Os contaminantes de preocupação emergente são substâncias potencialmente tóxicas e de baixa degradabilidade, que alteram o metabolismo dos seres vivos e ainda não estão sujeitas a normas regulatórias de agências pertinentes, responsáveis pela proteção da saúde humana e do ambiente (SAUVÉ e DESROSIERS, 2014). A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) inclui dentre estes contaminantes: nanopartículas, produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, compostos com atividade estrogênica, retardantes de chama, detergentes e alguns compostos químicos de origem industrial que causam significativo impacto à saúde humana e ao ambiente aquático (USEPA, 2014).

Os contaminantes emergentes são lançados no ambiente principalmente através de águas residuais, estando e a maior quantidade nas águas superficiais, que são usadas para suprimento de água pública. No entanto, existem outras fontes potenciais de exposição à essas substâncias (LAPWORTH et al., 2012). Dessa forma, torna-se necessário ampliar o conhecimento sobre a toxicidade, evidenciar as fontes de exposição e o comportamento no ambiente para prevenir os riscos associados à exposição. Também é necessário desenvolver programas de biomonitoramento humano e estabelecer valores de referência em populações.

Recentemente, grupos de pesquisa e agências regulatórias em todo o mundo vêm demonstrando interesse especial no estudo do grupo de contaminantes emergentes que possui potencial atividade estrogênica, denominado disruptores endócrinos ou desreguladores endócrinos, os quais podem afetar o desenvolvimento e a reprodução em humanos e animais (ROCHERSTER, 2013; ROCHERSTER e BOLDEN, 2015). De acordo com a USEPA, os desreguladores endócrinos são substâncias que podem atuar de diversas maneiras no sistema endócrino dos seres vivos, como mimetizando hormônios naturais, bloqueando o efeito de determinados hormônios sobre os seus respectivos receptores ou ainda estimulando ou inibindo o sistema endócrino, levando à superprodução ou subprodução de determinados hormônios (USEPA, 2011).

Dentre as substâncias que podem ser classificadas como desreguladores endócrinos, existem as naturais, tais como estrogênios naturais e fitoestrogênios ou substâncias sintéticas, como praguicidas, alquilfenóis, ftalatos, parabenos e bisfenóis (BILA e DEZOTTI, 2007). Atualmente, atenção especial vem sendo dada ao contaminante emergente e desregulador endócrino bisfenol A (BFA), o qual possui comprovada atividade estrogênica e que, mesmo em exposições a doses consideradas baixas, pode causar efeitos adversos importantes, culminando no desenvolvimento de doenças e causando danos à saúde humana (DING et al., 2014).

1.2. Bisfenol A

O 2,2-bis(4,4'-dihidroxifenil)propano ou BFA é um composto químico com uma produção mundial superior a 3 milhões de toneladas ao ano (VANDENBERG et al., 2009). A maior parte de sua produção se destina a aplicação na produção de plásticos de polycarbonatos e resinas epóxi e na confecção de uma variedade de produtos de consumo, como latas de bebidas, recipientes para alimentos, mamadeiras, equipamentos médicos e dentários, lentes de óculos, equipamentos eletrônicos e papéis de recibos térmicos (HUANG et al., 2012; LIAO e KANNAN, 2011).

A exposição oral, através da ingestão de alimentos contaminados, é a principal fonte de exposição ao BFA em todas as faixas etárias da população humana não exposta ocupacionalmente (EFSA, 2006; EU, 2003). No organismo, o BFA é metabolizado pelo fígado e parede do intestino em BFA-glicuronídeo e BFA-sulfato, por meio de reações de detoxificação do organismo. Estes metabólitos são eliminados

quase que completamente dentro de 24 horas, após a exposição, através da urina, portanto esta é a matriz biológica mais adequada para o biomonitoramento da exposição humana (DEKANT e VÖLKEL, 2008). Além disso, as concentrações urinárias podem ser utilizadas para cálculos estimados da exposição diária a este contaminante (LAKIND e NAIMAN, 2011; VÖLKEL et al., 2008).

Nos últimos anos, muito tem sido debatido sobre os efeitos tóxicos do BFA em concentrações inferiores ao valor de ingestão diária aceitável (IDA) de 50 microgramas por kilo de peso corpóreo por dia ($\mu\text{g/kg/dia}$), inicialmente estabelecido por agências regulamentadoras tais como a *European Food Safety Authority* (EFSA) e USEPA (LIAO et al., 2012b; BIEDERMANN et al., 2010). Em vista de incertezas acerca dos potenciais efeitos da exposição ao BFA para a saúde, a EFSA decidiu reduzir o valor de IDA para 4 $\mu\text{g/kg/dia}$ em 2015, no entanto a USEPA ainda não reavaliou esse valor (EFSA, 2015; CHEN et al., 2017). A Tabela 1 mostra os valores de IDA estipulados por ambas agências e pela *Health Canada*.

Tabela 1 – Ingestão diária aceitável (IDA) de BFA.

<i>EFSA</i> ($\mu\text{g/kg/dia}$)	<i>USEPA</i> ($\mu\text{g/kg/dia}$)	<i>Health Canada</i> ($\mu\text{g/kg/dia}$)
4	50	25

Fonte: Adaptado a partir de Chunyang Liao, Fang Liu e Kurunthachalam Kannan (2012), EFSA (2015) e Chen et al. (2017).

Diversos estudos mostraram que a exposição a doses baixas e ambientalmente relevantes de BFA pode causar efeitos adversos durante a gravidez, infância e idade adulta, incluindo nascimento pré-maturo, baixo peso corpóreo em recém-nascidos, alteração de comportamento e do desenvolvimento neural infantil, redução da fertilidade em mulheres, redução da qualidade do esperma em homens e alterações na produção de hormônios sexuais em crianças e adultos (ROCHESTER, 2013). Alguns estudos epidemiológicos mostraram uma relação entre a exposição de crianças, adolescentes e adultos ao BFA e o desenvolvimento de obesidade, assim como de doenças cardiovasculares, resistência à insulina, intolerância à glicose e diabetes *mellitus* tipo II (DMT2) (LANG et al., 2008; MELZER et al., 2012; TRASANDE et al., 2012). Tais observações levaram pesquisadores a levantarem novos questionamentos sobre os efeitos adversos da exposição ao BFA e a conduzirem tanto estudos *in vitro* como *in vivo* para avaliar em que extensão e de que forma esse

composto estaria desregulando vias metabólicas específicas que poderiam ocasionar tais doenças.

Com a preocupação crescente em relação aos efeitos adversos causados pelo BFA à saúde humana, novas restrições e regulamentações foram criadas para impor limites à utilização desta substância em produtos de consumo. Alguns exemplos foram a proibição da utilização do composto para produção de mamadeiras no Canadá em 2008, na França em 2010 e na União Europeia em 2011 (ELADAK et al., 2015), enquanto no Japão, o uso de BFA para a confecção de papéis de recibos térmicos foi banido em 2001 (LIAO et al., 2012a). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 2011 a Resolução RDC n. 41/2011, que proíbe a importação e fabricação de mamadeiras que contenham o BFA (ANVISA, 2011).

Dessa forma, a busca por novas substâncias alternativas ao BFA tem se intensificado nos últimos anos. O 4,4'-sulfonildifenol, um análogo estrutural do BFA, é uma das substâncias alternativas que apesar de não ser regulamentada, já vem sendo utilizada em escala considerável e sem restrições (LIAO et al., 2012). No entanto, pouco se sabe sobre este composto em termos toxicológicos e alguns estudos demonstram que o bisfenol S (BFS) possui toxicidade, genotoxicidade e atividade estrogênica semelhante ao BFA (ELADAK et al., 2015), o que gera questionamentos acerca da “segurança” oferecida pelo uso desse composto.

1.3. Bisfenol S

O BFS vem sendo utilizado como substituto do BFA em produtos de consumo, uma vez que possui estrutura química muito semelhante ao BFA, porém possui maior estabilidade ao aquecimento e a luz, sendo introduzido como intermediário para produção de resinas epóxi e plásticos de policarbonato (HERRERO, et al., 2018). Como a utilização deste composto ainda não é regulamentada, é difícil identificar os produtos que contenham e que possivelmente liberam o BFS no ambiente. O BFS pode ser encontrado principalmente em produtos de consumo diário, tais como plásticos, revestimento interno e embalagem de latas de alimentos e de bebidas, mamadeiras para bebês, brinquedos, materiais médicos e dentários, produtos de cuidado pessoal e papéis de recibos térmicos, neste último caso sendo necessário

para o desenvolvimento de cor. Desta forma, todos estes produtos mencionados são potenciais fontes de BFS para o meio ambiente (WU et al., 2018).

O BFS é onipresente no meio ambiente, sendo que sua ocorrência já foi reportada em poeira doméstica, águas fluviais, águas superficiais, efluentes de esgoto e sedimento marinho em concentrações inferiores que o BFA, porém na mesma ordem de magnitude (WU et al., 2018). No entanto, comparado ao BFA, o BFS possui uma maior meia-vida no ambiente e não é passível de biodegradação (HELIES-TOUSSAINT et al., 2014). Portanto, é mais provável que se acumule e persista no ambiente. Em humanos, o BFS já foi detectado na urina em concentrações comparáveis ao BFA. Liao et al. (2012a) detectaram concentrações de BFS de até 12,3 ng/mL em 78% de amostras de urina obtidas de um total de 100 adultos norte americanos não expostos ocupacionalmente ao BFS, enquanto o BFA foi detectado em 95% das amostras, em concentrações que chegaram a 37,7 ng/mL.

Embora a literatura científica atual sobre os efeitos tóxicos do BFS ainda seja escassa, estudos que buscam entender os possíveis riscos à saúde e os possíveis mecanismos moleculares associados ao BFS já evidenciaram que este composto exibe potencialmente toxicidade aguda, desregulação endócrina, toxicidade reprodutiva, neurotoxicidade, imunotoxicidade e potencial para o desenvolvimento de doenças (QIU et al., 2019). Dentre alguns exemplos, estudos *in vivo* mostraram que a exposição subcrônica ao BFS (5000 µg/kg /dia; por 8 semanas) está associada a danos no fígado, diminuição da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em camundongos (ZHANG et al., 2017) e redução na fertilidade de camundongas fêmeas (100 µg/kg/dia; por 21 dias) potencialmente mediadas por estresse oxidativo (NOURIAN et al., 2017).

Assim como para o BFA, estudos recentes também mostraram que o BFS também está envolvido no desenvolvimento de doenças metabólicas, especialmente obesidade e esteatose (HÉLIÈS-TOUSSAINT et al. 2014). Estudos experimentais mostraram que a exposição a este composto químico pode levar por exemplo, a efeitos obesogênicos em camundongos após exposição perinatal e crônica (até 22 semanas após o nascimento) em associação com uma dieta rica em gordura (exposição a 1,5 e 50 µg/kg/dia pela água de beber) (IVRY DEL MORAL et al., 2016) bem como induzir a expressão de múltiplos genes relacionados ao metabolismo lipídico e adipogênese, incluindo aqueles pertencentes às vias de biossíntese do

colesterol e associados a e adipogênese em pré-adipócitos primários humanos em diferenciação (BOUCHER et al., 2016).

Quanto à sua atividade hormonal e desregulação da atividade endócrina, diversos estudos *in vitro* confirmaram que o BFS possui atividade estrogênica, androgênica, anti-estrogênica e anti-androgênica em diferentes linhagens celulares avaliadas, sendo que sua ação e potência é muito semelhante à do seu análogo BFA embora, no geral, os estudos evidenciem que o BFS é ligeiramente menos potente comparado ao BFA (ROCHESTER E BOLDEN, 2015). Ainda, estudos que avaliaram a ativação de vias de sinalização não-genômicas pelo BFS também demonstraram que este composto possui atividade semelhante ao BFA, sendo que em concentrações fento- a picomolares o BFS induziu ações mediadas por receptores de estrogênio alfa localizados na membrana, tais como a indução da via de sinalização proteíno-quinases ativadas por mitógenos, que é importante para normal funcionamento, proliferação e apoptose celular (VIÑAS AND WATSON 2013a, 2013b).

Embora os mecanismos de toxicidade associados ao BFS possam ser atribuídos a suas interações com receptores celulares e à sua alta afinidade pela molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), possivelmente causando genotoxicidade e mutagenicidade, bem como às macromoléculas proteicas, uma vez que possuem alto potencial para desencadear estresse oxidativo (QIU et al., 2019), ainda existe a necessidade de se investigar os mecanismos de toxicidade precisos e as vias metabólicas envolvidas na toxicidade do BFS usando abordagens e métodos científicos inovadores.

1.4.A exposição aos bisfenóis e o desenvolvimento da síndrome metabólica - estudos epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro*

Embora as pesquisas iniciais tenham sido direcionadas aos efeitos dos desreguladores endócrinos no sistema reprodutivo, por seu potencial efeito estrogênico, estudos epidemiológicos recentes indicam correlação entre a exposição a esses compostos e o desenvolvimento de síndrome metabólica, DMT2 e dislipidemias, além de doenças cardiovasculares (ASHLEY-MARTIN et al., 2014; RANCIÈRE et al., 2015). Mais de 90% da população dos Estados Unidos apresenta níveis detectáveis de BFA na urina (CALAFAT et al., 2008) e resultados do estudo

americano “*National Health and Nutritional Examination Survey*” (NHANES) indicaram que concentrações elevadas deste composto se associavam com prevalência de DMT2 (LANG et al., 2008).

A partir das discussões levantadas pelos estudos epidemiológicos, têm-se observado um aumento no número de estudos experimentais com a finalidade de confirmar a hipótese de que os bisfenóis poderiam exercer uma disfunção metabólica em órgãos responsáveis pela homeostase energética e elucidar os mecanismos através dos quais esses compostos estariam desencadeando tais doenças nos indivíduos expostos.

Em estudo realizado por García-Arevalo e colaboradores (2014) a exposição ao BFA, durante a gravidez em camundongos, levou a alterações como hiperglicemia, aumento na secreção de insulina e redução da tolerância à glicose na prole dos animais expostos, além de aumentar as concentrações hepáticas de triglicerídeos. Angle e colaboradores (2013) administraram doses de BFA que variavam de 5 a 50.000 µg/kg/dia em fêmeas grávidas de camundongos e também observaram nos descendentes machos uma redução da tolerância à glicose, maior insensibilidade à insulina, aumento da secreção de insulina e diminuição na secreção de adiponectina nos animais expostos. Além disso, para a maioria dos achados deste estudo foram encontradas curvas dose-resposta não-monotônicas (DRNM), algo que é frequentemente observado para o BFA e outros desreguladores endócrinos (BEAUSOLEIL et al., 2013).

Marmugi e colaboradores (2012) mostraram, em dois estudos complementares, que a exposição de camundongos machos a diferentes doses de BFA (5-5000 µg/kg/dia), durante um período de 28 dias após a gestação, levou a um aumento na expressão de genes relacionados à síntese de ácidos graxos (MARMUGI et al., 2012) e que, quando expostos de forma crônica às mesmas doses de BFA, os camundongos desenvolveram hiperglicemia e hipercolesterolemia, associados a um aumento na expressão de genes envolvidos na biossíntese de colesterol (MARMUGI et al., 2014).

Os estudos *in vitro* que avaliaram a exposição aos desreguladores endócrinos em diferentes linhagens celulares corroboram os estudos *in vivo*, demonstrando alterações moleculares que interferem nas vias de sinalização celular e no metabolismo de lipídeos, secreção de insulina e consumo de energia. Estudo realizado por Héliès-Toussaint e colaboradores (2014) mostrou que o tratamento de

linhagens celulares HepG2 e de pré-adipócitos 3T3-L1 a baixas doses de BFA e BFS levou ao aumento significativo nas concentrações de triglicérides intracelulares e à diminuição da lipólise. Além disso, o tratamento com 1 pM de BFA aumentou a expressão dos RNAs mensageiros (mRNAs) de SREBP-1c, PPAR γ -2 e aP2, genes envolvidos na diferenciação dos adipócitos.

Além disso, a exposição a baixas doses de BFA (10^{-4} a 10^{-12} M) induziu significativa disfunção em mitocôndrias de células HepG2, incluindo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), da lipoperoxidação e acúmulo de lipídeos nas células, além da liberação de citocinas pró-inflamatórias (HUC et al., 2012). Tais estudos evidenciam que a exposição ao BFA e ao BFS pode levar à desregulação metabólica sistêmica, possivelmente através da ação tóxica em alvos moleculares específicos, especialmente em células de tecidos e órgãos que regulam o metabolismo energético.

1.5. Bisfenóis e possíveis alvos moleculares em células e tecidos que regulam o metabolismo energético.

Os bisfenóis são considerados químicos desreguladores endócrinos (do inglês *Endocrine Disrupting Chemical* – EDC) com conhecido e bem estudado potencial estrogênico. Estes compostos possuem estrutura química semelhante ao hormônio endógeno estradiol (E2) e portanto, assim como este hormônio, possuem afinidade por receptores de estrogênio (REs) nucleares. Li e colaboradores (2018) demonstraram em estudo *in vitro* com diferentes linhagens celulares que o BFA possui atividade agonista pelos dois subtipos de REs nucleares existentes, RE α (RE α) e RE β (RE β), enquanto o BFS somente possui seletividade específica pelo subtipo RE α (LI et al, 2018). Portanto, ambos os compostos podem ser danosos à saúde humana possivelmente pela habilidade de regular as ações dos REs nos diversos órgãos e subtipos celulares que possuem estes receptores (ROCHESTER, 2013).

Sabe-se atualmente que os RE α e RE β , que se localizam tanto no citosol quanto no núcleo celular, podem atuar de diferentes maneiras em células nas quais são expressos: a) através do mecanismo genômico clássico no qual, quando ativados por ligantes, REs podem dimerizar e migrar para o núcleo, onde se ligam a Elementos de Resposta ao Estrogênio (EREs) no DNA e, juntamente com co-reguladores,

controlam a atividade transcricional de diferentes genes-alvo de REs; b) através do mecanismo genômico não-clássico, onde os REs também podem interagir com outros fatores de transcrição, tais como Sp1 ou Ap1, para regular a expressão gênica; e por fim c) mecanismos não-genômicos rápidos, que ativam cascatas intracelulares de sinalização envolvendo p44/42 MAPK, Src e Akt (LI et al., 2018; Nadal et al., 2018).

Acconcia et al. (2015) elaboraram uma revisão completa na qual abordaram os principais mecanismos de ação já reportados para o BFA (ACCONCIA et al., 2015). Nesta revisão eles reforçaram que o BFA possui atividade agonista sobre o RE α , atuando de maneira semelhante ao E2, porém o contaminante atua inibindo a atividade deste hormônio sobre o RE β , uma vez que o BFA possui atividade antagonista neste receptor. Ainda, os mesmos autores enfatizaram que o BFA também pode desencadear respostas extra nucleares rápidas quando se liga a REs (α e β) localizados na membrana plasmática das células ativando, por exemplo sinais extra nucleares mediados por RE α que resultam na ativação das vias quinase extracelular regulada/proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês *extracellular regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*, ERK/MAPK) e fosfatidilinositol-3-quinase/AKT (PI3K/ AKT), culminando na ativação de proliferação celular (Acconcia et al., 2015).

Recentemente foram ainda descobertos dois novos receptores de estrogênio de membrana, o receptor de membrana não-clássico (ncmER) descrito por Nadal e colaboradores (2000) e o um receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPR30) (MAGGIOLINI E PICARD, 2010), que posteriormente passam a ser considerados o mesmo receptor por Nadal e colaboradores (NADAL et al., 2018). O BFA em uma baixa concentração (1 nM) também se liga a este receptor e desencadeia a rápida indução de alterações nas concentrações intracelulares de cálcio observadas em ilhotas pancreáticas de Langerhans em camundongos. O maior influxo de Ca²⁺ nas células β -pancreáticas estimula o aumento na secreção de insulina (NADAL et al, 2000).

Apesar de a atividade agonista do BFA e do BFS sobre receptores de estrogênio nucleares serem o principal alvo de estudos que investigam seus mecanismos de toxicidade, dados de estudos *in vitro* e *in silico* que avaliam ligações entre receptores e seus ligantes permitiram a descoberta de novos alvos farmacológicos em diferentes linhagens celulares principalmente para o BFA. Dentre estes novos alvos, já foi reportado que o BFA se liga a um grande número de

receptores hormonais, receptores de androgênio, receptores de hormônios da tireóide, receptor de glicocorticóides e receptor ativador de proliferação de peroxissomos (PPAR γ) (MACKAY E ABIZAID, 2018). Em relação ao BFS, já foi reportado que ele também pode atuar sobre receptores de hormônios da tireóide e PPAR γ (QIU et al., 2016; BOUCHER et al., 2016).

Uma vez que uma das maiores preocupações relacionadas com a exposição ao BFA e ao BFS é o desenvolvimento de obesidade e desordens relacionadas ao metabolismo lipídico, o potencial de ativação do PPAR γ por ambos os compostos ganhou atenção da comunidade científica nos últimos anos. O PPAR γ é um dos fatores de transcrição que regulam a expressão de diversos genes que levam a maturação de adipócitos, sendo considerado o principal regulador do processo de adipogênese (ROSEN et al., 2002). Dentre os estudos que avaliaram a ação do BFA e BFS sobre este receptor, tem destaque o estudo de Ahmed and Atlas (AHMED e ATLAS, 2016). Neste estudo estes autores mostraram que o tratamento com ambos os compostos por 24 horas (25 e 50 μ M) ativou fracamente o PPAR γ em células COS-7 (fibroblastos de rins de macaco próprias para ensaios de transfecção) transfectadas com mPPAR γ , evidenciando que e o potencial adipogênico destes compostos (demonstrado neste trabalho em preadipócitos murinos 3T3-L1) requer a ativação deste receptor (AHMED e ATLAS, 2016).

No entanto, ainda existem muitos questionamentos sobre como as respostas celulares, teciduais e sistêmicas aos bisfenóis são orquestradas e sobre quais os possíveis efeitos da ativação de cada um destes receptores celulares ou ainda de diversos deles simultaneamente na regulação do metabolismo como um todo e especialmente na regulação do metabolismo energético, levando conseqüentemente ao desenvolvimento das doenças metabólicas associadas à exposição a estes contaminantes. Se todos ou somente alguns destes mecanismos concorrem para o potencial efeito destes desreguladores endócrinos ainda não é claro e merece maior investigação.

1.6. Estudos Ômicos

A análise quantitativa de grandes quantidades de redes de alterações moleculares e funcionais que ocorrem em vários níveis da organização biológica de um sistema vivo e que são moduladas por agentes químicos é campo da toxicologia

conhecido como toxicologia de sistemas. Esse campo de investigação baseado na integração de tecnologias “ômicas”, tais como transcriptômica, proteômica e metabolômica, pode fornecer informações abrangentes para a melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade associados à exposição a compostos químicos (RAMIREZ et al., 2018). Nos últimos anos, estas abordagens têm sido amplamente utilizadas no campo da toxicologia ambiental para prever possíveis mecanismos tóxicos desencadeados a partir da exposição a contaminantes emergentes (WILLIAMS et al., 2016).

Muitos estudos abordam como os desreguladores endócrinos afetam a transcrição gênica, porém sabe-se que a expressão de mRNAs pode não se correlacionar com a abundância de proteínas em uma célula ou em um organismo, sendo uma forma indireta de entender os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade desses compostos (ZHOU et. al, 2010). Diante desta limitação as análises proteômicas e metabolômicas surgem como ferramentas complementares à transcriptômica, e vêm sendo amplamente empregadas na descoberta de vias metabólicas afetadas pela exposição aos bisfenóis (SKOGLAND ENERSTVEDT et al., 2017).

1.7. Proteômica

No campo da toxicologia, os estudos de proteômica são conduzidos com a finalidade de avaliar as respostas moleculares de sistemas biológicos expostos a compostos químicos ou para desvendar os alvos moleculares diretos dos toxicantes. Isto é possível a partir da quantificação de proteínas em células ou tecidos que foram submetidos a diferentes condições ou tratamentos e, posteriormente, da comparação (análise estatística) entre duas ou mais condições específicas. Geralmente, um grupo exposto é comparado a um grupo não-exposto (controle) e as alterações nas vias ou processos metabólicos são então entendidas como modulações na expressão de proteínas pelo composto químico em estudo (RABILLOUD E LESCUYER, 2015).

Atualmente a análise proteômica vem sendo amplamente empregada não somente na descoberta dos alvos diretos de compostos químicos, mas também (e talvez principalmente) no entendimento das respostas indiretas através das quais células e tecidos trabalham para restaurar a homeostase que foi comprometida pela exposição ao toxicante. Desta forma, essas respostas indiretas fornecem informações

sobre as vias metabólicas que são afetadas pelos toxicantes, ainda quando os alvos primários não são identificados ou ainda fornece pistas das vias que as células ou tecidos regulam na tentativa de sobreviver (ou, de forma oposta, que aumentam a taxa de morte celular ou tecidual (RABILLOUD E LESCUYER, 2015).

Estudos experimentais que avaliaram a exposição ao BFA *in vivo* mostraram que a análise do proteoma de tecidos, tais como de glândulas mamárias, tecido cerebral, cardíaco e de órgãos do sistema imune, forneceu informações importantes acerca dos mecanismos de toxicidade dessa substância, possibilitando a identificação de alvos celulares e moleculares nesses tecidos, assim como das principais vias de sinalização desreguladas após a exposição (YANG et al., 2008; BETANCOURT et al., 2010; LJUNGGREN et al., 2016; LUO et al., 2017).

Ljunggren e colaboradores analisaram o proteoma do ventrículo esquerdo do miocárdio de ratos fêmeas *Fischer 344* que foram expostas a uma solução aquosa de frutose (5% v/v, dissolvida na água de beber) contaminada com 0,25 mg/L de BFA durante 10 dias. Através de duas abordagens de proteômica não-dirigida distintas, nano cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e gel de eletroforese bidimensional seguido por espectrometria de massas, eles identificaram alterações em proteínas envolvidas no transporte e oxidação de ácidos graxos, geração de EROs, integridade estrutural e metabolismo energético, indicando aumento na oxidação de lipídeos e diminuição da atividade antioxidante e geração de adenosina trifosfato (ATP) (LJUNGGREN et al., 2016).

Dong et al. (2018) avaliaram os efeitos da exposição ao BFA (10µg/L, de 4 a 96 horas pós-fertilização) no desenvolvimento de embriões do peixe-zebra (*Danio rerio*) através de análise proteômica das larvas expostas. A análise das funções de toxicidade das proteínas moduladas pela exposição ao contaminante revelou que as proteínas possuem papel em desordens do desenvolvimento, no desenvolvimento embrionário, na morfologia tecidual, desenvolvimento e sobrevivência do organismo e desenvolvimento de órgãos e tecidos, enquanto a análise de interações moleculares entre as proteínas desreguladas mostrou que elas estavam significativamente associadas com crescimento e proliferação celular e sobrevivência e morte celular.

Em estudo publicado recentemente, Vahdati Hassani e colaboradores (2018) investigaram os efeitos hepatotóxicos da exposição de ratos machos *Wistar* à 500 µg/kg/dia de BFA por período de 30 dias através de análises proteômicas e fosfoproteômicas não-dirigidas (abordagem baseada em gel de eletroforese

bidimensional) do tecido hepático destes animais. Neste estudo, eles identificaram novos potenciais biomarcadores de toxicidade no fígado, dentre eles proteínas envolvidas no metabolismo e degradação de ácidos graxos, via de sinalização de PPAR e glicólise e gliconeogênese (*long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial* e *alpha-enolase*) e no aumento de acúmulo de gordura no fígado e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (*betaine-homocysteine methyltransferase*) (VAHDATI HASSANI et al., 2018).

Apesar dos grandes esforços despendidos pelos diversos grupos de pesquisa na tentativa de ampliar o conhecimento e o entendimento dos principais mecanismos de toxicidade e das vias metabólicas desreguladas pelos bisfenóis que poderiam explicar a associação destes compostos com o desenvolvimento de doenças metabólicas, ainda há falta de dados que expliquem os principais efeitos deletérios observados após a exposição crônica ao BFA e, mais especificamente ao BFS, principalmente em órgãos que desempenham papel principal no metabolismo energético, tais como o fígado e o pâncreas, o que evidencia a necessidade do desenvolvimento de novos estudos neste campo da toxicologia.

1.8. Metabolômica

A metabolômica é uma ferramenta única, uma vez que pode ser utilizada para definir quantidades de xenobióticos internalizados em um sistema biológico e de seus produtos de biotransformação bem como as alterações no metaboloma endógeno, que representam a mudança final nos níveis de espécies químicas resultantes de perturbações moleculares nos níveis genômico e proteômico (STURLA et al., 2014). A metabolômica, definida como a análise abrangente de todos os metabólitos em um sistema, é ainda um campo de investigação recente comparado às outras “ômicas”, porém suas características particulares e a melhoria das técnicas analíticas aliadas a métodos modernos de reconhecimento de padrões contribuíram para o crescimento do seu uso (MONTEIRO et al., 2013).

No campo da toxicologia, o estudo do metaboloma possibilita o monitoramento das alterações metabólicas que se manifestam em sistemas biológicos após a exposição ao agente químico e portanto, o uso desta tecnologia tornou-se extremamente importante para a identificação de “assinaturas” de toxicidade, que são padrões de alterações metabólicas preditivas de um efeito tóxico causado pelo

composto químico (ZHAO E HARTUNG, 2015). O uso de abordagens metabolômicas na toxicologia tem se tornado cada vez mais atrativo, particularmente pelo desenvolvimento de novos métodos e tipos de espectrômetros de massa, que possibilitam a detecção do perfil global de metabólitos de baixo peso molecular nas amostras. O principal objetivo da implementação de análises metabolômicas em estudos toxicológicos é realizar medidas abrangentes do metaboloma para compreender como ele muda em resposta a agentes estressores, e desta forma possibilitar o entendimento das relações entre as perturbações e as vias bioquímicas afetadas (ROBERTSON, 2005).

Devido à elevada sensibilidade, boa seletividade e a ampla faixa de detecção, a espectrometria de massas tornou-se rapidamente uma poderosa ferramenta para as análises metabolômicas e diferentes abordagens são utilizadas para as mais variadas aplicações na toxicologia (BEGER et al., 2010). Estudos de metabolômica de larga escala vem sendo amplamente utilizados na toxicologia ambiental a fim de investigar as respostas tempo e dose-dependentes a estímulos ambientais, sendo que as abordagens *high-throughput* de metabolômica não-dirigida possibilitam a rápida aquisição de espectros de milhares de íons em uma única amostra, permitindo a identificação de uma quantidade expressiva de metabólitos em um número de amostras considerável em curto espaço de tempo (ZAMPIERI et al., 2017).

Grupos de pesquisa em todo o mundo vêm utilizando a metabolômica não-dirigida para elucidar as mecanismos de toxicidade e as alterações nas vias metabólicas decorrentes da exposição ao BFA em diversos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (revisado em WANG et al., 2018). O grupo de Zalko foi o pioneiro na exploração de alterações metabólicas em roedores expostos durante o período perinatal a doses baixas ou muito baixas de BFA, utilizando metabolômica não-dirigida baseada em ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) (CABATON et al., 2013; TREMBLAY-FRANCO et al., 2015). Em seu primeiro estudo (CABATON et al., 2013), eles avaliaram os efeitos do BFA (0,025 a 25 $\mu\text{g/kg/dia}$) em camundongos CD1 machos nos dias pós-natais (PND) 2 e 21, realizando análises espectrométricas de ^1H -RMN do extrato animal inteiro (PND2) ou amostras de soro, fígado e cérebro (PND21). Em seu segundo trabalho (TREMBLAY-FRANCO et al., 2015), eles avaliaram os efeitos metabólicos crônicos (em 5 tempos diferentes até PND200) após exposição ao BFA (doses de 0,25 a 250 $\mu\text{g/kg/dia}$) em filhotes de ratos Sprague-Dawley. Ambos os estudos revelaram que o BFA pode modular o

metabolismo energético da prole, principalmente glicose, piruvato, lactato e metabolismo lipídico (marcadores lipídicos no soro e ácidos graxos).

Apesar de muitos esforços para entender os mecanismos tóxicos destes contaminantes em diferentes modelos experimentais, as possíveis vias de toxicidade do BFA e BFS que levam a alterações metabólicas relacionadas à homeostase energética no fígado e no pâncreas bem como em células hepáticas e pancreáticas ainda não estão completamente elucidadas. A integração de resultados provenientes de estudos de *high-throughput* proteômica e metabolômica pode ajudar na descoberta de vias de toxicidade destes compostos químicos e trazer informações adicionais sobre processos celulares afetados após a exposição. Assim, no presente trabalho, propusemos o desenvolvimento de dois estudos complementares: (I)- Um estudo *in vivo* (CAPÍTULO I) para investigar as alterações metabólicas, fisiológicas e alterações na expressão de proteínas do tecido hepático e pancreático provenientes de roedores e, (II)- um estudo *in vitro* (CAPÍTULO II), utilizando metabolômica não-dirigida a fim de melhor caracterizar as alterações metabólicas anteriormente observadas no estudo inicial, realizando a análise do extrato intracelular de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e células de insulinoma de roedores (INS-1E). Ambos os estudos possibilitaram ampliar nossa compreensão sobre as vias metabólicas desreguladas por ambos os bisfenóis e lançar luz sobre os prováveis mecanismos de toxicidade de ambos os contaminantes estudados.

2. HIPÓTESE

A avaliação da expressão diferencial de proteínas do fígado e do pâncreas *in vivo* deve auxiliar no entendimento de vias de toxicidade que levam à desregulação metabólica e da homeostase energética em condições de exposição crônica aos bisfenóis A e S. Os mecanismos tóxicos associados devem se correlacionar com as possíveis alterações bioquímico-metabólicas e fisiológicas no sistema vivo ocasionadas pela exposição. Ainda, a análise metabolômica dos extratos de linhagens celulares específicas dos tecidos hepático e pancreático deve auxiliar na caracterização das alterações metabólicas ocasionadas pela exposição a ambos os contaminantes e contribuir para a compreensão das vias metabólicas afetadas nestes tecidos.

Capítulo I. Avaliação da expressão proteica e parâmetros bioquímicos relacionados ao diabetes mellitus tipo II e dislipidemias em ratos expostos aos bisfenóis A e S.

1. OBJETIVO

Caracterizar as alterações bioquímico-metabólicas e fisiológicas em ratos machos *Wistar* expostos de forma crônica às doses aproximadas de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS ou co-exposição de ambos os compostos (BFA e BFS), assim como a expressão diferencial de proteínas dos tecidos hepático e pancreático dos animais expostos à menor dose de BFA ou BFS com a finalidade de elucidar os mecanismos de toxicidade e moleculares associados à exposição.

1.1. Objetivos específicos

I - Avaliar as concentrações de glicose, colesterol total (CT), HDL colesterol (HDL-C), LDL colesterol (LDL-C), triglicérides (TGs) e atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos machos *Wistar* após exposição às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e co-exposição;

II - Avaliar a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose em ratos machos *Wistar* respectivamente na 18ª e 19ª semanas de exposição às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e co-exposição;

III - Avaliar as alterações significativas na expressão de proteínas de tecido hepático e pancreático de ratos machos *Wistar* após exposição a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS;

IV - Classificar as proteínas diferencialmente expressas, no fígado e pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS, quanto à função molecular e processos biológicos nos quais participam;

V - Estabelecer redes de interações entre as proteínas diferencialmente expressas no fígado e pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS;

VI - Validar os resultados obtidos nas análises proteômicas do fígado e pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS por ensaio de *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos, reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω ·cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford, MA, EUA) foi utilizada em todo o trabalho. Para o tratamento dos animais 4,4'-sulfonilbisfenol (98%, HPLC) e 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano ($\geq$ 99%, HPLC) foram utilizados (Sigma-Aldrich, MO, EUA). As soluções de bisfenóis adicionadas à água foram preparadas em álcool etílico P.A. (Synth), sendo que a concentração final de álcool etílico na água para todas as soluções foi de 0,1% v/v.

Insulina humana regular (Humulin R®; Eli Lilly), solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% m/v estéril (Isofarma), solução de glicose 40% m/v (Vetec) e kit contendo glicosímetro, lancetas e fitas teste (Roche, modelo *ACCU-CHEK Active*) foram utilizados para medir glicemia e para realização do Teste de Tolerância à Glicose (TTG) e Teste de Tolerância à Insulina (TTI). Cloridrato de xilazina (Anasedan®, Ceva Saúde Animal) e cloridrato de ketamina (Dopalen®, Ceva Saúde Animal) foram utilizados para anestesia dos animais. As amostras de soro foram obtidas por centrifugação em centrífuga (Centribio, modelo 802B) das amostras de sangue coletadas em tubos com gel separador e reagente ativador de coágulo (Becton Dickinson, modelo *SST II Advance*). Durante todo o trabalho foram utilizados tubos criogênicos de 1,5 e 2,0 mL (Axygen).

Para a determinação dos níveis séricos de TGs, CT, LDL-C e HDL-C foram utilizados kits comerciais específicos (Biotécnica Indústria e Comércio Ltda) e os ensaios foram realizados em um espectrofotômetro (PerkinElmer, modelo LAMBDA 25 UV/VIS). Para a determinação das atividades das enzimas ALT e AST também foram utilizados kits comerciais (Linea Liquida, Wiener Lab) e espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Konelab Prime).

Para extração das proteínas foram usados os reagentes e soluções: uréia 7 M, tiouréia 2 M, ditiotreitól (DTT) 70 mM, 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-propano sulfonato (CHAPS) 2% m/v, água reagente para biologia molecular livre de DNase e RNase e coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e os equipamentos: homogeneizador mecânico (Fisatom, modelo 713D), centrífuga

refrigerada (Hettich, modelo Universal 320R) e banho de ultrassom 1400 A (Original, Brasil).

Para a quantificação das proteínas foram utilizados reativo de *Bradford* (Bio-Rad, *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*), albumina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e espectrofotômetro (Agilent, modelo *Varian CaryMicroplate Reader*). Dispositivos para ultrafiltração e concentração das amostras (GE Healthcare, modelo *Vivaspin 500*) foram usados para a troca da solução de homogeneização por tampão bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM.

Para o preparo das amostras para as análises proteômicas foram usados os reagentes: NH_4HCO_3 50 mM, DTT 100 mM, iodoacetamida (IAA) 300 mM, hidróxido de amônio (NH_4OH) 1N, ácido trifluoroacético (TFA) 5% v/v (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e tripsina 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Para a análise dos peptídeos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) a plataforma utilizada foi um 2D-RP/RP Acquity UPLC M-Class System acoplado a um espectrômetro de massas Synapt G2-Si *High Definition Mass Spectrometry* (HDMS^E) usando fonte *nano electrospray ionization* (nanoESI) e coluna cromatográfica de fase reversa M-Class HSS T3 (Waters Corporation, Milford, MA). Água para LC-MS/MS Ultra CHROMASOLV[®], testada para cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi utilizada para o preparo da solução de ácido fórmico 0,1% v/v.

2.2. Delineamento experimental

2.2.1. Animais

Foram utilizados 42 ratos machos *Wistar*, obtidos com 3 semanas de idade (aproximadamente 60 g) do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Os animais, alojados inicialmente em grupos de 3 animais por caixa de polipropileno, foram adaptados durante 1 semana em sala com ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura controlada (22-25°C) e com acesso a água e a uma dieta padrão *ad libitum* antes do início do tratamento. A fim de evitar eventual contaminação, garrafas de vidro foram utilizadas para armazenar a água durante todo o tratamento. Todos os procedimentos realizados nesse estudo estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFRP-USP (protocolo número: 15.1.979.60.7), conforme parecer emitido por essa Comissão (ANEXO II).

2.3. Escolha das doses e tratamento dos animais

Os desreguladores endócrinos, classe de substâncias na qual se incluem os bisfenóis, possuem efeitos abaixo de doses normalmente consideradas seguras e, em alguns casos, apresentam DRNM, que se caracterizam por relação não linear entre a dose e o efeito (BEAUSOLEIL et al., 2013; VANDERNBERG et al., 2012). Estudos toxicológicos que avaliaram a exposição à diferentes doses de BFA evidenciaram que o composto apresenta curva DRNM, sendo que os efeitos foram observados até mesmo para doses abaixo de 50 µg/kg/dia, estipulado pela USEPA como IDA (LIAO et al., 2012; ANGLE et al., 2013; YANG et al., 2016).

Uma revisão sistemática comparou estudos acerca da exposição ao BFA em baixas doses, tanto *in vitro* como *in vivo*, e reportou que os efeitos tóxicos causados por esse desregulador endócrino foram mais significativos para as menores doses avaliadas nos estudos experimentais, sendo que para os estudos em ratos e camundongos essas doses variaram entre 0,005 até 450 µg de BFA por quilograma de peso corpóreo de animal por dia (TEEGUARDEN e HANSON-DRURY, 2013).

Dessa forma, para o presente estudo, foi priorizada a avaliação da exposição a baixas concentrações de bisfenóis, estando os animais em estudo expostos a aproximadamente 50 e 500 µg/kg/dia de BFA e BFS. A escolha de tais doses levou em consideração o valor de IDA de 50 µg/kg/dia estabelecido para o BFA pela USEPA (LIAO et al., 2012), determinado como um valor aceitável de exposição diária para o homem.

Os animais foram cronicamente expostos aos contaminantes através da água de beber por 20 semanas (início: 4ª semana de vida, final: 24ª semana de vida). As soluções de bisfenóis adicionadas à água foram preparadas em álcool etílico P.A., sendo que a concentração final de álcool etílico na água para todas as soluções foi de 0,1% v/v. As concentrações das soluções de bisfenóis preparadas para serem adicionadas à água foram calculadas semanalmente durante todo o período experimental tendo como base a média do consumo diário da água e o peso médio dos animais, que foram determinados a cada semana de experimento, de forma que os grupos estivessem sempre expostos a aproximadamente 50 ou 500 µg/kg/dia de

BFA e/ou BFS. Salienta-se ainda que a exposição crônica por via oral (água de beber) adotada no presente estudo já foi e continua sendo utilizada em estudos experimentais com os bisfenóis (MIYAWAKI et al., 2007; MARMUGI et al., 2014; LJUNGGREN et al., 2016). As concentrações iniciais calculadas para o estudo foram: concentração 1 (C1) - 0,183 mg/L (para uma exposição aproximada de 50 µg/kg/dia) e concentração 2 (C2) - 1,83 mg/L (para uma exposição aproximada de 500 µg/kg/dia), considerando que na semana inicial de tratamento (4ª semana) os animais pesavam em média 110 g e consumiam em média 30 mL de água/dia. Os animais foram divididos em 7 grupos com 6 animais cada (n=42), da seguinte maneira:

- a) Grupo I - Controle (n=6): Tratados com água contendo 0,1% v/v de álcool etílico P.A.
- b) Grupo II - BFA 50 (n=6): Tratados com água de beber contendo C1 de BFA (correspondendo a 50 µg/kg/dia de BFA);
- c) Grupo III - BFS 50 (n=6): Tratados com água de beber contendo C1 de BFS (correspondendo a 50 µg/kg/dia de BFS);
- d) Grupo IV - BFA + BFS 50 (n=6): Tratados com água de beber contendo C1 de BFA e de BFS (correspondendo a 50 µg/kg/dia de BFA e 50 µg/kg/dia de BFS);
- e) Grupo V - BFA 500: Tratados com água de beber contendo C2 de BFA (correspondendo a 500 µg/kg/dia de BFA);
- f) Grupo VI - BFS 500 (n=6): Tratados com água de beber contendo C2 de BFS (correspondendo a 500 µg/kg/dia de BFS);
- g) Grupo VII – BFA + BFS 500 (n=6): Tratados com água de beber contendo C2 de BFA e de BFS (correspondendo a 500 µg/kg/dia de BFA e 500 µg/kg/dia de BFS).

2.4. Teste de tolerância à insulina

O TTI foi realizado na décima oitava semana de protocolo experimental seguindo a metodologia descrita por Angle e colaboradores (2013) com modificações. Os animais foram submetidos a 15 horas de jejum alimentar e após uma coleta de sangue inicial (tempo 0) os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de insulina humana regular (0.75 U/kg), preparada em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% m/v estéril. As amostras de sangue dos animais foram obtidas a partir da

veia caudal nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de insulina para a determinação da glicemia utilizando-se um kit contendo glicosímetro, lancetas e fitas teste.

2.5. Teste de tolerância à glicose

O TTG foi realizado na 19ª de protocolo experimental também seguindo a metodologia descrita por Angle e colaboradores (2013) com modificações. Os ratos submetidos a jejum de 15 horas receberam uma injeção i.p. de solução de glicose a 40% m/v (2 g/kg de peso corpóreo), também preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% m/v. As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal antes (tempo 0), 30, 60, 90 e 120 minutos depois da sobrecarga de glicose, para a determinação da glicemia utilizando-se um kit contendo glicosímetro, lancetas e fitas teste.

2.6. Obtenção de amostras de sangue e órgãos dos animais

Foram coletadas amostras de sangue da veia caudal dos animais submetidos a jejum de 10 horas a fim de determinar a glicemia antes da injeção de anestésico. A anestesia foi realizada por injeção i.p. de cloridrato de ketamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e, após a confirmação da anestesia, a cavidade peritoneal e torácica foram expostas para rompimento do diafragma. As amostras de sangue para realização dos ensaios bioquímicos foram obtidas por punção cardíaca e, rapidamente foram transferidas para tubos contendo ativador de coágulo, os quais foram centrifugados a 2.325 vezes a gravidade durante 15 minutos para a obtenção do soro. As amostras de soro foram aliquotadas em tubos criogênicos. Após a obtenção do sangue, os animais foram decapitados e os tecidos hepático e pancreático foram removidos, lavados em solução de cloreto de sódio 0,9% m/v, dissecados e armazenados em tubos criogênicos. As alíquotas de soro e as amostras de tecidos dos animais foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, foram adequadamente armazenadas a -20 °C (alíquotas de soro) e a -80 °C (amostras de tecido) até o momento da realização das análises.

2.7. Ensaios bioquímicos

Os níveis de TGs, CT, LDL-C e HDL-C foram determinados no soro dos

animais em jejum de 10 horas através de ensaios bioquímicos realizados por análise espectrofotométrica no laboratório de Toxicologia e Essencialidades de Metais da FCFRP-USP com o uso de kits comerciais gentilmente fornecidos pela empresa Biotécnica Indústria e Comércio Ltda e de acordo com as especificações do fabricante.

Os ensaios para determinação da atividade das enzimas alanina ALT e AST séricas foram realizados no Laboratório Central de Análises Clínicas da FCFRP-USP.

2.8. Análise Proteômica

2.8.1. Obtenção das amostras de proteínas dos tecidos

As amostras de fígado tiveram a massa pesada entre 20 e 30 mg e as de pâncreas, entre 30 e 50 mg. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 250 µL de solução de homogeneização preparada com uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 70 mM e CHAPS 2% m/v, contendo 5 µL de coquetel inibidor de proteases. A solução foi preparada em água para biologia molecular, e mantidas em banho de gelo. Durante todo o processo de homogeneização e lise dos tecidos, as amostras foram mantidas em banho de gelo. Os homogenatos foram então submetidos a 4 ciclos de banho de ultrassom contendo gelo durante 5 minutos, vórtex por 15 segundos e repouso em gelo por 2 minutos para eficiente solubilização das proteínas. Por fim, os lisados foram centrifugados a 15,000 vezes a gravidade a 4 °C por 30 minutos para eliminação dos debris celulares. O sobrenadante foi transferido para novo tubo criogênico o qual foi armazenado a -80 °C.

2.8.2. Troca do solvente das amostras

Para a etapa de preparo das amostras para a análise proteômica foi necessário realizar a troca da solução de homogeneização, na qual as proteínas foram solubilizadas, por tampão NH_4HCO_3 50 mM (pH 8,5). Para tanto, foram utilizados dispositivos para ultrafiltração e concentração das amostras com membranas de poliétersulfona com tamanho de poro de 5 kDa. A troca de solvente foi realizada com 4 a 6 adições de tampão NH_4HCO_3 50 mM e com ciclos de centrifugação 15,000 vezes a gravidade a 4 °C por 30 a 45 minutos, dependendo da velocidade de filtração de cada amostra. Por fim, foram realizadas 1 ou 2 centrifugações nas mesmas condições

de velocidade e temperatura por 15 a 30 minutos, porém sem adição de tampão, para redução do volume e consequente concentração da amostra.

2.8.3. Quantificação de proteínas totais dos tecidos

A quantificação de proteínas foi realizada em microplacas pelo método colorimétrico de *Bradford* (1976) através de análise espectrofotométrica. Para preparo da curva de calibração, foram realizadas 5 diluições a partir do padrão de BSA (1 mg/mL), sendo que as concentrações foram de: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 mg/mL. Para o branco, utilizou-se água deionizada. Somente curvas de calibração com $r^2 > 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método. Para quantificação, as amostras foram diluídas 1:10 com água deionizada. Volumes de 10 μ L - tanto das soluções contendo concentrações conhecidas de BFA como das replicatas técnicas de cada amostra ($n=18$) – foram pipetados em triplicata em placa de 96 poços. Foram adicionados 200 μ L de reagente de *Bradford* para detecção das proteínas. A placa foi incubada no escuro por pelo menos 5 minutos em temperatura ambiente antes da realização das leituras das ABS de padrões e amostras, as quais foram realizadas em 595 nm. Os valores de ABS obtidos foram interpolados na curva de calibração estabelecida, para determinação da concentração de proteínas totais em mg/mL.

2.8.4. Preparo das amostras

Para cada amostra, foi calculado o volume que correspondia a 50 μ g de proteínas, e este foi transferido para um microtubo criogênico. A este volume foi adicionado tampão NH_4HCO_3 50 mM (pH 8,5) até o volume final de 85 μ L. As amostras foram então colocadas em estufa aquecida a 80 °C por 15 minutos. Em seguida, as mesmas foram incubadas em banho termostático a 60 °C por 30 minutos após a adição de 2,5 μ L de DTT 100 mM a cada amostra, para redução das proteínas, tornando-as mais acessíveis para alquilação e digestão. Depois de deixar as amostras resfriarem a temperatura ambiente por alguns minutos, foram adicionados a cada uma delas 2,5 μ L de IAA 300 mM para alquilação dos resíduos de cisteínas e seguiu-se incubação no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. Após alquilação, foi realizada a digestão das proteínas com a adição de 10 μ L de uma solução 0,05 μ g/ μ L de tripsina preparada em tampão NH_4HCO_3 50 mM (pH 8,5) por amostra. A digestão foi realizada *overnight* em banho termostático a 37 °C. Em

seguida, foram adicionados 10 µL de TFA 5% v/v e as amostras foram incubadas a 37 °C por 90 minutos, a fim de paralisar a ação da enzima. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 15,000 vezes a gravidade (6 °C) por 30 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para microtubos, nos quais foram acrescentados 5 µL de NH₄OH 1N a fim de aumentar o pH das amostras. A solução final, contendo os peptídeos, foi então destinada à análise por LC-MS/MS.

2.8.5. Análise de peptídeos por nano cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (nanoLC-MS/MS)

As análises qualitativas e quantitativas de nanoLC-MS/MS foram realizadas em sistema bidimensional de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplado à espectrometria de massas usando uma fonte nanoESI. A configuração desse instrumento se resume basicamente a uma interface (ou fonte de íons) do tipo *Electrospray*, acoplada a um analisador Quadrupolo (Q), seguido da câmara de mobilidade iônica (*Ion-mobility spectrometry*, IMS) e outro analisador do tipo *Time-of-Flight* (TOF). As amostras foram fracionadas em uma dimensão em coluna de fase reversa (75 µm de diâmetro × 150 mm de comprimento, 1,8 µm de tamanho de partícula). A quantidade de peptídeos injetada por amostra foi de 0,5 µg e a separação foi realizada com gradiente linear de fase móvel de 7% a 40% v/v (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) por 54 minutos num fluxo de 0,4 µL/min. Após a separação, as amostras foram direcionadas para o espectrômetro. Os espectros de massa foram adquiridos no modo íon positivo e dado-independente utilizando mobilidade iônica dos íons precursores (HDMSE⁺). Os íons precursores foram analisados por MS no TOF (ciclo de baixa energia) através do rastreamento de massas entre 50-2000 m/z em alta resolução (40.000 FWHM) e fragmentados por colisão induzida. Os íons fragmentos também foram resolvidos no TOF (ciclo de alta energia) com a mesma faixa de massa dos íons precursores. O espectrômetro foi calibrado usando espectros de MS/MS do peptídeo [*Glu1*]-*Fibrinopeptide B human* (Glu-Fib) em solução que foi usada como *sprayer* de referência da fonte NanoLock Spray.

2.8.6. Processamento e busca em banco de dados

Os espectros de MS e MS/MS foram processados usando o software Progenesis[®] QI for Proteomics versão 3.1 (Waters Corporation, Milford, MA) e as buscas por identificações foram realizadas contra a base de dados do proteoma de

Rattus norvegicus versão 2017/05 (29978 registros), utilizando o mesmo software. Para as análises quantitativas foram utilizados algoritmos específicos (*Apex3D*, *Peptide 3D* e *Ion Accounting*) também do Progenesis® QI for Proteomics, baseados nos parâmetros padrões para contabilidade iônica e quantificação descritos em Li e colaboradores (2009), Levin e Bahn (2010), Levin (2011) e Sandin e colaboradores (2011). Este software utiliza os dados de LC-MS/MS, executa o alinhamento das corridas e a detecção dos picos, criando uma lista de íons peptídicos de interesse que são então explorados dentro do *Peptide Ion Stats* por meio de métodos estatísticos multivariados, sendo que a etapa final é a identificação dos peptídeos e proteínas. Os seguintes parâmetros foram considerados para identificação:

- a) Tripsina foi escolhida como a enzima do processo de digestão, permitindo-se até duas clivagens errôneas;
- b) Cisteína-carbamidometilação foi definida como modificação fixa;
- c) Oxidação da metionina foi escolhida como modificação dinâmica;
- d) As identificações foram consideradas positivas somente para peptídeos de alta-confiança (*high confidence*), contendo uma taxa de falsa descoberta (FDR) menor do que 4%;
- e) Para ambos os tecidos (hepático e pancreático) foram consideradas somente as proteínas identificadas com 2 ou mais peptídeos, sendo pelo menos 2 peptídeos únicos.

As alterações (*fold-change*, FC) na expressão das proteínas foram obtidas através da razão simples entre as médias de abundância normalizada de cada proteína identificada para os diferentes tratamentos (BFA ou BFS) e o grupo controle. Para o tecido hepático, as proteínas com alterações médias de $\pm 1,5$ vezes a abundância normalizada entre os grupos experimentais foram consideradas suprarreguladas ou subreguladas. Para o tecido pancreático, o limiar de FC estipulado foi ± 2 vezes.

2.8.7. Classificação das proteínas de acordo com o banco de dados do Gene Ontology

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua função molecular e processos biológicos nos quais estão envolvidas. A classificação foi

realizada de acordo com o banco de dados do *Gene Ontology* (GO) (<http://www.geneontology.org>) utilizando a ferramenta *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships* (PANTHER) disponível online (disponível em <http://www.pantherdb.org/>).

2.8.8. Análise das redes de interações entre as proteínas diferencialmente expressas no fígado e pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou 50 µg/kg/dia de BFS pelo STRING

Com objetivo de melhor compreender as interações entre as proteínas encontradas com diferença de expressão e de forma exclusiva nos tecidos hepático e pancreático dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle, os números de acessos correspondentes às proteínas foram submetidos à análise de interação proteína-proteína utilizando a ferramenta *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING) disponível em <https://STRING.org>. Interações entre proteínas com *enrichment p-value* < 0,05 foram consideradas com significância estatística. Ainda, através desta ferramenta foram identificadas vias específicas às quais as proteínas pertencem de acordo com a base de dados fornecida pela Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (KEGG). A FDR foi definida para cada via identificada.

2.9. Validação das Análises Proteômicas: Quantificação da expressão de mRNA das proteínas diferencialmente expressas por RT-qPCR

2.9.1. Extração de RNA

Aproximadamente 50 mg de tecido foram homogeneizados em 1000 µL do reagente Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) e a extração do RNA procedeu de acordo com o protocolo do fabricante deste reagente. Depois de extraído, o RNA foi ressuspensionado em água livre de RNase (Nuclease-Free Water, Qiagen®) e quantificado medindo-se a densidade óptica a 230, 260 e 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.9.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), seguindo-se o protocolo do fabricante.

Para a síntese de cDNA foi utilizado 2 µg de RNA por amostra. Para cada amostra foi feito um mix contendo: 2 µL *RT Buffer* (10X); 0,8 µL de *dNTP MIX* (100 mM); 2,0 µL de *RT Random Primers* (10x); 1,0 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*; e 4,2 µL de água livre de RNase. Para a transcrição reversa e síntese de cDNA o volume final de reação foi de 20 µL (10 µL RNA e 10 µL de mix) e o programa do termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) foi definido para 3 condições: Inicialmente 10 min a 25°C; depois durante 120 minutos a 37°C; e, finalmente por 5 min a 85°C.

2.9.3. RT-qPCR

Para as análises de RT-qPCR foram selecionadas 6 proteínas quantificadas com diferença de expressão no fígado e 5 proteínas com diferença de expressão no pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle. Todas as proteínas selecionadas são apresentadas na Tabela 1, bem como a discriminação do tecido no qual a proteína foi identificada. Os *primers* utilizados nas análises foram sintetizados pela empresa Exxtend Biotecnologia Ltda® (SP, Brasil), com exceção dos *primers* para beta (β)-actina e *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1)*, os quais foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, MO, USA). A sequência de nucleotídeos de cada *primer* se encontra na Tabela 2.

A quantificação de mRNA das proteínas escolhidas foi realizada em duplicata a partir do cDNA diluído 4 vezes (10µL de cDNA:30 µL de água), utilizando-se o instrumento Eppendorf Realplex4 Mastercycle (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e SsoFastEvaGreen (Bio-Rad®), de acordo com a instrução do fabricante. Para cada mRNA quantificado, cada poço da placa de PCR continha 2µL da amostra de cDNA diluído e 8 µL de um mix composto por 5 µL de SsoFastEvaGreen® Supermix, 0,05 µL de *primerforward* (625 nM), 0,05 µL de *primer reverse* (625 nM) e 2,9 µL de água livre de RNase (*Nuclease-Free Water*, Qiagen®).

As condições para os ciclos de PCR foram: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 72°C por 60 s. A quantificação relativa da expressão dos genes de interesse foi determinada por normalização com os genes constitutivos β-actina, para os genes expressos pelo fígado, e *Hprt1*, para os genes expressos pelo pâncreas. A expressão relativa dos mRNAs foi determinada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 – Proteínas selecionadas para a validação por RT-qPCR.

Tecido	Proteína	Gene
Fígado	<i>Glucokinase activity_related sequence 1 (Predicted)</i>	<i>Gykl1</i>
	<i>Succinatedehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfursubunit_mitochondrial</i>	<i>Sdhb</i>
	<i>Aldo-keto reductase family 1 member</i>	<i>Akr1c2</i>
	<i>Ubiquinone biosynthesis protein COQ9_mitochondrial</i>	<i>Coq9</i>
Pâncreas	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_mitochondrial oxidase 2</i>	<i>Hmgcs2</i>
	<i>Insulin-1</i>	<i>Ins1</i>
	<i>Insulin-2</i>	<i>Ins2</i>

Tabela 3 – Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para a quantificação de mRNA dos genes selecionados.

Gene	Sequência <i>forward</i> 5'-3'	Sequência <i>reverse</i> 5'-3'
<i>Gykl1</i>	AGAGAAGGATGGGTGGAGCA	ACTATGGTCGTTTCCCGCTG
<i>Sdhb</i>	TTTTCGGCTACGGCT	CCATCGGTCCACACTTATT
<i>Akr1c2</i>	CAAACCTCCAGCCTTGATTGC	CCGCAAATTTCTGTTTCAGGTC
<i>Coq9</i>	CAGCATTCTGAGACACAGGG	ATGGTCAGGCACAACTCTAG
<i>Hmgcs2</i>	CAACTTATACAAGGGTCTAGAGGC	TGTGGAGAGGTAAAGGGAGG
<i>Ins2</i>	CCCAGGCTTTTGTCAAACAG	CACCCAGCTCCAGTTGTG
<i>Ins1</i>	ATCTTCAGACCTTGGAAGCTG	GGCTTTATTTCATTGCAGAGGG
<i>β-actina</i>	CACTTTCTACAATGAGCTGCG	CTGGATGGCTACGTACATGG
<i>Hprt1</i>	GTCCCAGCGTCGTGATTAG	GAGCAAGTCTTTCAGTCCTG

2.10. Análise Estatística

Os dados obtidos a partir da avaliação do ganho de massa corporal dos animais, assim como nos TTG e TTI e nas análises bioquímicas foram submetidos à análise estatística no software GraphPadPrism® versão 6.0 e estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises de ganho de massa corporal foram realizadas através de análises de variância (ANOVA) de duas vias, seguidas de pós-

teste de *Bonferroni*. Para o TTG e TTI foram realizadas ANOVA de duas vias seguidas por pós-teste de *Dunnett*, para observar a diferença estatística dos grupos expostos *versus* grupo controle, e pós-teste de *Bonferroni*, a fim de obter a diferença estatística entre os grupos de animais expostos. Para as análises bioquímicas foram realizadas ANOVA de uma via, seguidas por pós-teste de *Dunnett* e de *Bonferroni*. Para obter a significância estatística das alterações proteicas do fígado, a abundância normalizada média foi analisada pelo teste t de Student, através do software GraphPadPrism® versão 6.0. Para os resultados acerca da quantificação de proteínas do pâncreas foi aplicado o teste ANOVA de uma via, realizado pelo software *Progenesis® QI for Proteomics*. Para as análises de expressão relativa de mRNA (RT-qPCR) foram realizadas ANOVA de uma via, seguidas por pós-teste de *Tukey*. Valores de p menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$) foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da variação da massa corporal dos animais

Com relação a massa corporal dos animais expostos à menor dose de bisfenóis, é possível observar que até a 16ª semana, não houve diferença estatística entre os grupos. No entanto, a partir da 17ª semana até o final do tratamento, observa-se que o grupo de animais exposto à mistura de BFA + BFS ganhou significativamente mais massa quando comparado aos grupos controle e BFA (Figura 1). Embora possa ser verificada uma tendência de maior ganho de massa no grupo exposto ao BFS em relação ao grupo controle e BFA, não houve diferença significativa. Ainda, é importante citar que um animal pertencente ao grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA morreu durante a 12ª semana de protocolo experimental.

Figura 1. Média $\pm$ EPM do ganho de massa dos animais do grupo controle e grupos expostos a 50 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS ao longo do estudo. ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni*. * $p \leq 0,05$ versus controle; ** $p \leq 0,01$ versus controle, # $p \leq 0,05$ versus BFA 50, # $p \leq 0,01$ versus BFA 50.

Quando avaliados os animais tratados com a maior dose de bisfenóis, foram observadas diferenças significativas no ganho de massa para o grupo tratado com 500 µg/kg/dia de BFS a partir da 6ª semana de tratamento. Nota-se que este grupo apresentou diferenças significativas quando comparado ao grupo controle (diferenças observadas entre a 6ª e a 20ª semana), quando comparado ao grupo BFA 500 (diferenças significativas entre a 12ª e a 16ª semana) e quando comparado com o

grupo BFA + BFS 500 (diferenças observadas entre a 12^a e a 17^a semana), visualizados na Figura 2.

Figura 2. Média $\pm$ EPM do ganho de massa dos animais do grupo controle e grupos expostos a 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS ao longo do estudo. ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni*. * $p \leq 0,05$ versus controle, ** $p \leq 0,01$ versus controle, *** $p \leq 0,001$ versus controle, # $p \leq 0,05$ versus BFA 500, ## $p \leq 0,01$ versus BFA 500, ° $p \leq 0,05$ versus BFA + BFS 500, °° $p \leq 0,01$ versus BFA + BFS 500, °°° $p \leq 0,001$ versus BFA + BFS 500.

Estudos epidemiológicos têm mostrado uma correlação positiva entre a exposição ao BFA e a obesidade em seres humanos (TRANSANDE et al., 2012), enquanto estudos experimentais *in vivo* mostraram que a exposição perinatal a esse contaminante pode levar a um aumento na massa corporal da prole dos animais expostos (WEI et al., 2011; JIANG et al., 2014; GARCÍA-AREVALO, 2014).

Em estudo realizado por Wei e colaboradores (2011), ratos machos *Wistar* expostos a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA durante o período perinatal começaram a apresentar um ganho de massa maior quando comparados a animais controle a partir da 19^a semana de vida. Da mesma forma, camundongos OF-1 expostos a 10 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA durante a gestação tiveram um aumento no ganho de massa corporal a partir da 18^a semana quando comparados ao grupo controle, sendo que esse aumento passou a ser significativo somente na 28^a semana de vida dos animais (GARCÍA-AREVALO, 2014).

Contrariamente ao que foi observado nestes estudos, nos quais foi avaliada a exposição ao contaminante BFA durante o período de desenvolvimento embrionário, Marmugi e colaboradores (2014) não observaram aumento significativo no ganho de massa em camundongos machos CD1 tratados com água contaminada com BFA

durante período de 8 meses (exposição crônica) em nenhuma das doses avaliadas (5 a 5000 µg/kg/dia), apesar de a exposição ter levado ao desenvolvimento de hiperglicemia, hipercolesterolemia e intolerância à glicose nos animais. No presente estudo, também não foram observadas diferenças significativas em relação ao ganho de massa corporal no período de 20 semanas de exposição para os animais tratados com 50 ou 500 µg/kg/dia de BFA. Entretanto, pôde ser observado um aumento significativo na massa corporal do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA e BFS nas últimas semanas de tratamento, assim como para os animais expostos à somente BFS na maior dose (500 µg/kg/dia). Houve, ainda, uma tendência a maior ganho de massa no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS.

Embora dados epidemiológicos que evidenciem uma associação entre a exposição ao BFS e o desenvolvimento de obesidade ainda sejam escassos, alguns estudos recentes demonstram que a exposição a este contaminante pode contribuir para o desenvolvimento de obesidade. Em estudo com 1,521 participantes adultos norte-americanos (20 anos ou mais) mostrou que as concentrações urinárias de BFS eram mais elevadas em adultos obesos, quando não considerados fatores demográficos, socioeconômicos, estilo de vida e concentrações urinárias de creatinina (LIU et al., 2017). Dados experimentais *in vivo* também corroboram os resultados do presente estudo, uma vez que a exposição perinatal e crônica (até 22 semanas após o nascimento) a 1.5 e 50 µg de BFS por kg por dia potencializou a obesidade induzida por uma dieta rica em gorduras em camundongos C57BL machos (IVRY DEL MORAL et al., 2016) e aumentou o peso corpóreo de larvas de Zebrafish (expostas a 1 e 100 µg/L de BFS) 15 dias após a fertilização (Wang et al., 2018). Este último estudo demonstrou que os efeitos obesogênicos do BFS estavam associados com o aumento no acúmulo visceral de lipídios, suprarregulação da expressão de genes relacionados à síntese de novo de triglicérides no fígado e promoção do acúmulo de lipídios em larvas (também após a exposição à 1 e 100 µg/L de BFS) (Wang et al., 2018).

Os resultados do presente estudo também mostram que a exposição ao BFS levou a maiores efeitos obesogênicos quando comparado ao BFA, em condições de exposição crônica aos contaminantes. Alguns estudos já haviam demonstrado que o BFS é potencialmente mais tóxico que o BFA quando avaliado o potencial adipogênico. Por exemplo, estudos *in vitro* mostraram que o BFS foi mais potente que o BFA na promoção da adipogênese nos pré-adipócitos 3T3-L1 (AHMED E ATLAS,

2016), bem como na redução da lipólise em células 3T3-L1 diferenciadas (HÉLLIES-TOUSSAINT et al., 2014). O aumento da deposição de gordura e a redução da lipólise nos tecidos adiposo e visceral é uma desregulação do metabolismo lipídico que poderia explicar os efeitos obesogênicos observados após a exposição ao BFS no presente estudo. Tal hipótese é sustentada pelo fato de que estudos anteriores já haviam reportado, para o análogo BFA, que o aumento da massa corporal de animais adultos expostos durante o período embrionário e lactação estava associado com o aumento do tecido adiposo branco e da porcentagem de gordura corporal e hepática dos animais expostos (WEI et al., 2011; JIANG et al., 2014). Portanto esta hipótese deve ser melhor investigada em estudos futuros.

Os resultados obtidos mostram a importância de se realizar estudos toxicológicos *in vivo* que avaliem a toxicidade da exposição a doses baixas do contaminante BFS e seus efeitos em funções e parâmetros metabólicos e/ou fisiológicos, ainda pouco estudados. Dados toxicológicos acerca dos efeitos do BFS ainda são escassos e não existem restrições quanto ao seu uso (ELADAK et al., 2015). Estudos como este serviriam como base para o estabelecimento de valores de referência para essa substância.

3.2. Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Para verificar a sensibilidade à insulina, foram realizados testes de tolerância à insulina e à glicose após 15 horas de jejum, na 18ª e na 19ª semana de protocolo experimental, com intervalo de 7 dias entre os testes.

Os valores de glicemia obtidos antes e após a administração de 2 g/kg de solução de glicose i.p. em todos os grupos de animais foram utilizados para construir as curvas glicêmicas apresentadas nas Figuras 3A e 3B, as quais representam respectivamente, as curvas glicêmicas para os animais tratados com a menor dose de bisfenóis (50 µg/kg/dia) e para os animais tratados com a maior dose de bisfenóis (500 µg/kg/dia).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos para ambas as doses avaliadas, verificou-se uma tendência de maior índice glicêmico nos animais tratados com 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle em todos os tempos avaliados. Também houve uma tendência nos animais tratados com 50 µg/kg/dia de BFS de apresentarem maior glicemia quando comparados ao grupo

controle no tempo 30 minutos após a i.p. (Figura 3A). Além disso, os animais tratados com 500 µg/kg/dia de BFA apresentaram valores de glicemia elevados em relação ao grupo controle nos tempos 30 e 60 minutos após a administração da solução de glicose, embora também não tenham sido observadas diferenças significativas entre esses grupos (Figura 3B).

Figura 3. Média $\pm$ EPM da concentração de glicose no sangue obtida após realização do teste de tolerância à glicose (TTG). Os testes foram realizados após 19 semanas do protocolo experimental. **(A)** Curvas com as concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. **(B)** Curvas com as concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. ANOVA 2 vias, $p \leq 0,05$.

Os resultados obtidos com o teste de tolerância à insulina (TTI) foram utilizados para montar as curvas de decaimento da concentração plasmática de glicose. Em relação a este teste, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (Figuras 4A e 4B).

Figura 4. Média $\pm$ EPM da concentração de glicose no sangue obtida após realização do teste de tolerância à insulina (TTI). Os testes foram realizados após 18 semanas do protocolo experimental. **(A)** Curvas de decaimento das concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 μ g/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. **(B)** Curvas de decaimento das concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 500 μ g/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. ANOVA 2 vias, $p \leq 0,05$.

Tanto o TTG quanto o TTI são usados como testes de triagem primários para determinar possíveis alterações no metabolismo de glicose. Apesar de ambos os testes medirem alterações nas concentrações de glicose sanguíneas durante o intervalo de tempo, os resultados podem indicar diferentes achados. Os resultados obtidos a partir do TTG são determinantes para se avaliar a secreção e ação da insulina no animal, enquanto a curva de decaimento da glicose obtida a partir do TTI é utilizada para se avaliar a ação da insulina no organismo do animal como um todo (AYALA et al., 2010).

Embora o TTG e o TTI sejam amplamente utilizados na literatura para avaliar a homeostase da glicose em roedores e apesar dos esforços despendidos em diversos estudos recentes no sentido de aperfeiçoar e padronizar os protocolos e técnicas experimentais entre os estudos, ainda não existe um consenso quanto aos protocolos específicos a serem utilizados para estes testes (ANDRIKOPOULOS et al., 2008; BOWE et al., 2014).

Na literatura é comum encontrar estudos metabólicos que realizam períodos prolongados de jejum, que variam de 14 a 18 horas (jejum *overnight*), assim como estudos que realizam um período de jejum mais curto, de 5 a 6 horas. Os períodos de jejum prolongado podem causar estresse aos animais, perda de massa corporal e, mais especificamente, aumentar o processo de utilização de glicose estimulada por insulina quando o animal está em estado de hipoglicemia, o que pode levar a uma má interpretação dos resultados (MCGUINNESS et al., 2009; AYALA et al., 2010).

Dessa forma, com o intuito de verificar se o jejum prolongado realizado nos experimentos iniciais de TTG e TTI (jejum de 15 horas) possa ter sido um fator limitante que prejudicou a observação da verdadeira intolerância à glicose e da resistência à insulina nos animais expostos aos bisfenóis, foi realizado um segundo estudo, denominado Estudo II, para o qual foram selecionados somente os grupos controle e tratados com a menor dose (50 µg/kg/dia) de bisfenóis, a fim de repetir o TTG e o TTI, sendo estipulado um tempo de jejum de 12 horas (jejum *overnight*) para o TTG e um tempo de jejum de 4 horas (jejum pela manhã) para o TTI.

Além disso, para o Estudo II foi considerada a média de peso corporal de cada grupo separadamente para o cálculo e preparo de cada uma das soluções (BFA, BFS e BFA + BFS) a serem adicionadas na água de beber visto que, no Estudo I, verificou-se uma grande variação entre as massas corporais dos grupos estudados. Os motivos pelos quais foram selecionados somente os grupos controle e os expostos às

menores doses de bisfenóis para este novo estudo foram: a evidência, a partir de estudos prévios, de que o BFA apresenta curvas DRNM, com maiores efeitos observados após a exposição às menores doses (ANGLE et al. 2013), as pequenas variações verificadas no estudo inicial de TTG para as menores doses dos bisfenóis e a estima ética de se reduzir o número de animais em experimentos.

Ademais, os dados obtidos a partir da avaliação da exposição à baixas doses dos contaminantes são mais relevantes visto que os seres vivos estão ambientalmente expostos à baixas concentrações destes compostos e estudos anteriores reportaram que a exposição à doses inferiores que 50 µg/kg/dia de BFA são mais efetivas que doses elevadas para o estudo das alterações da homeostase metabólica em diferentes modelos experimentais *in vivo* (WEI et al., 2011, ANGLE et al., 2013; MARMUGI et al., 2012).

3.3. Comparação dos resultados de ganho de massa corporal e TTG/TTI entre os Estudos I e II e a literatura

Assim como realizado no Estudo I, o peso corporal e a ingestão de água dos animais foram monitorados semanalmente e os testes de TTI e TTG foram conduzidos, respectivamente, na 18ª e na 19ª semana do protocolo experimental. Os resultados acerca do ganho de massa corporal dos animais utilizados no Estudo II estão representados na Figura 5. Nota-se que o grupo tratado com BFA + BFS (50 µg/kg/dia) obteve significativo maior ganho de massa quando comparado com o grupo controle, a partir da 5ª semana de tratamento até o final do protocolo experimental (20ª semana). Paralelamente, foi possível verificar diferenças significativas entre o grupo exposto ao BFS e o grupo controle entre a 15ª e a 19ª semana de tratamento. Importante ressaltar que o gráfico da variação da massa corporal obtido para o Estudo II seguiu o mesmo padrão verificado para o gráfico do Estudo I, no que diz respeito aos animais expostos à menor dose de bisfenóis (50 µg/kg/dia).

Figura 5. Média $\pm$ EPM do ganho de massa dos animais do grupo controle e grupos expostos a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS (Estudo II). ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni* * $p \leq 0,05$ versus controle, ** $p \leq 0,01$ versus controle, *** $p \leq 0,001$ versus controle.

Os resultados obtidos a partir da realização do TTG no Estudo II, também realizado na 19ª semana de protocolo experimental, porém com jejum *overnight* de apenas 12 horas, foram utilizados para construir a curva glicêmica apresentada na Figura 6. Neste novo estudo verificou-se que todos os grupos expostos aos bisfenóis apresentaram valores de glicemia aumentados durante o experimento, sendo possível observar diferenças significativas para todos os grupos de animais quando comparados ao controle nos tempos 30 e 60 minutos. Para o grupo exposto à mistura de BFA + BFS, o qual apresentou os maiores valores de glicemia durante o experimento, verificou-se diferença significativa também no tempo 90 minutos em relação ao grupo controle.

Figura 6. Média $\pm$ EPM das concentrações de glicose sanguíneas obtidas após realização do teste de tolerância à glicose (TTG). Curvas com as concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS (Estudo II). ANOVA 2 vias seguida do teste de *Bonferroni*. * $p \leq 0,05$ versus controle, ** $p \leq 0,01$ versus controle, *** $p \leq 0,001$ versus controle.

Diversos estudos *in vivo* demonstraram, de forma semelhante ao observado no Estudo II, que a exposição ao BFA pode alterar a homeostase da glicose, desencadeando principalmente a intolerância à glicose, um dos componentes da síndrome metabólica (ALONSO-MADALENA et al., 2006; MOON et al., 2015; GALYON et al., 2017).

Galyon e colaboradores (2017) conduziram TTG na 6^a e 24^a semanas de vida na prole de fêmeas de ratos *Sprague Dawley* expostos ao BFA durante a gestação (aproximadamente 239 $\mu\text{g/kg/dia}$) e lactação (aproximadamente 466 $\mu\text{g/kg/dia}$). Em ambas as idades, a administração de glicose gerou um significativo aumento na glicemia dos animais, que atingiu valores máximos entre 15 e 30 minutos após a injeção.

Da mesma maneira, Angle e colaboradores (2013) verificaram na prole de animais tratados com diferentes doses de BFA (5 a 5.000 $\mu\text{g/kg/dia}$) uma significativa diminuição na tolerância à glicose na 18^a semana de vida, não sendo possível verificar, entretanto, diferenças significativas no que diz respeito a resistência à insulina para os grupos expostos as doses de 50 e 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ quando submetidos ao TTI.

Embora os diferentes estudos reportem resultados semelhantes para o TTG após exposição à baixas doses de BFA, o mecanismo de ação por meio do qual esse desregulador endócrino prejudica a homeostase da glicose ainda não está bem definido. Alguns estudos com o intuito de elucidar os principais mecanismos mostram que a desregulação no metabolismo energético pode ser resultado de alterações fisiopatológicas como o aumento excessivo da estimulação das células beta(β)-pancreáticas.

O BFA pode atuar da mesma maneira que o 17 β -estradiol no pâncreas endócrino, um tecido essencial na manutenção da homeostase da glicose, ligando-se ao receptor de estrogênio α (ER α) no citoplasma das células β -pancreáticas e ativando fatores de transcrição e proteínas quinases que sinalizam para o aumento na produção e secreção de insulina, podendo acarretar hiperinsulinemia pós-prandial e resistência à insulina (ALONSO-MAGDALENA, et al., 2006, 2008; NADAL et al., 2009).

Outro possível mecanismo observado em células β -pancreáticas é o aumento na frequência de abertura dos canais de cálcio (Ca⁺²), o que leva a um maior influxo de Ca⁺² intracelular, desencadeando a secreção de insulina induzida por glicose. Esse mecanismo pode ser ativado quando xenoestrógenos como o BFA se ligam, em baixas doses, a um receptor de estrogênio não-clássico localizado na membrana plasmática da célula (ncmER). A ativação do ncmER ativa uma via intracelular que leva a um aumento na concentração intracelular de cGMP e consequente ativação da proteína quinase dependente de cGMP (PKG) a qual, por processo dependente de fosforilação, estimula a secreção de insulina (NADAL et al., 2000; ROPERO et al. 2008).

Além disso, o estudo de Galyon e colaboradores (2017) mostrou que a exposição ao BFA diminuiu a abundância de proteínas transportadoras de glicose GLUT2 e GLUT4 respectivamente no fígado e músculo esquelético na prole das fêmeas *Sprague Dawley* tratadas com o BFA, assim como levou ao aumento na abundância da molécula precursora do receptor de insulina no fígado dos animais, proteínas importantes na via metabólica de sinalização da insulina, o que contribuiu para a intolerância à glicose.

Os resultados obtidos no Estudo II para o TTI foram utilizados para construir a curva de decaimento da glicose apresentada na Figura 7. Embora houvesse mudança

no protocolo experimental (jejum de 4 horas), não foram observadas diferenças significativas entre os animais.

Figura 7. Média $\pm$ EPM das concentrações de glicose sanguíneas obtida após realização do teste de tolerância à insulina (TTI). Curvas de decaimento das concentrações de glicose sanguíneas obtidas para os grupos controle e animais tratados com 50 μ g/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS (Estudo II). ANOVA 2 vias seguida de teste de *Bonferroni*, $p \leq 0,05$.

Um estudo recente, realizado por García-Arevalo e colaboradores (2016), submeteu camundongos machos OF-1 expostos a 10 ou 100 μ g/kg/dia de BFA durante o período gestacional (dias 9-16) aos TTG e TTI no 30º dia após o nascimento. Para ambos os experimentos, independentemente da dose a qual os animais foram expostos, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

Em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, no qual foi avaliada somente a exposição à dose de 10 μ g/kg/dia de BFA, TTG e TTI foram realizados na prole dos animais em dois momentos distintos (17ª e 28ª semanas de vida). No primeiro momento, os animais expostos ao BFA apresentaram somente uma tendência a serem intolerantes à glicose e não foram observadas diferenças estatísticas para o TTI. Entretanto, no segundo momento, instalou-se a intolerância à glicose e os animais apresentaram uma diminuição na sensibilidade à insulina (TTI), apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas para este último (GARCÍA-AREVALO et al., 2014).

Alonso-Magdalena et al. (2010) mostraram que animais expostos durante o desenvolvimento intrauterino a 100 µg/kg/dia de BFA apresentavam intolerância à glicose aos 6 meses de vida, não apresentando diminuição na sensibilidade à insulina quando submetidos ao TTI. Entretanto, os animais expostos à menor dose de BFA (10 µg/kg/dia) foram intolerantes à glicose e resistentes à insulina quando comparados ao controle no mesmo tempo de exposição.

Os resultados para o TTI observados em estudos prévios, assim como os resultados obtidos para ambos os testes de tolerância à insulina realizados no presente estudo, permitem concluir que o desenvolvimento de resistência à insulina em animais machos adultos depende de diversos fatores, tais como idade, tempo de exposição (período gestacional ou exposição crônica durante toda a vida) e dose às quais os animais foram expostos. É possível também afirmar que na maioria dos estudos a exposição ao contaminante BFA desencadeia efeitos relacionados à síndrome metabólica tais como: maior ganho de peso, intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia e alterações na atividade de células β-pancreáticas (ALONSO-MADALENA et al., 2010; BATISTA et al., 2012; VOM SAAL et al., 2012; ANGLE et al. 2013).

Além disso, García-Arevalo e colaboradores (2016) propuseram que a hiperinsulinemia, observada no estado alimentado e induzida pela exposição ao BFA no início da vida dos animais, pode estar relacionada com o aumento da massa de células β-pancreáticas e desenvolvimento tardio de resistência à insulina nos animais expostos ao desregulador endócrino.

O Estudo II evidenciou que a exposição crônica a 50 µg/kg/dia de BFA e BFS, tanto separadamente ou em associação, levou ao desenvolvimento de intolerância à glicose, sendo que para o grupo de animais expostos à mistura de ambos os compostos foram observados os maiores índices glicêmicos durante o experimento, sustentados por tempo maior que nos grupos expostos aos contaminantes de maneira individual (até 90 minutos após a injeção de glicose). Esses resultados evidenciam que a associação dos toxicantes pode desencadear um efeito mais drástico e, conseqüentemente, levar a maiores prejuízos à saúde dos animais. Estudos como este, que avaliam o efeito da exposição a misturas de substâncias são muito relevantes na toxicologia, uma vez que os seres vivos estão ambientalmente expostos a misturas complexas de contaminantes e não a um composto de forma isolada.

3.4. Análise dos parâmetros bioquímicos

Após serem submetidos a jejum de 10 horas, os animais expostos durante todo o período experimental a 50 µg/kg/dia de BFA apresentaram-se hiperglicêmicos ($109 \pm 4,1$; $p \leq 0,01$) quando comparados ao grupo controle ($90 \pm 1,2$) o que pode ser observado na Figura 8. Diferenças significativas também foram observadas entre os grupos BFA 50 e BFA + BFS 50 ($p \leq 0,05$), assim como entre BFA 50 e todos os grupos experimentais expostos à maior dose dos bisfenóis ($p \leq 0,001$).

Figura 8. Concentrações de glicose no sangue do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Bonferroni*. ** $p \leq 0,01$ versus controle; # $p \leq 0,05$ versus BFA+BFS 50; ### $p \leq 0,001$ versus BFA 500, BFS 500 e BFA+BFS 500.

Os estudos que avaliam a exposição ao BFA e sua relação com o desenvolvimento de hiperglicemia em animais são contraditórios, entretanto, alguns estudos já evidenciaram que existe uma relação entre a exposição ao BFA e o desenvolvimento de hiperglicemia em animais experimentais, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo (GARCÍA-AREVALO et al., 2014, SONG et al., 2014; MARMUGI et al., 2014).

García-Arévalo e colaboradores (2016) mostraram que a exposição às doses de 10 e 100 µg/kg/dia de BFA durante a gestação não levaram ao aumento na concentração de glicose na prole dos camundongos OF-1 aos 30 dias de vida. No entanto, seu estudo anterior (GARCÍA-ARÉVALO et al., 2014) mostrou que a

exposição ao BFA durante a gestação (10 µg/kg/dia) elevou de forma significativa as concentrações de glicose na 17ª e 28ª semana de vida na prole dos animais.

Fang e colaboradores (2015) reportaram um aumento nas concentrações de glicose sanguíneas em camundongos C57BL6 machos expostos durante 14 dias a 100 µg/kg/dia de BFA. A hiperglicemia foi observada juntamente com hiperinsulinemia, demonstrando que os animais apresentaram uma diminuição na sensibilidade à insulina. Paralelamente, eles observaram redução na abundância de proteínas pertencentes à via de sinalização da insulina, assim como de proteínas transportadoras de glicose no tecido cerebral dos animais expostos, possíveis mecanismos através dos quais o contaminante poderia estar interferindo na homeostase da glicose.

Estes estudos mostram que o desenvolvimento da hiperglicemia nos animais também pode ser dependente de fatores tais como: dose, idade e período de exposição dos animais (exposição durante a gestação ou após o nascimento). No presente estudo, a intolerância à glicose observada para os animais tratados com 50 µg/kg/dia de BFA (Figura 6), assim como o aumento observado nas concentrações sanguíneas de glicose pós-jejum, demonstram que a exposição ao BFA alterou a homeostase da glicose após período crônico de exposição. Os dados apresentados poderiam sugerir que os animais expostos ao BFA apresentam uma tendência a desenvolver o diabetes *mellitus* por apresentarem sintomas de um estado pré-diabético.

A exposição aos bisfenóis foi capaz de alterar o perfil lipídico dos animais expostos. Os grupos que receberam 50 µg/kg/dia de BFA e BFA + BFS apresentaram aumento significativo das concentrações séricas de CT quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0,05$), o que pode ser observado na Figura 9 e, de maneira semelhante, as concentrações de HDL-C também se apresentaram significativamente aumentadas para esses mesmos grupos (Figura 10). Para este último parâmetro, também foi possível observar um aumento significativo para o grupo exposto a 500 µg/kg/dia de BFA ($p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Figura 9. Concentrações de colesterol total no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Dunnnett*. * $p \leq 0,05$ versus controle.

Figura 10. Concentrações de HDL colesterol no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Dunnnett*. * $p \leq 0,05$ versus controle; ** $p \leq 0,01$ versus controle.

No que diz respeito às concentrações séricas de LDL-C, não foram detectadas alterações significativas para os grupos expostos às diferentes doses de BFA ou BFA + BFS (Figura 11), entretanto em relação à exposição ao BFS foi possível verificar um aumento significativo das concentrações desse parâmetro bioquímico para os animais expostos à dose de 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ ($14 \pm 0,7$; $p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($10 \pm 1,4$).

Figura 11. Concentrações de LDL colesterol no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via seguida de teste de *Dunett* * $p \leq 0,05$ versus controle.

O presente estudo corrobora com estudos anteriores, demonstrando a existência de uma relação entre a exposição ao BFA e o desenvolvimento de hipercolesterolemia em animais que foram expostos tanto durante o período embrionário e lactação (MIYAWAKI et al., 2007; SOMM et al., 2009; WEI et al., 2011), quanto após o desmame, de forma aguda e crônica (MARMUGI et al., 2012; 2014).

Marmugi e colaboradores (2014) realizaram um estudo que avaliou a exposição à diferentes doses de BFA em camundongos CD1 machos durante um período de 8 meses. Neste estudo eles observaram um aumento nas concentrações sanguíneas de CT para a exposição à todas as doses avaliadas (5, 50, 500 e 5.000 µg/kg/dia), assim como das concentrações de HDL-C e LDL-C em resposta a exposição às doses de 5 e 500 µg/kg/dia de BFA. Estes achados se correlacionaram com o aumento na expressão de enzimas hepáticas envolvidas na síntese de colesterol, assim como com o aumento da síntese de colesterol neste órgão.

O mesmo grupo de pesquisadores (MARMUGI et al., 2012) já havia evidenciado o impacto da exposição à dose estipulada como IDA pela USEPA para o BFA no transcriptoma hepático de camundongos CD1 machos expostos durante 28 dias às mesmas doses de BFA (5 – 5.000 µg/kg/dia). A exposição a 50 µg/kg/dia levou a um aumento na expressão de genes envolvidos na síntese de lipídeos, tais como ácidos graxos monoinsaturados, triglicérides e colesterol, o que pôde ser confirmado com o aumento no acúmulo de triglicérides e ésteres de colesterol no fígado dos

animais tratados tanto com a dose de 50 $\mu\text{g/kg/dia}$, quanto com 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA (mesmas doses avaliadas no presente estudo).

As alterações nas concentrações séricas de CT, assim como nas concentrações de HDL-C e LDL-C podem estar relacionadas com alterações na função hepática, uma vez que esse órgão possui papel importante na regulação do metabolismo energético, principalmente no que diz respeito à biossíntese e excreção de lipídeos. A desregulação deste órgão contribui para o fenótipo de obesidade associado com o desenvolvimento de diabetes tipo II (PORRECA et al., 2017). Além disso, a exposição ao BFA pode prejudicar a atividade dos hepatócitos através de diversos mecanismos, tais como alterações na expressão de genes envolvidos em glicólise e lipogênese, disfunção na atividade mitocondrial e apoptose (KIRCHNER et al., 2016; PORRECA, et al., 2017).

Em relação à quantificação de TG no soro dos animais, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre os grupos estudados, foi observada uma tendência ao aumento da concentração sérica para todos os grupos expostos à menor dose de ambos os bisfenóis, assim como para os grupos expostos a 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFS e BFA + BFS, conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12. Concentrações de triglicérides no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA uma via, $p \leq 0,05$.

Alonso-Magdalena e colaboradores (2010) mostraram que a exposição à doses tão baixas quanto 10 ou 100 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA durante a gestação levou ao aumento significativo na concentração plasmática de TG em fêmeas grávidas de

camundongos OF-1, 4 meses após o parto. Ademais, foi observada uma tendência ao aumento nas concentrações de TG plasmático nas proles das fêmeas expostas, aos 6 meses de vida, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo para os animais expostos cronicamente aos bisfenóis.

No estudo de Wei e colaboradores (2011), entretanto, foi observado um aumento na concentração sérica de TG na prole de ratos *Wistar* expostos a 50 µg/kg/dia após 27 semanas de gestação, sendo que esse aumento se correlacionou com aumento no peso corpóreo e na porcentagem de gordura corporal dos animais. Estes achados evidenciam uma relação entre a exposição à baixas doses de BFA e a elevação nas concentrações séricas de TG na idade adulta dos animais.

Jiang e colaboradores (2014) mostraram a existência de relação entre a exposição perinatal a 40 µg/kg/dia de BFA em ratos *Wistar* e o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Às 26 semanas de vida, os animais apresentaram concentrações elevadas de TG e ácidos graxos no soro, acúmulo de TG no fígado, esteatose hepática, diminuição na função mitocondrial hepática e suprarregulação de genes relacionados com biossíntese e metabolismo de lipídeos no fígado.

No presente estudo verificou-se que os animais expostos à ambos bisfenóis apresentaram um aumento nas concentrações de TG no soro, embora as alterações não sejam estatisticamente significativas. Este aumento também poderia estar relacionado com o aumento na biossíntese de lipídeos no fígado, principalmente de ácidos graxos, moléculas precursoras do triacilglicerol. O aumento de TG, assim como o aumento na concentração sérica do CT e suas frações, evidencia o desenvolvimento de dislipidemias nos animais expostos aos contaminantes.

Não houve diferenças estatísticas nas concentrações séricas das enzimas hepáticas AST e ALT entre os grupos (Figuras 13 e 14), o que permite concluir que tanto a exposição crônica ao BFA ou ao BFS, assim como a associação entre ambos os compostos, não foi capaz de causar dano significativo aos hepatócitos dos animais em estudo, uma vez que valores alterados para ambas as enzimas são indicativos de lesão hepática.

Figura 13. Atividade da enzima hepática aspartato aminotransferase no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, $p \leq 0,05$.

Figura 14. Atividade da enzima hepática alanina aminotransferase no soro do grupo controle e dos grupos expostos às doses de 50 e 500 µg/kg/dia de BFA, BFS e BFA + BFS. Resultados expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via, $p \leq 0,05$.

3.5. Análise Proteômica

3.5.1. Seleção de amostras de fígado e pâncreas para a análise proteômica

Para as análises proteômicas foram selecionados 2 grupos expostos à menor dose estudada dos bisfenóis, uma vez que os resultados iniciais obtidos para o teste

de tolerância à glicose e para os parâmetros bioquímicos analisados demonstraram que as alterações metabólicas mais relevantes para o presente estudo ocorreram principalmente nos animais expostos à aproximadamente 50 µg/kg/dia dos bisfenóis, o que sugeriu que a exposição à baixas doses de ambos os compostos poderiam estar desencadeando alterações mais significativas também em nível molecular.

O grupo exposto tanto ao BFA quanto ao BFS não foi selecionado para as análises proteômicas, visto que o objetivo dessa etapa seria estudar as principais alterações proteicas e elucidar os mecanismos moleculares desencadeados tanto pelo BFA como pelo BFS e a co-exposição não permitiria tal avaliação, uma vez que a exposição simultânea aos dois agentes químicos resultaria em alterações desencadeadas por ambos os agentes, impossibilitando a identificação de alterações no proteoma específicas a cada composto químico.

Dessa forma foram selecionadas aleatoriamente amostras de fígado e pâncreas de 3 animais pertencentes ao grupo controle, assim como de 3 animais do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA e 3 animais do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS. Além disso, os experimentos foram conduzidos utilizando duas replicatas técnicas de cada amostra de tecido estudado sendo que a análise proteômica por LC-MS/MS foi realizada em duplicata. Portanto, obteve-se um total de 4 replicatas técnicas para cada animal.

3.5.2. Extração de proteínas totais do fígado e pâncreas

A primeira etapa de preparação da amostra é obtenção dos extratos proteicos. Uma adequada realização dessa etapa e o estabelecimento de um protocolo ideal para o tipo específico de amostra que se pretende estudar são cruciais para obtenção de uma boa reprodutibilidade nas análises proteômicas. No procedimento ideal de extração, as proteínas da amostra de interesse devem estar completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas. Além disso, é importante garantir a remoção de componentes não proteicos, como ácidos nucleicos, assim como a inibição da proteólise durante toda a preparação da amostra, através da adição, logo no início do procedimento de extração, de inibidores de proteases.

Inicialmente, com o objetivo de avaliar a eficiência do procedimento de extração e padronizar um protocolo simples e adequado para o tipo de amostra estudado, foram pesadas aproximadamente 65 a 85 miligramas de tecido hepático

para 250 µL de solução de homogeneização. Para se obter completa solubilização e desnaturação das proteínas foi empregado o CHAPS, um detergente zwitteriônico, e uréia, conhecidamente um agente caotrópico. Além disso, foram utilizados a tiouréia, com o intuito de tornar a solubilização mais eficiente para as proteínas de membrana (RABILLOUD, 1998) e o agente redutor DTT, para quebra das pontes dissulfeto das proteínas.

Apesar da utilização de detergente para lise das células e do uso de um método de lise mais vigoroso, a homogeneização mecânica, não foi possível romper a totalidade do tecido hepático pesado para a extração, o que pôde ser verificado logo após a primeira centrifugação para a troca da solução de homogeneização pelo tampão NH_4HCO_3 com o uso dos dispositivos de filtração na etapa posterior à extração.

Dessa forma, com a finalidade de conseguir aumentar a eficiência da lise celular e atingir uma desagregação completa do tecido, foram necessários diminuir a quantidade de amostra pesada de fígado para 20 a 30 mg de tecido e adicionar 4 ciclos de sonicação em banho de gelo e agitação rápida em vórtex, logo após a homogeneização mecânica do tecido. Tais alterações na etapa de extração foram fundamentais para a obtenção de um extrato protéico livre de tecido intacto e debris celulares. Para as amostras de tecido pancreático, foi possível pesar uma massa maior, entre 40 e 50 mg, visto que esse tecido é menos fibroso e foi mais facilmente rompido que o tecido hepático.

3.5.3. Troca do solvente das amostras para digestão

Com o intuito de prosseguir para a digestão proteolítica e preparar as amostras para a análise proteômica por LC-MS/MS foi necessário realizar a troca da solução de homogeneização contendo CHAPS, uréia, tiouréia e DDT, utilizada na etapa de extração, por uma solução tampão de NH_4HCO_3 50 mM (pH 8,5), uma vez que a uréia, em concentrações elevadas, pode interferir com a digestão enzimática das proteínas e o CHAPS é conhecidamente um contaminante na cromatografia líquida de fase reversa que pode causar supressão iônica no espectrômetro de massas (WESTON et al., 2013; SUN et al., 2014).

Dessa forma, a troca da solução foi realizada utilizando dispositivos para ultrafiltração da amostra, que possuem membranas com tamanho de poros

específicos para reter as proteínas de interesse (5 kDa), os quais também foram utilizados com o intuito de concentrar as amostras. A solução tampão de NH_4HCO_3 50 mM é comumente utilizada com o intuito de aumentar o pH da solução de proteínas, visto que a atividade da enzima tripsina, utilizada para a digestão das mesmas, é máxima em pH 8 (GUNDRY et al., 2009).

3.5.4. Quantificação de proteínas totais dos tecidos

Nas Tabelas 4 e 5 a seguir é possível verificar as concentrações de proteínas presentes nos extratos protéicos analisados a partir dos tecidos hepático e pancreático, respectivamente.

Tabela 4 – Concentrações protéicas dos extratos obtidos a partir de amostras de tecido hepático do grupo controle e dos grupos expostos à 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA e 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFS. Valores expressos como média $\pm$ DP, em mg/mL de cada amostra, obtidos pela leitura em triplicada das mesmas.

Extratos Protéicos	
Amostra	Concentração (mg/ml)
CONTROLE 1.1	1,736 $\pm$ 0,011
CONTROLE 1.2	1,803 $\pm$ 0,023
CONTROLE 2.1	1,747 $\pm$ 0,006
CONTROLE 2.2	1,700 $\pm$ 0,002
CONTROLE 3.1	1,053 $\pm$ 0,005
CONTROLE 3.2	2,326 $\pm$ 0,015
BFA 50 1.1	1,703 $\pm$ 0,006
BFA 50 1.2	2,046 $\pm$ 0,006
BFA 50 2.1	1,427 $\pm$ 0,005
BFA 50 2.2	1,297 $\pm$ 0,009
BFA 50 3.1	1,201 $\pm$ 0,007
BFA 50 3.2	0,938 $\pm$ 0,003
BFS 50 1.1	2,084 $\pm$ 0,028
BFS 50 1.2	1,532 $\pm$ 0,004
BFS 50 2.1	0,877 $\pm$ 0,004
BFS 50 2.2	2,031 $\pm$ 0,004
BFS 50 3.1	1,345 $\pm$ 0,014
BFS 50 3.2	1,902 $\pm$ 0,006

Tabela 5 – Concentrações protéicas dos extratos obtidos a partir de amostras de tecido pancreático do grupo controle e dos grupos expostos à 50 µg/kg/dia de BFA e 50 µg/kg/dia de BFS. Valores expressos como média ± DP, em mg/mL de cada amostra, obtidos pela leitura em triplicada das mesmas.

Extratos Protéicos	
Amostra	Concentração (mg/ml)
CONTROLE 1.1	1,453±0,005
CONTROLE 1.2	1,202±0,006
CONTROLE 2.1	1,837±0,002
CONTROLE 2.2	1,939±0,012
CONTROLE 3.1	1,068±0,014
CONTROLE 3.2	1,238±0,003
BFA 50 1.1	1,192±0,007
BFA 50 1.2	1,632±0,011
BFA 50 2.1	1,316±0,005
BFA 50 2.2	1,793±0,007
BFA 50 3.1	1,838±0,009
BFA 50 3.2	1,417±0,020
BFS 50 1.1	1,318±0,003
BFS 50 1.2	1,525±0,006
BFS 50 2.1	1,020±0,004
BFS 50 2.2	0,899±0,005
BFS 50 3.1	1,641±0,013
BFS 50 3.2	1,143±0,008

Para facilitar a leitura e compreensão do texto, os resultados serão apresentados a seguir para cada um dos tecidos estudados de forma separada. Primeiro serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na análise proteômica de tecido hepático e, posteriormente, serão apresentados e discutidos os resultados da análise proteômica de tecido pancreático.

3.5.5. Identificação e quantificação das proteínas do fígado através do software Progenesis Q1

Para a identificação das proteínas, foi utilizado como base o proteoma da espécie *Rattus norvegicus* (proteome id: UP000002494; disponível em

<http://www.uniprot.org/>). A partir da lista de seqüências de peptídeos fornecida por esse proteoma foi criado, com o auxílio do software *Protein Lynx Global Server* (PLGS), uma nova lista que incluía proteínas reversas, que são seqüências de falsos-positivos (*decoys*). Esta prática é muito utilizada em estudos proteômicos, a fim de estimar a ocorrência de identificações incorretas de proteínas (taxa de falsa descoberta) pelos softwares utilizados na identificação e quantificação (ELIAS e GYGI, 2011).

Dessa forma, foram consideradas inválidas e portanto, excluídas das análises, todas as seqüências reversas identificadas pelo software e proteínas que não foram detectadas em nenhuma das replicatas técnicas e biológicas de um dos grupos analisados. Para as proteínas identificadas, foram calculadas as médias de abundância normalizada para cada um dos grupos estudados, as quais foram obtidas a partir dos valores de abundância normalizada expressos para cada uma das replicatas técnicas e biológicas. Quando o valor de abundância não era detectado para uma dada replicata, este era desconsiderado do cálculo final da média. Somente foram selecionadas para a análise quantitativa proteínas identificadas em todos os animais selecionados para o estudo, ou seja, as proteínas que foram detectadas em 3 ou mais replicatas técnicas obtidas de um único animal.

Inicialmente, foi realizada uma análise comparativa entre o grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA e o grupo controle e entre o grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS e o controle.

Setecentas e sessenta e duas (762) proteínas foram identificadas e quantificadas nos extratos hepáticos obtidos de ratos controle, bem como ratos expostos a 50 µg/kg/dia de BFA e 50 µg/kg/dia de BFS. Além disso foram identificadas 2 proteínas expressas em ambos os grupos expostos aos contaminantes (BFA e BFS), 1 proteína exclusiva ao grupo exposto ao BFA e 1 proteína exclusiva ao grupo exposto ao BFS. O total de proteínas identificado em cada grupo está representado na Figura 15. A análise estatística revelou que 30 proteínas estavam diferencialmente expressas nos extratos hepáticos de animais expostos ao BFA em comparação ao grupo controle, dentre as quais, 10 proteínas estavam suprarreguladas e 20 proteínas estavam subreguladas, como mostrado na Tabela A-1 (ANEXO I). Em relação às proteínas identificadas nos extratos hepáticos de animais expostos à BFS *versus* grupo controle, 34 proteínas estavam diferencialmente expressas. Dentre as proteínas com alteração na expressão, 23 proteínas apresentaram-se

suprarreguladas enquanto 11 proteínas estavam subreguladas (Tabela A-2, ANEXO I). As Tabelas A-1 e A-2 incluem nomes das proteínas e respectivos genes, número de acesso do Uniprot, FC, valor de p do teste t de Student, número de peptídeos totais e únicos identificados para cada proteína e as respectivas funções biológicas, de acordo com o site da Panther. As proteínas que foram encontradas exclusivamente no tecido hepático de animais expostos ao BFA e/ou BFS (não encontradas em animais controle) estão descritas na Tabela A-3 (ANEXO I).

Figura 15. Diagrama de Venn representando todas as proteínas identificadas e quantificadas nos extratos proteicos de tecido hepático obtidos dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA, 50 µg/kg/dia de BFS e/ou do grupo controle.

3.5.6. Características das proteínas identificadas e quantificadas no fígado dos grupos estudados quanto à função molecular e processos biológicos nos quais estão envolvidas.

As proteínas desreguladas após a exposição ao BFA ou BFS em comparação ao grupo controle foram classificadas quanto aos processos biológicos em que estão envolvidas e suas respectivas funções moleculares, de acordo com o banco de dados online Panther. Em relação à classificação quanto aos processos biológicos, a maioria das proteínas diferencialmente expressas estavam envolvidas em processos metabólicos (BFA: 36% e BFS: 39%) e em processos celulares (BFA: 34% e BFS: 37%), seguidos por localização (BFA: 7%, BFS: 8%), biogênese ou organização de componentes celulares (BFA: 5%, BFS: 6%) e resposta à estímulos (BFA: 5%, BFS: 4%). Uma porcentagem menor de proteínas foi distribuída em processos de organismos multicelulares, processos de desenvolvimento, regulação biológica, adesão biológica e processos do sistema imune, conforme mostrado nas Figuras 16A

e 17A. A distribuição de acordo com as funções moleculares das proteínas diferencialmente expressas evidenciou que a exposição a ambos os contaminantes desregulou principalmente proteínas com atividade catalítica (BFA: 69% e BFS: 52%), atividade de ligação (BFA: 21% e BFS: 30 %) e, em menor extensão, proteínas com atividade de molécula estrutural (BFA: 5% e BFS: 7%), como mostram as Figuras 16B – a qual corresponde à classificação quanto às funções moleculares de proteínas desreguladas após a exposição ao BFA *versus* controle - e a Figura 17B - que corresponde às proteínas reguladas pela exposição ao BFS *versus* controle. Além disso, a exposição ao BFA também regulou proteínas com atividade antioxidante quando comparado ao controle (5%), enquanto a exposição ao BFS regulou proteínas com atividade transportadora (7%) e com atividade reguladora da tradução (4%) também quando comparado ao controle.

Figura 16. Classificação das proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA em comparação ao grupo controle de acordo com o banco de dados do *Gene Ontology* (GO). A) Processos biológicos B) Função molecular.

Figura 17. Classificação das proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFS em comparação ao grupo controle de acordo com o banco de dados do *Gene Ontology* (GO) A) Processos biológicos B) Função molecular.

3.5.7. Análise das redes de interações entre as proteínas diferencialmente expressas no fígado dos animais expostos a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA ou 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFS pelo STRING.

As proteínas cuja expressão diferiu significativamente nos extratos hepáticos de animais expostos a 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ de BFA ou BFS em comparação ao grupo controle também foram submetidas à análise da interação proteína-proteína (PPI) na plataforma STRING. Todos os 30 números de acesso de proteínas encontradas suprarreguladas ou subreguladas após o tratamento com BFA *versus* controle que foram incluídos para esta análise foram identificados (Figura 18).

As proteínas são representadas nas figuras geradas na plataforma STRING pelos círculos e as arestas representam associações entre as proteínas. As linhas coloridas observadas entre duas proteínas consecutivas representam: interações conhecidas (linha azul claro - de bancos de dados com curadoria e linha rosa – determinadas experimentalmente); interações previstas (linha verde - vizinhança do gene, linha vermelha – fusão entre genes e linha azul escuro - co-ocorrência de gene); e outras (linha verde musgo – *textmining*, linha preta - co-expressão e linha lilás - homologia proteica).

Figura 18. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no fígado de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle. PPI *enrichment p-value* = 0,0137.

Para essa análise, as proteínas incluídas apresentaram redes de interações significativas entre elas (PPI *enrichment p-value* = 0,0137), no entanto, não foram identificadas vias específicas às quais as proteínas estivessem relacionadas, de acordo com a base de dados fornecida pela Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (*KEGG pathways*). Em relação às proteínas alteradas após o tratamento com BFS em comparação ao grupo controle, 33 das 34 proteínas incluídas na análise do STRING foram identificadas (Figura 19) e estas proteínas também apresentaram redes de interações significativas entre elas (PPI *enrichment p-value* = 0,0142). De acordo com o banco de dados *KEGG pathways*, as proteínas reguladas pelo tratamento com BFS foram classificadas em 11 vias diferentes (Tabela 5), dentre as quais se destacam: metabolismo de drogas pelo citocromo P450, metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450, vias metabólicas, carcinogênese química e metabolismo da glutatona.

Figura 19. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no fígado de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle. As vias mais enriquecidas nessas redes foram “Metabolismo de drogas - citocromo P450” (FDR = $6,03 \times 10^{-6}$) e “Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450” (FDR = $1,75 \times 10^{-4}$). PPI enrichment *p-value* = 0,0142.

Tabela 6 – Vias enriquecidas na análise da rede de interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle, obtida na análise do STRING, de acordo com a base de dados fornecida pelo banco de dados da *KEGG Pathways*.

KEGG Pathways			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
982	Drug metabolism - cytochrome P450	5	6.03×10^{-6}
980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4	0.000175
1100	Metabolic pathways	10	0.000294
5204	Chemical carcinogenesis	4	0.000294
1200	Carbon metabolism	4	0.000903
280	Valine, leucine and isoleucine degradation	3	0.00199

(Tabela 6 – Continuação)

480	Glutathione metabolism	3	0.00206
760	Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	0.0263
350	Tyrosine metabolism	2	0.0409
1120	Microbial metabolism in diverse environments	3	0.0411
4141	Protein processing in endoplasmic reticulum	3	0.0439

3.5.8. Quantificação da expressão de mRNA das proteínas diferencialmente expressas no fígado dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS por RT-qPCR.

A fim de confirmar a validade dos resultados obtidos nas análises proteômicas do fígado, quatro proteínas identificadas com significativa diferença de expressão entre grupos expostos e grupo controle foram selecionadas para serem validadas quantitativamente por RT-qPCR (Figura 20). Consistente com os dados de expressão de proteínas, as exposições a BFA e BFS aumentaram significativamente a expressão de *Sdhb* (3,5 vezes) e de *Gykl1* (4,0 vezes). Curiosamente, *Coq9* também estava suprarregulado após a exposição a ambos os contaminantes (14,5 vezes no grupo exposto ao BFA e 10,5 vezes no grupo exposto ao BFS). Além disso, a expressão de *Akr1c2* estava significativamente reduzida após a exposição ao BFA e ao BFS, quando comparada ao grupo controle, de 10 e 20 vezes, respectivamente.

Figura 20. Expressão relativa de mRNA de Glycerol kinase-like 1 (*Gykl1*), Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_ mitochondrial (*Sdhb*), Ubiquinone biosynthesis protein COQ9_ mitochondrial (*Coq9*) e Aldo-keto reductase family 1 member C21 (*Akr1c2*) no tecido hepático de ratos Wistar expostos a 50 µg/kg/dia de BFA, 50 µg/kg/dia de BFS e grupo controle. Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA 1 via seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * $p \leq 0.05$ versus controle, ** $p \leq 0.01$ versus controle, *** $p \leq 0.001$ versus controle.

A exposição a 50 µg/kg/dia de BFA e BFS aumentou significativamente a expressão de *Glucokinase activity_ related sequence 1* (GYKL1), uma proteína codificada em roedores pelo gene glycerol kinase-like 1 (Gykl1) e que possui atividade glicerol quinase (HUQ et al., 1996). As glicerol quinases são enzimas importantes que catalisam a fosforilação do glicerol (glicerol-3-fosfato, G3P) necessárias para a esterificação de ácidos graxos e a síntese de TGs no fígado (SRIRAM et al., 2008; NYE et al., 2008). Em pré-adipócitos primários humanos em diferenciação, a exposição ao BFA ou BFS (25 µM) regulou positivamente genes relacionados ao metabolismo de lipídeos e adipogênese, incluindo o gene do receptor ativador de proliferação de peroxissomos gamma (PPARγ) e glicerol-3-fosfato desidrogenase 1 (GPD1) (BOUCHER et al., 2016). GYKL1 e GPD1 participam na síntese de G3P, uma molécula essencial para a síntese de TG (COLEMAN E LEE, 2004). Marmugi e colaboradores (2012) mostraram suprarregulação da expressão do mRNA de enzimas hepáticas envolvidas na lipogênese *de novo*, síntese de triglicérides e colesterol após a exposição de camundongos CD1 machos por 28 dias a doses de BFA que variavam de 5 µg/kg/dia, um valor 10 vezes menor que a dose de 50 µg/kg/dia de BFA estipulada pela USEPA como IDA, até o valor de 5000 µg/kg/dia, que é a dose estipulada como *No Adverse Effect Level* (NOAEL). Ainda, um estudo recente mostrou que a exposição a baixas doses de BFA durante o desenvolvimento também induziu lipogênese *de novo*, bem como o aumento da atividade de enzimas lipogênicas essenciais, levando a acúmulo de ácidos graxos (AGs) saturados em tecido adiposo branco e plasma da prole de ratos *Fischer 344* com 5 semanas de vida.

Curiosamente, a exposição ao BFS também aumentou a expressão de Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase cytoplasmic (Hmgcs1), a primeira enzima na biossíntese de mevalonato, um precursor da molécula de colesterol (SAPIR et al., 2014; OKS et al., 2018). Nossos resultados estão de acordo com um crescente corpo de literatura que mostra que o BFS também pode regular a síntese, o transporte e o armazenamento de colesterol e TGs no fígado e no tecido adiposo, até mesmo em maior extensão quando comparado ao BFA (BOUCHER et al., 2016; Wang; et al., 2018; WANG et al., 2019). Pistas dessa evidência podem ser observadas pelas concentrações séricas mais altas de TGs e de LDL-colesterol, respectivamente, após exposição às doses mais baixas e mais altas de BFS em nosso estudo (50 e 500 µg/kg/dia). Estudos prévios in vivo que avaliaram a exposição a doses elevadas de

BFS mostraram que este composto aumenta os níveis de vários marcadores lipídicos circulantes, incluindo TGs e LDL-colesterol em ratos (após exposição a 30, 60, 120 mg/kg/ dia) (PAL et al., 2017) e o conteúdo de TGs, colesterol total, HDL e LDL-colesterol em larvas de peixe-zebra (1, 10 ou 100 µg/L) (WANG et al., 2018). Ainda, a proteína Aldo-keto reductase family 1 member C21 (Akr1c2) foi encontrada subregulada após a exposição ao BFA no proteoma do fígado e o padrão de expressão foi confirmado por RT-qPCR. De forma interessante, um estudo recente que realizou a análise fosfoproteômica de fígado de ratos machos Wistar expostos ao BFA (500 µg/kg/dia por 30 dias) verificou que a enzima delta (4)-3-ketosteroid 5-beta-reductase (Akr1d1), também um membro da família das enzimas Aldo-keto reductase 1 (AKR1), foi uma proteína alvo regulada pelo BFA (VAHDATI HASSANI et al., 2018). As enzimas da família aldo-keto reductase 1C (AKR1C) são responsáveis pela inativação do andrógeno 5 α -di-hidrotestosterona (DHT) induzida por glicocorticóides, um inibidor da adipogênese em linhagens celulares de pré-adipócitos murinos e humanos (VEILLEUX et al., 2012). Portanto, essas enzimas desempenham um papel na promoção da adipogênese em pré-adipócitos.

Existe um crescente número de estudos na literatura que evidenciam os efeitos adversos da exposição ao BFA na atividade e função mitocondrial (MOON et al., 2012; HUC et al., 2012; JIANG et al. 2015, ARGAWAL et al. 2016; MARROQUI et al., 2018). Estudos proteômicos anteriores mostraram que a exposição ao BFA modulou a expressão de proteínas mitocondriais em diferentes tecidos e organismos: no miocárdio foi encontrada desregulação da expressão das principais enzimas mitocondriais da cadeia de transporte de elétrons (ETC) e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em ratos fêmeas expostas por 10 semanas ao BFA (0,25 mg/L) em associação com uma dieta enriquecida em frutose (LJUNGGREN et al., 2016); nas gônadas de ostras, a exposição ao BFA (2 mg/L por 16 dias) aumentou a expressão das proteínas do ciclo TCA (LUO et al., 2017); e por fim, a dieta paterna contaminada com BFA (50 mg de BFA por kg de dieta) induziu alterações significativas no córtex pré-frontal da prole de camundongos CD-1 após 28 dias de nascimento, revelando alterações significativas na expressão de enzimas mitocondriais envolvidas na síntese de ATP (LUO et al., 2017). No presente estudo, tanto a exposição ao BFA quanto ao BFS aumentou a expressão de succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_mitochondrial (Sdhb), a subunidade proteica de ferro-enxofre da enzima succinato desidrogenase (SDH), uma enzima do

complexo II mitocondrial que transfere elétrons do succinato para a ubiquinona participando tanto no ciclo TCA como na fosforilação oxidativa (HORSEFIELD et al., 2006). O padrão de expressão também foi confirmado a nível de mRNA por dados quantitativos de RT-qPCR. Anteriormente, resultados opostos foram encontrados no início da vida, como no tecido cardíaco de ratos machos neonatos submetidos à exposição pré-natal ao BFA (50 µg/kg/dia) (JIANG et al., 2014) e após exposição aguda (14 dias) em camundongos jovens (XIE e Li, 2014; ANJUM et al., 2011). Talvez nossos resultados em ratos adultos possam refletir um mecanismo compensatório para manter a atividade normal de SDH.

Além disso, a exposição ao BFS regulou positivamente a expressão de ubiquinone biosynthesis protein COQ9_ mitochondrial (COQ9), uma proteína importante envolvida na síntese de ubiquinona (LOHMAN et al., 2014), uma molécula aceptora de elétrons do succinato ou do complexo I mitocondrial. Essa enzima também foi encontrada suprarregulada no estudo de Ljunggren e colaboradores (2016), o qual analisou o proteoma de miocárdio, sugerindo que ambos os contaminantes podem afetar de maneira semelhante a atividade e o nível de substrato (ubiquinona) do complexo II. Nosso estudo também demonstrou que o BFS aumentou significativamente a expressão de cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial (COX5B), uma subunidade da citocromo c oxidase (HOSHINAGA et al., 1994), outra enzima importante da ETC mitocondrial (CALLAHAN E SUPINSKI, 2005). Uma vez que os dados sobre a toxicidade mitocondrial do BFS ainda são limitados, nosso estudo mostra uma associação entre a exposição ao BFS e disfunção mitocondrial e destaca a urgência de desenvolvimento de estudos futuros que avaliem como esse composto químico pode afetar a atividade mitocondrial tardiamente.

Um número considerável de proteínas importantes que medeiam processos de detoxificação celular foi regulado pelo tratamento com BFA e BFS. O BFA regulou a expressão das proteínas superoxide dismutase [Mn] mitochondrial (SOD2), glutathione S-transferase_theta 3 (GSTT3) e ETHE1-persulfide dioxygenase (ETHE1), cujas funções moleculares são atividade antioxidante, de ligação e catalítica, respectivamente, de acordo com a classificação de ontologia genética (GO). A SOD2 é uma enzima que desempenha um papel na inativação de radicais de ânion superóxido produzidos principalmente por mitocôndrias (ZOU et al., 2017) e glutathione-S-transferases (GSTs) são enzimas antioxidantes endógenas muito importantes em processos de detoxificação de drogas terapêuticas, contaminantes

ambientais e EROs (HAYES et al., 2005; BAŞAK et al., 2017). No presente estudo, os níveis de SOD2 e GSTT3 diminuíram após exposição crônica ao BFA. Vários estudos já mostraram que a exposição ao BFA pode aumentar o estresse oxidativo no tecido hepático (ELSWIFY et al., 2016; VAHDATI HASSANI et al., 2017; ZHANG E LIU, 2018). Nossos achados corroboram diversos estudos preliminares que evidenciaram que a exposição in vivo ao BFA é hepatotóxica, uma vez que desencadeia a produção de EROs e reduz o conteúdo de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase no tecido hepático (Khan et al., 2016; Wang et al., 2019). A ETHE1, uma enzima mitocondrial essencial para a detoxificação de sulfetos estava suprarregulada após exposição ao BFA. Anteriormente, a deficiência hepática de ETHE1 em camundongos knockout (*Ethe1* -/-) estava ligada a níveis reduzidos de proteínas redox ativas, como desidrogenases e vários membros da família do citocromo P450 (CYP450) (SAHEBEKHTIARI et al., 2016; SAHEBEKHTIARI et al., 2019). É possível que o aumento nos níveis de ETHE1 no tecido hepático de ratos expostos ao BFA, verificado no presente estudo, possam estar associados ao aumento da demanda por proteínas com potencial redox nesse tecido, como a SOD.

As proteínas Microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1), glutathione S-transferase alpha 1 (GSTA1) and glutathione S-transferase A6 (GSTA6) são diferentes classes pertencentes às enzimas da superfamília das Glutathione-S-Transferases (GST) (BOARD E MENON, 2013) que foram desreguladas pelo tratamento com BFS no presente estudo. Entre as vias encontradas suprarreguladas no STRING-DB (nas quais todas essas três proteínas estavam incluídas) estão o metabolismo de drogas - citocromo P450; metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450; carcinogênese química e metabolismo da glutathione. Embora a MGST1 seja uma proteína ligada à membrana, encontrada no retículo endoplasmático e na membrana das mitocôndrias, possui a mesma especificidade de substrato que outras classes de GSTs. A MGST1, bem como outras GSTs citosólicas, são induzidas após um insulto tóxico no fígado, tal como estresse oxidativo, para proteger contra intermediários reativos, quando a GSH não está depletada (MORGENSTERN et al., 2011). Alguns estudos recentes já demonstraram que a exposição ao BFS também aumenta a produção de EROs e a oxidação de componentes celulares, bem como regula os níveis e a atividade de enzimas antioxidantes in vitro e in vivo (ZHANG et al., 2016; ULLAH et al., 2016; MAĆCZAK et

al., 2017). Além disso, um estudo recente mostrou que a exposição subcrônica ao BFS (5000 µg/kg/dia) aumentou a lesão hepática e o estresse oxidativo, verificados pelo aumento dos níveis de malondialdeído e atividades reduzidas de SOD, catalase e glutathione peroxidase, importantes enzimas antioxidantes (ZHANG et al., 2018). Dado o elevado potencial oxidativo do BFS, era esperado que as GSTs, como enzimas detoxificantes, estivessem suprarreguladas no fígado após exposição crônica a este contaminante ambiental, um padrão observado em nosso estudo para as enzimas MTGST1 e GSTA1. Ao contrário desses achados, a GSTA6 foi encontrada subregulada após a exposição ao BFS. É possível que esta enzima esteja sendo depletada neste tecido e sua atividade enzimática seja compensada pelo GSTA1, que é da mesma família de GSTs que a GSTA6.

3.5.9. Identificação e quantificação das proteínas do pâncreas através do software Progenesis Q1.

A identificação e quantificação das proteínas do tecido pancreático foram realizadas da mesma maneira conforme procedido para o tecido hepático. Dessa forma, as análises comparativas do tecido pancreático foram realizadas entre o grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA *versus* grupo controle e entre o grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS *versus* grupo controle.

Para a análise comparativa entre o grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA e o grupo controle, foram identificadas e quantificadas em ambos os grupos 681 proteínas, 5 proteínas exclusivas para o grupo exposto ao BFA e 8 proteínas exclusivas para o grupo controle, totalizando 694 proteínas, conforme demonstrado no diagrama de Venn da Figura 21.

Figura 21. Diagrama de Venn representando todas as proteínas identificadas e quantificadas no extrato proteico do tecido pancreático dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA e/ou do grupo controle.

Quanto à diferença na expressão entre as proteínas quantificadas em ambos os grupos, observou-se que 8 proteínas se apresentavam suprarreguladas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle, enquanto 26 proteínas estavam subreguladas. As Tabelas A4, A5 e A6 (ANEXO 1) apresentam, respectivamente, as proteínas suprarreguladas, subreguladas e exclusivas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA *versus* controle.

Por outro lado, para a análise comparativa entre o grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS e o grupo controle, foram identificadas e quantificadas no total 694 proteínas, sendo que 688 proteínas estavam presentes em ambos os grupos, 5 proteínas foram encontradas de forma exclusiva no grupo exposto ao BFS e somente 1 proteína encontrada de forma exclusiva no grupo controle (Figura 22).

Figura 22. Diagrama de Venn representando todas as proteínas identificadas e quantificadas no extrato proteico do tecido pancreático dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFS e/ou do grupo controle.

Para a análise da diferença de expressão entre as proteínas quantificadas em ambos os grupos, verificou-se que 14 proteínas estavam suprarreguladas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle, enquanto 47 proteínas estavam subreguladas. As Tabelas A7, A8 e A9 (ANEXO 1) apresentam, respectivamente, as proteínas suprarreguladas, subreguladas e exclusivas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS *versus* controle.

3.5.10. Características das proteínas identificadas e quantificadas no tecido pancreático dos grupos estudados quanto à função molecular e processos biológicos nos quais estão envolvidas.

As proteínas encontradas com diferença de expressão e exclusivamente nos tecidos pancreáticos dos grupos expostos tanto a 50 µg/kg/dia de BFA quanto a 50 µg/kg/dia de BFS também foram classificadas pelo sistema de classificação disponível online, *Panther*, quanto às suas funções moleculares e processos

biológicos nos quais estão envolvidas. As Figuras 23 e 24 apresentam, respectivamente, a distribuição quanto às funções moleculares e quanto aos processos biológicos das proteínas subreguladas (colunas em azul), assim como das proteínas suprarreguladas e exclusivas (colunas em laranja) para o grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle.

No total, 39 números de acessos do UNIPROT foram incluídos para essa análise, 8 referentes às proteínas suprarreguladas, 5 às proteínas exclusivas, e 26 às proteínas subreguladas. Todos os números de acesso incluídos nesta análise foram identificados pelo Panther. Para a distribuição quanto às funções moleculares (Figura 23) predominam no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas com atividade de ligação (48% para proteínas subreguladas *versus* 50% para proteínas suprarreguladas e exclusivas) e com atividade catalítica (24% proteínas subreguladas *versus* 30% proteínas suprarreguladas e exclusivas). Destacam-se ainda proteínas subreguladas com atividade de molécula estrutural (24%); bem como proteínas suprarreguladas e exclusivas com atividade reguladora de função molecular (10%) e com atividade transportadora (10% *versus* 3% para proteínas subreguladas).

Figura 23. Classificação quanto às funções moleculares das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).

Em relação à classificação quanto aos processos biológicos (Figura 24) a maior proporção de proteínas estava envolvida em processos metabólicos (33% proteínas

subreguladas *versus* 21% proteínas suprarreguladas e exclusivas) e em processos celulares (21% proteínas subreguladas *versus* 26% suprarreguladas e exclusivas). Ainda, uma grande quantidade de proteínas subreguladas relaciona-se com regulação biológica (12% *versus* 5% suprarreguladas e exclusivas) e com organização de componentes celulares ou biogênese (12%), enquanto uma parcela considerável de proteínas suprarreguladas e exclusivas se relacionam com resposta à estímulos (16% *versus* 9% subreguladas).

Figura 24. Classificação quanto aos processos biológicos das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).

As classificações quanto às funções moleculares e processos biológicos pelo Panther das proteínas encontradas com diferença de expressão e exclusivamente nos tecidos pancreáticos do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em relação ao grupo controle estão apresentadas nas Figuras 25 e 26, respectivamente. No total, 66 números de acessos do UNIPROT foram incluídos para essa análise, 14 referentes às proteínas suprarreguladas, 5 às proteínas exclusivas, e 47 às proteínas subreguladas. Dentre os números de acesso de proteínas incluídos nesta análise não foi identificado o número de acesso de uma proteína subregulada, referente à proteína *complement 5*.

Para a distribuição quanto às funções moleculares (Figura 25) novamente predominam proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas com atividade de

ligação (41% proteínas subreguladas *versus* 33% proteínas suprarreguladas e exclusivas) e com atividade catalítica (25% proteínas subreguladas *versus* 42% proteínas suprarreguladas e exclusivas). Observa-se uma elevada porcentagem de proteínas subreguladas com atividade de molécula estrutural (25%) e para as proteínas suprarreguladas e exclusivas destacam-se proteínas com atividade transportadora (17%).

Figura 25. Classificação quanto às funções moleculares das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).

A classificação quanto aos processos biológicos (Figura 26) mostrou que a grande maioria das proteínas estava relacionada com processos celulares (33% subreguladas *versus* 29% suprarreguladas e exclusivas) e com processos metabólicos (25% subreguladas *versus* 19% suprarreguladas e exclusivas). A análise também evidenciou que uma expressiva porcentagem de proteínas subreguladas relaciona-se com organização de componentes celulares ou biogênese (17%) e que uma maior porcentagem de proteínas suprarreguladas e exclusivas se relaciona com localização (14% *versus* 6% subreguladas).

Figura 26. Classificação quanto aos processos biológicos das proteínas subreguladas, suprarreguladas e exclusivas expressas no tecido pancreático do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS de acordo com o banco de dados do Gene Ontology (GO).

3.5.11. Análise das redes de interações entre as proteínas diferencialmente expressas no pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou 50 µg/kg/dia de BFS pelo STRING.

As proteínas suprarreguladas e subreguladas (34 proteínas) identificadas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle, foram submetidas à análise de redes de interações na plataforma STRING. Esta análise identificou todos os números de acessos incluídos e 2 vias principais de acordo com a base de dados *KEGG pathways*. A Figura 27 mostra as redes de interações entre as proteínas (*enrichment p-value*: 0,0004080) e a Tabela 7 discrimina as vias identificadas na análise realizada no STRING. Como pode ser observado, sete proteínas estavam diretamente associadas à via Ribossomo, dentre estas destacam-se: *60S ribosomal protein L27* (Rpl27), *Ribosomal protein L30* (Rpl30), *Ribosomal protein S8* (Rps8), *60S ribosomal protein L8* (ENSRNOG00000048523), *Ribosomal protein S5* (Rps5), *Similar to ribosomal protein S13* (Rps13) e *40S ribosomal protein S24* (ENSRNOG00000031579), todas proteínas subreguladas após o tratamento com BFA.

Figura 27. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no pâncreas de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle. A via mais enriquecida foi “Ribossome”. PPI enrichment p -value = 0,000408, FDR para via “Ribossome” = $7,61 \cdot 10^{-8}$.

Tabela 7 – Vias enriquecidas na análise da rede de interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA em comparação ao grupo controle, obtida na análise do STRING, de acordo com a base de dados fornecida pelo banco de dados da KEGG Pathways.

KEGG Pathways			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
rno03010	Ribosome	7	7,61e-08
rno00910	Nitrogen metabolism	2	0,0134

A análise de interação proteína-proteína no STRING obtida para as proteínas identificadas como suprarreguladas e subreguladas (61 proteínas) após o tratamento com 50 µg/kg/dia de BFS *versus* controle está apresentada na Figura 28 e as vias metabólicas identificadas são apresentadas na Tabela 8. Do total de números de acesso incluídos para esta análise, somente 1 número de acesso não foi identificado,

o qual refere-se à proteína *complement C5*, que estava subregulada após a exposição ao BFS. A análise de interações proteína-proteína mostrou um grande número de conexões entre as proteínas, com *PPI enrichment p-value* = 7.65×10^{-12} . Além disso, quatro vias estavam enriquecidas na análise pelo STRING de acordo com a base de dados de *KEGG pathways*, dentre as quais, a via “ribossomo” ($\text{FDR} = 7,15 \times 10^{-12}$), “digestão e absorção de proteína” ($\text{FDR} = 0,0048$), “secreção pancreática” ($\text{FDR} = 0,0048$) e “via de sinalização PPAR” ($\text{FDR} = 0,0278$).

Figura 28. Análise de redes de interação de proteínas diferencialmente expressas (suprarreguladas e subreguladas) no pâncreas de animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle. STRING identificou 4 vias enriquecidas nesta análise, dentre as quais se destacam as vias “*Ribosome*” ($\text{FDR} = 7,15 \times 10^{-12}$) e “*PPAR signaling pathway*” ($0,0278$). *PPI enrichment p-value* = $7,61 \cdot 10^{-12}$.

Tabela 8 – Vias enriquecidas na análise da rede de interações de proteínas diferencialmente expressas no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle, obtida na análise do STRING, de acordo com a base de dados fornecida pelo banco de dados da *KEGG Pathways*.

KEGG Pathways			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
<i>rno03010</i>	<i>Ribosome</i>	11	7,15e-12
<i>rno04974</i>	<i>Protein digestion and absorption</i>	4	0,0048
<i>rno04972</i>	<i>Pancreatic secretion</i>	4	0,0048
<i>rno03320</i>	<i>PPAR signaling pathway</i>	3	0,0278

3.5.12. Quantificação da expressão de mRNA das proteínas diferencialmente expressas no pâncreas dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFA ou BFS por RT-qPCR.

As expressões relativas de mRNA referentes às proteínas *Insulin-1* e *Insulin-2*, subreguladas respectivamente no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA *versus* controle e no grupo exposto a 50 µg/kg/dia BFS *versus* controle, bem como da proteína *hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_mitochondrial oxidase 2*, subregulada no grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS em comparação ao grupo controle, foram quantificadas no tecido pancreático dos grupos controle e grupos expostos a 50 µg/kg/dia de BFA e 50 µg/kg/dia de BFS. A quantificação foi realizada utilizando primers específicos para os respectivos genes: *Ins1*, *Ins2* e *Hmgcs2*.

Foi possível observar uma significativa redução na expressão relativa de mRNA de *Ins1* de aproximadamente 1,8 vezes para o grupo exposto 50 µg/kg/dia BFA *versus* controle e de 2 vezes para o grupo exposto a 50 µg/kg/dia BFS *versus* controle (Figura 29). Da mesma maneira, a expressão de *Ins2* apresentou significativa redução de cerca de 1,7 vezes para o grupo exposto a 50 µg/kg/dia BFA *versus* controle e de 4,4 vezes para o grupo exposto a 50 µg/kg/dia BFS *versus* controle. A expressão relativa de mRNA de *Hmgcs2* estava diminuída para ambos os grupos, porém não foram encontradas diferenças estatísticas. Os resultados obtidos nestes ensaios validam os resultados da análise proteômica de amostras do tecido pancreático e mostram que a expressão diferencial observada para estas proteínas deve estar relacionada com a diminuição da expressão dos genes que codificam cada

uma das respectivas proteínas analisadas ou ainda com a quantidade de mRNA que é transcrito a partir desses genes específicos.

Figura 29. Quantificação das expressões relativas de mRNA dos genes *Hmgcs2*, *Ins1* e *Ins2* no pâncreas de ratos *Wistar* expostos a 50 µg/kg/dia de BFA, a 50 µg/kg/dia de BFS e controle, determinadas por RT-qPCR e normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Hprt1*. Média ± EPM. * $p \leq 0,05$ vs controle; ** $p \leq 0,01$ vs controle.

A observação das redes de interações de proteínas diferencialmente expressas nos grupos de animais expostos tanto ao BFA quanto ao BFS (Figuras 31 e 32) mostrou dois grandes grupos de proteínas ribossomais subreguladas em comparação ao grupo controle, as quais se conectavam entre si. Estas proteínas estão representadas em vermelho na Figura 31 e em amarelo na Figura 32 e a maioria foi identificada na análise do STRING como pertencente à via “ribossomo”. Dentre estas proteínas, grande parte possui função estrutural dos ribossomos (TSURUGI et al., 1976; UCHIUMI et al., 1980), o que sugere que exposição a ambos os contaminantes pode desencadear a desestabilização da estrutura geral destas organelas e da maquinaria ribossomal e, conseqüentemente, prejudicar sua principal função, a síntese e homeostase de proteínas, no tecido pancreático (NELSON E COX, 2006). Um estudo anterior que avaliou a ecotoxicidade de butil benzil ftalato, também um desregulador endócrino, através da análise da expressão gênica de diversos biomarcadores de toxicidade em larvas aquáticas de *Chironomus riparius* verificou que a exposição a 100 mg/L deste composto por 24 horas diminui a transcrição de RNA ribossômico, relacionado com biogênese ribossomal, o qual foi avaliado como uma medida da viabilidade celular (PLANELLÓ et al., 2011). A desregulação da expressão de proteínas ribossomais no estudo de Planelló e colaboradores bem como no presente estudo é, portanto, um indicativo de uma possível diminuição da atividade ribossomal, que poderia levar tanto à síntese de proteínas malformadas ou ainda à produção insuficiente de proteínas essenciais no

tecido, o que poderia ainda acarretar a redução da viabilidade celular associada à exposição a estes desreguladores endócrinos.

Os resultados das análises proteômicas do pâncreas também mostraram que a exposição a 50 µg/kg/dia de BFA e a 50 µg/kg/dia de BFS levou, respectivamente, à subregulação da expressão de *insulin-1* (INS1, *fold-change* 0,01) e *insulin-2* (INS2, *fold-change* 0,01). Ainda, o tratamento com BFS levou à subregulação da expressão da proteína glucagon (GCG, *fold-change* 0,03). Tais alterações evidenciaram uma diminuição na síntese de insulina nas células β -pancreáticas dos animais expostos cronicamente a ambos os contaminantes, bem como a redução da síntese de glucagon pelas células alfa(α -) pancreáticas dos animais expostos somente ao BFS em comparação ao grupo controle. Todas estas proteínas desempenham papéis fundamentais na regulação do metabolismo energético e a desregulação de sua produção indica disfunção da atividade do tecido pancreático.

Em ratos e camundongos, a insulina é sintetizada a partir da transcrição de dois genes distintos expressos nas células β -pancreáticas, os quais dão origem às pré-pró-insulinas 1 (INS1) e 2 (INS2), peptídeos precursores do hormônio (SHIAO et al., 2008). Ambos os peptídeos são processados nas ilhotas pancreáticas através de clivagem proteolítica em resíduos específicos, gerando a forma funcional do hormônio, o qual é armazenado nos grânulos secretórios das células β (MALIDE et al., 1995).

Em estudo recente, Ramzy e colaboradores (2018) demonstraram que células β -pancreáticas de camundongos C57Bl/6j com expressão desativada (do inglês, *knocked out*) para ambos os genes (*Ins1* e *Ins2*) não foram capazes de maturar a insulina corretamente, o que evidenciou que ambas as proteínas são igualmente necessárias para o normal desenvolvimento e funcionamento destas células. Ainda, no primeiro estudo já realizado com camundongos *knocked out* para ambos os genes em células β -pancreáticas, a deficiência na produção de insulina resultou em rápido desenvolvimento de *diabetes mellitus* nos animais, com aumento nas concentrações plasmáticas de TG, evidente hepatomegalia e esteatose hepática (DUVILLIÉ et al., 1997).

Diversos estudos que avaliaram a toxicidade do BFA em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* já haviam demonstrado que a exposição ao contaminante desencadeou prejuízos diretos às células β -pancreáticas, com consequente diminuição da proliferação e viabilidade celular, apoptose e disfunções

na secreção de insulina (ALONSO-MAGDALENA et al., 2010; LIU et al., 2013; LIN et al., 2013; WELDINGH et al., 2017). No entanto, estudos que correlacionem a exposição ao contaminante BFS com a disfunção de células β -pancreáticas ou ainda α -pancreáticas e consequentes prejuízos à homeostase energética, são escassos.

A primeira tentativa de mostrar uma possível correlação entre a exposição a concentrações ambientalmente relevantes do composto BFS e a disfunção da homeostase da glicose foi publicado recentemente por Zhao e colaboradores (2018). Naquele estudo, a exposição de peixes-zebra (*Danio rerio*) a 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ de BFS durante um período de 28 dias levou ao aumento da glicemia em jejum, diminuiu as concentrações plasmáticas de insulina e a expressão gênica de pré-próinsulina e do hormônio glucagon no tecido visceral dos animais. Estes resultados inéditos corroboram os resultados obtidos no presente estudo. A diminuição na síntese/produção dos peptídeos precursores da insulina (INS1 e INS2) no pâncreas dos animais expostos ao BFA e ao BFS no presente estudo, evidencia a desregulação da síntese e secreção de insulina nas células β -pancreáticas dos animais e, consequentemente, os prejuízos às funções metabólicas desencadeadas por este hormônio.

A diminuição da viabilidade de células β tem influência direta na síntese e secreção de insulina, o que poderia explicar a subregulação da expressão das pré-pró-insulinas. No presente estudo, a observação da drástica diminuição na expressão de diversas proteínas essenciais para o normal funcionamento e para a sobrevivência das células pancreáticas, tais como proteínas ribossomais e proteínas estruturais de citoesqueleto após a exposição a ambos os contaminantes, evidencia a citotoxicidade do BFA e BFS para estas células, e fortalece esta hipótese sugerida aqui.

O glucagon (GCG), hormônio secretado pelas células α -pancreáticas é igualmente importante na regulação da homeostase da glicose, uma vez que regula as concentrações séricas de glicose em condições de hipoglicemia, contrapondo-se aos efeitos da insulina (CAMPBELL E DRUCKER, 2015). No organismo, a produção e secreção de GCG pelas células α -pancreáticas é diminuída ou suprimida quando há um aumento da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, em resposta às elevadas concentrações séricas de glicose (hiperglicemia), o que evidencia que a síntese e secreção de GCG são controladas tanto pelas variações glicêmicas quanto pela regulação parácrina (GROMADA et al., 2007; LE MARCHAND e PISTON, 2010).

No entanto, no presente estudo, a diminuição na expressão da proteína GCG não pode ser explicada pela diminuição nas concentrações séricas de glicose dos animais expostos a 50 µg/kg/dia de BFS nem pelo aumento da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, uma vez que os resultados obtidos não suportam essas conclusões. Dessa forma, uma possível explicação para a redução na expressão de GCG seria a redução da população de células α -pancreáticas, ou seja, a diminuição da viabilidade destas células, o que consequentemente levaria à diminuição na síntese e secreção de GCG pelo pâncreas.

Essa hipótese é sugerida a partir da observação de estudos recentes *in vitro*, os quais mostraram que o BFS foi capaz de induzir formação de EROs e danos diretos ao DNA em espermatozoides obtidos de ratos *Sprague Dawley* (100 mg/L) (ULLAH et al., 2017) e reduzir a viabilidade celular e induzir a apoptose de células hepáticas e renais isoladas de ratos C57 de maneira dose-dependente (0,3 -1 mM) (ZHANG et al., 2016); e ainda de estudo *in vivo* que mostrou que a exposição de camundongos machos *ICR* a 5000 µg/kg/dia de BFS por 8 semanas resultou em danos hepáticos e alterações morfológicas no tecido, além de diminuição na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (ZHANG et al., 2018).

Uma vez que ainda não existem estudos que avaliem a possível toxicidade resultante da exposição ao contaminante BFS no tecido pancreático, o presente estudo torna evidente a importância de se desenvolver novos estudos com o intuito de desvendar os possíveis efeitos citotóxicos e danos oxidativos do BFS neste tecido, bem como em suas diferentes populações celulares (células beta, alfa, gama entre outras) e os consequentes prejuízos às funções vitais exercidas por este órgão, tais como a regulação da homeostase energética.

Diversos estudos anteriores mostraram que tanto a exposição ao BFA quanto ao BFS pode desregular vias específicas envolvidas com a síntese de lipídios em diferentes modelos experimentais de células (estudos *in vitro*), tecidos e/ou organismos (estudos *in vivo*) tais como fígado e tecido adiposo (MARMUGI et al., 2014; BOUCHER et al., 2016; SADOUL et al., 2017). Até o presente momento, dois estudos mostraram que a exposição ao BFS pode ativar a via de sinalização do PPAR, porém ambos estudos foram realizados *in vitro*, usando pré-adipócitos humanos e murinos (BOUCHER, AHMED e ATLAS, 2016; AHMED e ATLAS, 2016).

Assim, este é o primeiro estudo *in vivo* que evidencia que exposição ao BFS pode se relacionar com a ativação da via PPAR no tecido pancreático de ratos *Wistar*.

Boucher, Ahmed e Atlas (2016) mostraram pela primeira vez, ao expor preadipócitos humanos primários a concentrações que variavam de 0,1 nM a 25 μ M por até 14 dias, que a exposição à concentração mais elevada (25 μ M) levou ao acúmulo de lipídios (aumento de 4,2 vezes comparado ao controle), aumento na concentração de mRNA do fator de transcrição PPAR γ (concentrações 10 nM e 25 μ M) e ambos os efeitos foram possivelmente mediados pela ativação direta de PPAR e promoção de sua atividade transcricional, avaliada pelo ensaio de atividade transcricional deste gene.

Dentre as proteínas envolvidas na via de “sinalização PPAR”, merece destaque a proteína *apolipoprotein CIII* (APOC3), *fold-change* 2,86. Estudos prévios evidenciam que a transcrição desta proteína também pode ser induzida em condições de hiperglicemia (CARON et al., 2010) e que, em condições normais, a insulina suprime a sua expressão, principalmente pela via de sinalização IRS/PI3K/AKT/FoxO1 em ratos, sendo que sua expressão está aumentada em condições patogênicas, tais como na deficiência de insulina e na resistência à insulina (CHEN et al., 1994; ALTOMONTE, et al. 2004).

Ávall e colaboradores (2015) demonstraram em camundongos C57BL/6 obesos (*Lep^{ob}/Lep^{ob}*), que o aumento da expressão de APOC3 (3 vezes) em ilhotas pancreáticas se relacionou com desenvolvimento de resistência à insulina e disfunção de células β -pancreáticas, observado pela diminuição na fosforilação de FoxO1 e consequente repressão da expressão de genes, tais como *Irs1* e *Irs2*, que codificam genes responsáveis pela transcrição da proteína substrato do receptor de insulina (IRS). Ainda, o aumento na expressão de APOC3 levou ao aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} e consequentemente, à apoptose de células β -pancreáticas. No presente estudo, o aumento na expressão de APOC3 após a exposição a 50 μ g/kg/dia de BFS pode ser explicado tanto pela ativação da via PPAR como pela diminuição na síntese de insulina e consequente desregulação da cascata de sinalização deste hormônio no pâncreas dos animais expostos a este contaminante.

A análise proteômica do tecido pancreático dos animais expostos a 50 μ g/kg/dia de BFS mostrou ainda a diminuição na expressão de *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_mitochondrial oxidase 2* (HMGCS2), enzima responsável pela conversão de *hidroximetil-glutaril-CoA* (HMG-CoA) em acetoacetato

através da via cetogênica na mitocôndria, a qual é uma enzima limitante na formação de corpos cetônicos (cetogênese) no fígado de ratos (AYTÉ et al., 1990; LANG et al., 2002). Nenhum estudo experimental anterior mostrou que o contaminante BFS desregula a expressão desta enzima. Assim, este é o primeiro estudo que demonstra esta subregulação.

Embora estudos mostrem que a insulina pode inibir a transcrição de *Hmgcs2* (NADAL et al., 2002; RESCIGNO et al., 2018), e que a glicose (25 mM/ células HepG2) pode induzir a expressão do gene que codifica tal proteína, ambas não parecem ser as responsáveis diretas pela modulação da expressão da proteína HMGCS2 no presente estudo, uma vez que não houve alteração nos níveis glicêmicos nos animais expostos a 50 µg/kg/dia BFS. Além disso, a expressão da proteína *insulin-2* no pâncreas dos animais expostos a este contaminante mostrou-se subregulada.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a exposição crônica a doses ambientalmente relevantes dos contaminantes BFA e BFS desencadeia efeitos adversos em ratos machos *Wistar* alterando parâmetros bioquímicos, metabólicos e moleculares. No que diz respeito às análises bioquímicas e aos parâmetros metabólicos estudados, verificou-se que as respostas observadas foram dose-dependentes (50 ou 500 µg/kg/dia) e que para a maioria dos experimentos, alterações significativas nos parâmetros estudados foram observadas após exposição à menor dose dos bisfenóis, o que é explicado pelo fato de estes compostos apresentarem curvas de dose-resposta não-lineares. Além disso, para alguns experimentos, foi observado que o BFS exerceu efeitos semelhantes ao BFA ou até mesmo mais tóxicos, o que permite afirmar que a substituição do BFA pelo seu análogo não é uma alternativa segura e deve ser reconsiderada.

No tecido hepático, a exposição crônica ao BFA e BFS alterou a síntese e a homeostase lipídica, regulou a expressão de proteínas essenciais para manutenção de processos respiratórios mitocondriais, evidenciando uma desregulação no normal funcionamento desta organela e, ainda, alterou a expressão de enzimas antioxidantes, evidenciando um aumento do estresse oxidativo. É importante ressaltar que este é o primeiro estudo proteômico que analisou o tecido pancreático de ratos *Wistar* expostos cronicamente ao BFA e ao BFS. A exposição ao BFS aumentou a expressão de proteínas da via de sinalização PPAR e a exposição a ambos contaminantes diminuiu a expressão de proteínas-chave na regulação da homeostase da glicose, o que evidenciou os prejuízos ao metabolismo energético também neste tecido. De maneira geral, o presente estudo permite uma avaliação mais acurada da toxicidade destes compostos e sua correlação com as alterações bioquímico-metabólicas observadas nos grupos de animais expostos. Em conjunto, estes resultados contribuem para expandir o conhecimento científico de como o BFA e o BFS podem levar ao desenvolvimento de desordens do metabolismo energético e reforçam os riscos associados à exposição a estes contaminantes, principalmente em relação ao uso indiscriminado do BFS em produtos de consumo, o qual ainda carece de regulamentação.

Capítulo II. Avaliação dos efeitos da exposição ao BFA ou BFS no crescimento, viabilidade e no metaboloma intracelular de células HepG2 e INS-1E.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desregulador endócrino BFA tem sido extensivamente investigado quanto ao seu potencial estrogênico (MACKAY e ABIZAID, 2018) e potenciais efeitos adversos à fertilidade humana, reprodução e maturação sexual (ROCHESTER et al., 2013). No entanto, mais recentemente, os efeitos sobre o metabolismo energético vem ganhando maior atenção por parte da comunidade científica, uma vez que a exposição a este contaminante vem sendo associado em estudos transversais e epidemiológicos ao desenvolvimento de doenças metabólicas, tais como obesidade e DMT2 (TRASANDE et al., 2012, ASHLEY-MARTIN et al., 2014, DO et al., 2017). Os efeitos metabólicos adversos do BFA têm sido atribuídos à regulação da secreção e da sensibilidade a insulina (VILLAR-PAZOS et al., 2018), e possíveis consequências à homeostase energética (ALONSO-MAGDALENA et al., 2006; ANGLE et al., 2013; GARCÍA-AREVALO et al., 2014), especialmente o prejuízo da homeostase da glicose (MOON et al., 2015; GALYON et al., 2017) bem como alterações na síntese e metabolismo de lipídeos (MARMUGI et al., 2012; LEJONKLOU et al., 2017; DUNDER et al., 2018).

Como muitos estudos experimentais de toxicidade têm demonstrado que a exposição ao BFA é uma ameaça à saúde animal e humana e desde que vários países começaram a proibir seu uso na fabricação de produtos de consumo (ELADAK et al., 2015), tornou-se evidente o grande aumento no uso de compostos químicos com estrutura análoga ao BFA quando fabricantes de produtos manufaturados começaram a usar alternativas a fim de substituí-lo (PELCH et al., 2019). O BFS, um destes análogos, tornou-se o composto químico mais amplamente utilizado para esta finalidade (WU et al., 2018). No entanto, atualmente existem poucos dados toxicológicos suficientes que suportem a segurança do BFS, e evidências científicas demonstram que este composto químico também possui potencial efeito estrogênico (ROCHESTER e BOLDEN, 2015; NADAL et al., 2018) e que a exposição pode afetar de forma adversa o metabolismo, como por exemplo, levando a efeitos obesogênicos em roedores (IVRY DEL MORAL et al., 2016; AZEVEDO et al., 2019) e à disfunção da secreção de insulina e da homeostase da glicose em peixes-zebra (Zebrafish) machos (ZHAO et al., 2018).

De fato, o resultados do estudo *in vivo* descrito no Capítulo I, que investigou os distúrbios metabólicos sistêmicos desencadeados em ratos *Wistar* por exposição crônica (20 semanas) a baixas doses de BFA ou BFS e os possíveis mecanismos de toxicidade em tecidos importantes para o metabolismo energético (fígado e pâncreas) implicados em tais alterações sistêmicas corroboram a literatura atual. Nossos resultados mostraram que a exposição ao BFA levou à hiperglicemia e hipercolesterolemia nos roedores, enquanto a exposição ao BFS culminou no aumento dos níveis de LDL-C e do ganho de massa corpórea (500 µg/kg/dia). As análises proteômicas dos tecidos hepático e pancreático evidenciaram alterações metabólicas importantes a nível molecular. No fígado, a exposição a ambos os toxicantes (50 µg/kg/dia de BFA ou BFS) aumentou a expressão de glycerol kinase like 1, uma enzima envolvida na síntese de triglicérides e aumentou os níveis de proteínas mitocondriais essenciais da cadeia transportadora de elétrons. No pâncreas, a exposição ao BFA e ao BFS (50 µg/kg/dia) comprometeu a produção de insulina pelas células β-pancreáticas, uma vez a expressão de pré-pró-insulinas (insulina-1 e insulina-2) estava diminuída após a exposição aos contaminantes.

Embora alguns aspectos dos processos patológicos não possam ser totalmente compreendidos sem a avaliação de respostas integradas dos sistemas biológicos, facilmente observados em estudos que utilizam organismos vivos (KENDALL et al., 2018), o uso de sistemas *in vitro* em testes de toxicidade em detrimento de modelos animais é de extrema relevância uma vez que, atualmente, grandes esforços existem a fim de implementar métodos alternativos ao uso de animais no contexto de iniciativas 3Rs - Refinar, Reduzir e Substituir – tanto para promover o uso racional de animais para fins científicos, quanto para reduzir os custos e o tempo gastos no laboratório experimental (NC3Rs, 2019). Além disso, dependendo da questão específica a ser respondida, o uso de modelos *in vitro* é, algumas vezes, ainda mais apropriado que modelos animais. Em estudos que avaliam mecanismos de toxicidade, por exemplo, a avaliação das respostas celulares a contaminantes químicos é particularmente relevante, uma vez que aborda com precisão os mecanismos moleculares específicos desregulados pelos compostos químicos dentro da célula, fornecendo informações relevantes para a elucidação de possíveis vias de toxicidade.

As ferramentas “ômicas” têm sido amplamente utilizadas no campo da toxicologia ambiental, uma vez que tais abordagens podem fornecer informações

abrangentes para melhor compreender os efeitos tóxicos causados pela exposição a contaminantes, trazendo informações adicionais sobre os processos celulares afetados após a exposição química e ajudando na descoberta de vias de toxicidade (RAMIREZ et al., 2018). A metabolômica não-dirigida tem sido útil na descoberta de novos biomarcadores de mecanismos de toxicidade (CHEN et al., 2012). Vários grupos de pesquisa têm trabalhado exaustivamente para caracterizar possíveis mecanismos de toxicidade do BFA usando abordagens metabolômicas distintas e os mais diversos modelos experimentais, tais como embriões de peixe-zebra (ORTIZ-VILLANUEVA et al., 2017), peixe-zebra adultos (YOON et al., 2017), roedores (CABATON et al., 2013; TREMBLAY-FRANCO et al., 2015) e ensaios *in vitro* (YUE et al., 2019). No entanto, ainda existem algumas lacunas nesse campo de investigação, principalmente no que diz respeito aos possíveis mecanismos de toxicidade dos análogos do BFA.

No trabalho apresentado neste capítulo, nós propusemos desenvolver um estudo metabolômico não-dirigido a fim de expandir nossa compreensão sobre os possíveis mecanismos de toxicidade do BFA e BFS que podem levar à desregulação da função molecular normal em células de tecidos que possuem um papel principal na regulação da homeostase energética. Optamos por caracterizar as alterações moleculares intracelulares em HepG2, uma linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano, e em INS-1E, linhagem celular de insulinoma, após exposição a concentrações biológicas relevantes de ambos os contaminantes. HepG2 é um modelo amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de xenobióticos, uma vez que possui alta capacidade de biotransformação de xenobióticos, incluindo bisfenóis (GRAMEC SKLEDAR et al., 2015), e em INS-1E, uma linhagem de células β -pancreáticas de ratos que vêm sendo utilizadas como modelo para avaliar a morte celular induzida por drogas (LORZA-GIL et al., 2018), bem como disfunção celular induzida por contaminantes (WELDINGH et al., 2017).

2. OBJETIVO

Avaliar as alterações na proliferação e na viabilidade celular após a exposição aguda a concentrações biologicamente relevantes dos contaminantes bisfenóis A ou S em diferentes linhagens celulares (HepG2 e INS-1E) e caracterizar as alterações metabólicas que ocorrem seguindo-se diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas) a ambos os compostos.

2.1. Objetivos específicos

I - Avaliar as curvas de crescimento (pelo período de 72 horas) e as taxas de crescimento (pelo período inicial da fase de proliferação celular) de células HepG2 e INS-1E após a exposição a 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 μM de BFA ou BFS;

II - Avaliar a viabilidade celular de HepG2 e INS-1E após 72 horas de exposição à diferentes concentrações de BFA ou BFS (100 - 0,001 μM);

III - Caracterizar as alterações metabólicas que ocorrem em células HepG2 e INS-1E seguindo 24, 48 e 72 horas de exposição à diferentes concentrações de BFA ou BFS (10 - 0,001 μM) através da análise metabolômica não-dirigida dos extratos intracelulares de ambas as linhagens celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Compostos químicos e reagentes

4,4'-sulfonilbisfenol (BFA), 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano (BFS), dietilestilbestrol (DES) e dimetilsulfóxido (DMSO) e metotrexato (pureza química $\geq 99\%$), solução de colágeno tipo I de cauda de rato, soro bovino fetal dialisado (SBFd), piruvato de sódio, HEPES, 2-mercaptoetanol e carbonato de amônio foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Penicilina-estreptomicina (10.000 U/mL de penicilina e 10.000 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) foi adquirida da Invitrogen. Tampão fosfato-salino, tripsina, meio DMEM com elevada glicose e meio RPMI 1640, ambos sem vermelho de fenol, foram obtidos da Thermo Fisher Scientific. Os frascos e placas de cultura celular foram adquiridos da Falcon® (Corning) ou da Thermo Fischer Scientific. Acetonitrila, metanol e todos os solventes utilizados para os procedimentos de extração em metabolômica e análises em espectrometria de massas tinham elevado grau de pureza analítica e foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Água ultrapura, purificada com o sistema de tratamento de água Milli-Q® (Millipore, EUA) foi utilizada durante todo o estudo.

3.2. Manutenção das linhagens celulares

A linhagem celular HepG2, derivada de carcinoma hepatocelular humano, foi gentilmente fornecida pelo professor Markus Stoffel (ETH Zurich, Suíça). As células foram cultivadas em meio DMEM, contendo 10% v/v de SBFd, 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 1 mM de piruvato de sódio. As culturas de células foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm², revestidos com solução de colágeno (1:1000 v/v) e culturas contínuas foram obtidas por subcultura dos a cada 3-5 dias.

A linhagem celular INS-1E, um clone de células INS1 derivadas de ilhotas pancreáticas de insulinoma de rato, foi gentilmente doada pelo professor Pierre Maechler (Universidade de Genebra, Suíça). Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% v/v de SBFd, 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 10 mM de HEPES, 50 μM de 2-mercaptoetanol e 1 mM de piruvato de sódio. As células INS-1E foram cultivadas continuamente por subcultura de frascos

a cada 7 dias e tais células precisavam especialmente de frascos ou placas da marca Falcon® para crescer.

Ambas as linhagens celulares foram mantidas a 37° C em atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% de gás carbônico (CO₂). As células foram sempre cultivadas, passadas, congeladas e utilizadas nos experimentos quando a 70-80% de confluência.

3.3. Contaminantes ambientais - escolha das doses biologicamente relevantes

As concentrações de BFA e BFS escolhidas para serem avaliadas neste estudo compreendem faixas de concentração de BFA reportadas no tecido hepático humano em estudos científicos anteriores (SEACHRIST et al., 2016). Para comparar os efeitos celulares induzidos por ambos os contaminantes, HepG2 e INS-1E foram expostos às seguintes concentrações de BFA e BFS: 100 µM; 10 µM; 1 µM; 0,1 µM; 0,01 µM e 0,001 µM; a 0,1 µM de DES como controle positivo de estrogenicidade, a 0,1% v/v de DMSO como controle de solvente e a 100 µM de metotrexato (MTX), controle positivo de citotoxicidade. Três replicatas técnicas de cada condição de exposição foram incluídas em cada experimento. A concentração das soluções estoque de BFA e BFS preparadas foi 100 mM e da solução estoque de DES foi 50 mM; as soluções estoque foram preparadas em DMSO e a concentração final de DMSO em células expostas aos compostos avaliados foi a mesma concentração administrada ao controle de solvente (0,1% v/v de DMSO).

3.4. Regime de exposição aos contaminantes

3.4.1. HepG2

Para exposição aos compostos químicos, 8×10^3 células foram semeadas em placas Nunclon™ Delta® de 96 poços colagenizadas (100 µL de meio de cultura/poço). Após 4 horas, as células foram expostas aos químicos (100 µL/poço). Os períodos de exposição foram 24, 48 ou 72 horas.

3.4.2. INS-1E

As células INS-1E foram semeadas em placas Falcon® de 96 poços (4×10^4 células/poço), em 200 µL de meio de cultura. Esta linhagem celular foi incubada

inicialmente por 24 horas, tanto para garantir a adequada fixação quanto para permitir o crescimento logarítmico das células. Após as 24 horas, 100 μ L de meio de cultura foram removidos de cada poço e substituídos por 100 μ L de meio fresco contendo as respectivas soluções de tratamento. INS-1E foram expostas aos químicos pelos mesmos períodos que as células HepG2.

3.5. Curvas de Crescimento e Taxas de Crescimento

Após o plaqueamento de ambas as linhagens celulares, a proliferação celular foi monitorada em tempo real pelo instrumento IncuCyte® (Sartorius, Göttingen, Alemanha) que permite a análise do crescimento das células vivas através da captura de imagens obtidas por um microscópio de contraste de fase (5 imagens/poço, objetiva de 10x) a cada 2 horas até o fim do experimento (72 horas). O crescimento celular foi analisado através do algoritmo de confluência integrado do sistema IncuCyte®. As curvas de crescimento foram obtidas plotando a confluência celular (%) pelo tempo para todo o período de exposição. Para avaliar se os tratamentos levaram a uma mudança nas taxas de crescimento (TC) durante as primeiras 12 horas de exposição, as TC foram estimadas ajustando uma curva exponencial aos dados de confluência celular (%) nas primeiras 12 h de exposição (HepG2) ou nas primeiras 24 horas de exposição (INS-1E).

3.6. Estudo de viabilidade celular

Inicialmente, um ensaio de viabilidade celular foi realizado para determinar concentrações de bisfenóis não citotóxicas para as células e que, portanto, seriam relevantes para avaliação das alterações metabólicas celulares pela análise do metaboloma intracelular. Após 72 horas de exposição, as células foram incubadas com 40 μ L de solução reagente CellTiter-Blue® (Promega, Madison, WI, EUA) por 1 hora. Este reagente contém resazurina altamente purificada, um corante usado como indicador para medir a capacidade metabólica das células - células viáveis possuem a capacidade de reduzir o composto resazurina em resorufina, que é uma molécula altamente fluorescente. A leitura da fluorescência foi realizada a 560/590 nm no leitor de placa Tecan Infinite M200 pro (Tecan Group, Männedorf, Suíça). A fluorescência do meio de cultura (background) foi subtraída da fluorescência obtida dos poços experimentais (com amostra). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela

razão entre a fluorescência média de cada condição de tratamento e a fluorescência média do controle de solvente (0,1% v/v DMSO), considerado com 100% de viabilidade.

3.7. Análise Metabolômica

3.7.1. Preparação da amostra para análise de espectrometria de massas por injeção em fluxo (Flow Injection Analysis coupled to mass spectrometry – FIA-qTOF).

Após a exposição, o meio foi cuidadosamente aspirado de cada poço e as células foram lavadas com 120 µL de 75 mM de tampão amônio carbonato (pH 7.4) para remover o meio residual. O tampão foi rapidamente removido e as placas de 96 poços foram colocadas sobre uma superfície de metal congelada para resfriar as células e para o metabolismo celular. As placas foram então seladas com papel adesivo de alumínio e cuidadosamente resfriadas em nitrogênio líquido. As células congeladas nas placas de 96 poços foram acondicionadas a -80° C até a extração dos metabólitos. Os metabólitos intracelulares foram extraídos pelo rompimento das membranas celulares utilizando-se um ponteiro com furo largo como raspador de células e 100 µL de solução de extração (-20° C) contendo uma mistura de 3 solventes (40% de acetonitrila: 40% de metanol: 20% de água). Os extratos celulares foram transferidos para placas de estoque que foram seladas e centrifugadas por 10 min (4 °C; 4.000 g) para remover debris celulares. Os sobrenadantes (20 µL) foram então transferidos para placas de 96 poços (fundo em V), centrifugados por 5 min (4 °C; 4.000 g) e imediatamente colocados no amostrador automático do instrumento (FIA-qTOF) para análise. Todo o procedimento de extração foi conduzido em gelo.

3.7.2. FIA-qTOF e método de aquisição de amostras

O metaboloma intracelular foi obtido pela metabolômica não-dirigida através de FIA-qTOF, utilizando o método high throughput descrito em Fuhrer et al. (2011), desenvolvido e estabelecido pelo professor Nicola Zamboni juntamente com outros pesquisadores do laboratório onde foi realizado este trabalho. As quantificações de metabólitos foram realizadas em uma plataforma equipada com uma bomba Agilent 1200 conectada a um amostrador automático Gerstel CTC e a um espectrômetro de massas Agilent 6550 (Agilent, Santa Clara, CA) do tipo quadrupolo-tempo de voo (qTOF) equipado com fonte de ionização por eletrospray Dual Agilent Jet Stream

operando em modo negativo (tampão modo negativo: isopropanol / água (55:45, v / v com 1 mM de fluoreto de amônio). Para correção do eixo de massa, os compostos ácido 3-amino-1-propanosulfônico e hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi)fosfazina (HP-0921, Agilent Technologies), que possuem massas de referência 138,02 e 940 m/z respectivamente, foram adicionados no tampão de modo negativo. Sempre antes do início da medição das amostras, a calibração do eixo de massa do instrumento era realizada com a solução Agilent Tuning Mix G1969-85000 diluída a 1:10, contendo uma solução com íons com massas conhecidas. Os dados foram adquiridos usando os parâmetros apresentados na Tabela 9. A ordem de injeção das amostras pertencentes aos diferentes grupos de tratamento foi completamente aleatória.

Tabela 9 – Parâmetros de operação do instrumento para as análises de espectrometria de massas por injeção em fluxo.

Parâmetro	
<i>Volume de injeção</i>	5 µL
<i>Injeções por amostra</i>	2 (replicatas técnicas)
<i>Faixa m/z dos espectros de massa adquiridos</i>	50-1000 m/z
<i>Taxa de aquisição</i>	1,4 espectros/segundo
<i>Poder de resolução</i>	4 GHz alta resolução
<i>Temperatura da fonte</i>	225 °C
<i>Vazão do gás de secagem</i>	11L/min
<i>Pressão do nebulizador</i>	20 psig
<i>Voltagem do Vcap</i>	3500 V
<i>Voltagem do bocal</i>	2000 V
<i>Voltagem do fragmentador</i>	350 V
<i>Voltagem do Octopole</i>	750 V

3.7.3. Processamento e análise de dados de metabolômica

Para realizar a análise dos dados, os *datasets* (ou conjunto de dados brutos)

obtidos para cada replicata técnica injetada no espectrômetro de massas foram convertidos em arquivos “.fiaML”, o formato utilizado para a análise de dados. O processamento e análise dos dados foram realizados usando os softwares Matlab R2018a e FiaMiner, este último desenvolvido no próprio laboratório. Os *datasets* foram armazenados em um sistema de armazenamento de dados online, o OpenBis. A primeira etapa da análise de dados no FiaMiner foi “mesclar” todos os *datasets*, o que consiste em alinhar os conjuntos de dados independentes para criar uma lista com todas as intensidades dos íons identificados (picos de m/z) em todas as amostras incluídas em um mesmo experimento. Após esta etapa, a calibração do eixo de massa foi realizada para obter uma maior precisão, através do fornecimento de íons de referência com baixa massa molecular. Os íons outliers (anotação incorreta), com desvios de $m/z > 0,001$ mDa, foram excluídos da análise.

A anotação iônica foi realizada com base na massa identificada dos íons, utilizando como referência a lista de metabólitos do banco de dados *Human Metabolome Database 40* (HMDB40), restringindo a anotação a metabólitos listados como da espécie *Homo sapiens* no banco de dados do KEGG. Além disso, a lista HMDB40 foi expandida a fim de se considerar todos os isótopos naturais e derivados de metabólitos, tais como produtos de ionização (formas desprotonadas e fluoradas) e formação de adutos (K/H, Na/H). Para cada íon identificado, todas as ocorrências possíveis da biblioteca HMDB40 com uma diferença de $m/z \leq 0,001$ Da foram anotadas. Todos os íons que passaram na verificação de massa e identidade foram classificados com base em uma pontuação, que é dada por uma fórmula que leva em consideração a probabilidade de existência de um íon/aduto e integra as diferenças entre a razão m/z teórica e medida. A anotação de íons foi então filtrada com base em suas pontuações e apenas as anotações com as pontuações mais altas (*top score annotations*) foram consideradas para a análise, como por exemplo, os íons desprotonados sobre seus respectivos isótopos. Este procedimento foi importante para manter uma lista de íons de alta confiança para análise estatística. Íons não identificados (não anotados) foram excluídos da análise.

Após a anotação, etapas adicionais de filtragem de íons foram também incluídas para remover artefatos no espectro, tais como picos “fantasmas” (geralmente caracterizados por assimetria de pico e multipletos causados pela detecção) e íons background (com correlação total de contagem de íons $< -0,5$). Além disso, ácidos graxos (C18: 0, C16: 0, ácido oleico e ácido homovanílico), que estão

onipresentes nas as amostras, assim como outros íons com detectados com sinais muito intensos e sinais de ruído, foram excluídos da análise, uma vez que eles geralmente introduzem uma tendência na mineração de dados. Finalmente, as injeções consideradas vazias (intensidade média de íons < 2700 m/z) também foram excluídas da análise.

Após todas as etapas do processo de filtragem dos picos detectados, a normalização média dos dados foi realizada a fim de diminuir a variabilidade inter-amostra e, portanto, permitir comparações significativas entre as amostras analisadas. Os dados foram log transformados antes da normalização para garantir que eles estivessem mais próximos da distribuição normal (valores ruins foram definidos como 1) para evitar a obtenção de uma normalização influenciada pelos picos mais intensos. A análise de reprodutibilidade foi realizada antes e após o processo de normalização dos dados, para avaliar se este procedimento diminuiu o FDR dos controles de batch (teste de significância: variância desigual do teste t (Welch), $p < 0,05$). Análise estatística multivariada (Principal Component Analysis - PCA) (Método de Componentes Principais) foi usada para detectar os agrupamentos intrínsecos e a variação dos dados antes e após a normalização dos dados. O primeiro e o segundo componentes principais foram representados no PCA (método de normalização aplicado: z-score).

Finalmente, foi realizada análise diferencial para encontrar os metabólitos que discriminavam entre as amostras tratadas e não-tratadas. As análises diferenciais foram realizadas entre amostras tratadas durante mesmo período de tempo (24, 48 ou 72h) e pertencentes à mesma linhagem celular (INS-1E ou HepG2). O teste t de Student foi utilizado para determinar os metabólitos que diferiram significativamente entre os grupos na condição de valor de p ajustado (Benjamini e Hochberg-BH) $p \leq 0,01$ e FC = 1,5.

3.8. Análise Estatística

As curvas de crescimento e os gráficos de taxas de crescimento foram gerados no *software* R (versão 3.6.1), o gráfico de dose-resposta foi gerado no *software* MATLAB R2018a e os gráficos de viabilidade foram gerados no *software* GraphPad Prism 6.0. Os softwares R e GraphPad Prism foram utilizados para todas as análises estatísticas. Os dados de curvas de crescimento, dose-resposta e viabilidade estão

expressos como média $\pm$ EPM. Os dados das taxas de crescimento estão expressos como mediana $\pm$ DP. Para avaliar as diferenças entre os grupos expostos, usamos o teste t de *Student*, ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias, quando apropriado (análises seguidas por pós-testes descritos em cada gráfico). Quando os dados não passaram no teste paramétrico (teste shapiro), foi utilizado o teste de Wilcoxon. Um nível de probabilidade de $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para esta análise de dados. Os dados do estudo metabolômico foram analisados pelo software FiaMiner, o qual é processado usando a plataforma MATLAB R2018a. As análises estatísticas realizadas durante as análises de dados de metabolômica estão detalhadamente descritas na seção

4. RESULTADOS

4.1. Curvas e taxas de crescimento de HepG2 após a exposição a diferentes concentrações de BFA e BFS

Culturas celulares saudáveis crescem exponencialmente e uma curva de crescimento típica exibe um formato particular onde é possível observar uma fase de latência (fase lag) inicial, onde o crescimento é quase ausente; seguida por uma fase de aceleração, onde as taxas de crescimento aumentam até que elas atinjam uma fase exponencial de crescimento (onde o crescimento é constante); e finalmente, o crescimento começa a decrescer (fase de desaceleração) até que as células parem de crescer por causa da falta de recursos ou acúmulo de produtos de degradação celular (fase de saturação) (HALL et al., 2014). A exposição às substâncias tóxicas pode diminuir as taxas de crescimento celular e, portanto, mudar o formato esperado das curvas de crescimento de uma linhagem celular específica.

A Figura 30 mostra as curvas de crescimento representadas pelas porcentagens (%) de confluência celular obtidas após exposição ao BFA (100 a 0,001 μM), ao controle de diluente (0,1% v/v DMSO) e aos controles positivos de estrogenicidade (DES 0,1 μM) e citotoxicidade (100 μM MTX) em diferentes momentos. A maior concentração de BFA (100 μM) produziu a maior redução da confluência celular em comparação com o controle exposto a DMSO. Após 32 horas de exposição, o BFA 100 μM reduziu significativamente a confluência celular para cerca de 36% quando comparado ao DMSO, atingindo uma redução de 50% após 72 horas de exposição. De forma interessante, 10 e 1 μM de BFA não causaram alterações significativas no crescimento celular quando comparado ao DMSO, no entanto, foi observada uma tendência de promoção do crescimento. A exposição a concentrações mais baixas, 0,1 e 0,01 μM de BFA, reduziu significativamente a confluência celular para cerca de 35% e 25%, respectivamente, em comparação com o DMSO após 72 horas de exposição. Essa redução foi semelhante à observada para o controle positivo da estrogenicidade (28% após 72 horas de exposição). Esses resultados mostram claramente que a exposição a diferentes concentrações de BFA pode causar diferentes desfechos para o crescimento celular de HepG2 e que, mesmo as concentrações mais baixas, as que são comparáveis com concentrações

às quais os seres humanos estão expostos no tecido hepático, comprometem o desenvolvimento celular.

Figura 30. Curvas de crescimento de HepG2 após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μM de BFA; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μM de DES e 100 μM de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.

Após a exposição ao BFS (Figura 31), um padrão semelhante foi observado, uma vez que a maior concentração (100 μM de BFS) teve o maior impacto no crescimento quando comparado ao grupo exposto ao DMSO, uma vez que foi observada uma redução de 42% na confluência de HepG2 após 34 horas de exposição. A exposição a 1 e 0,1 μM de BFS também reduziu significativamente o crescimento celular quando comparado ao DMSO, levando a aproximadamente 30% menos células. Por outro lado, a exposição a 0,01, 0,001 e 10 μM de BFS não produziu alterações na confluência celular em comparação com o DMSO. Além disso, considerando as três concentrações mais baixas avaliadas neste estudo (0,1, 0,01 e 0,001 μM de BFA ou BFS), a exposição à concentração de 0,1 μM produziu a maior redução da confluência celular em comparação ao DMSO.

Figura 31. Curvas de crescimento de HepG2 após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μM de BFS; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μM de DES e 100 μM de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.

A Figura 32 representa as curvas dose-resposta obtidas após 72 horas de exposição às diferentes concentrações de ambos os contaminantes. Os efeitos causados pelo BFA e BFS no crescimento de HepG2 foi caracterizado por curvas DRNM, que são respostas biológicas comuns a hormônios e químicos desreguladores endócrinos, caracterizadas por relação não-linear entre a dose e o efeito causado pela exposição a substância química (BEAUSOLEIL et al., 2013).

Figura 32. Curvas dose-resposta não-monotônicas (% de confluência celular) 72 horas após a exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μM de BFA ou BFS.

A quantificação da taxa de crescimento celular, de uma maneira muito simplista, mede a duração do ciclo celular e, portanto, é uma função da taxa de divisão celular por unidade de tempo. Por isso, taxas de crescimento têm sido usadas a algum tempo em várias áreas para quantificar propriedades fenotípicas e, mais recentemente, para quantificar fenótipos em estudos ambientais (SHERLEY et al., 1995; HALL et al., 2013). Isso é possível uma vez que a taxa de crescimento de uma linhagem celular, em condições ótimas, é relativamente constante na fase de crescimento logarítmica, tornando possível o seu cálculo. No entanto, sob condições estressantes tais como a exposição a contaminantes ambientais, a taxa de crescimento pode mudar, seja para se adaptar às condições de exposição ou como um efeito direto do composto químico na regulação do ciclo celular e proliferação.

As taxas de crescimento de HepG2 foram calculadas tendo como base os dados de confluência obtidos na janela de 12 horas correspondente às primeiras horas de exposição aos produtos químicos (6 a 18 horas). A quantificação das taxas de crescimento nessa janela de exposição específica fornece informações relevantes sobre os efeitos das drogas na fase inicial da proliferação celular de HepG2, após as primeiras horas de exposição aos contaminantes, uma vez que essas células se dividem rapidamente e atingem a fase de crescimento exponencial em poucas horas após a semeadura nos poços. As células HepG2 apresentaram taxas de crescimento significativamente menores após a exposição às concentrações mais altas de BFA e BFS (100 μ M) quando comparadas ao DMSO (redução de 34% e 35% em comparação ao DMSO, respectivamente). Além disso, 0,1 μ M de ambos BFA e BFS diminuíram significativamente as taxas de crescimento de HepG2 quando comparado ao DMSO (redução de 30% e 26%, respectivamente), enquanto a exposição a 1 μ M de BFS induziu uma redução significativa de 22% nas taxas de crescimento em comparação ao grupo controle (Figura 33).

Figura 33. Taxas de crescimento de HepG2 obtidas nas primeiras 12 horas de exposição às diferentes concentrações [100 - 0,001 μM] de BFA; diferentes concentrações [100 - 0,001 μM] de BFS; 0,1 μM de DES; 0,1% v/v DMSO e 100 μM de MTX. Teste de normalidade de Shapiro, seguido pelos testes T de Student (para dados paramétricos) ou Wilcoxon (dados não paramétricos). * $p \leq 0,05$ vs controle, ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.

Estes resultados estão alinhados com os resultados obtidos para as curvas de crescimento de HepG2 após a exposição aos contaminantes, exceto quanto à exposição a 0,01 μM de BFA, que diminuiu significativamente a confluência celular (Figura 30), porém não alterou as taxas de crescimento de HepG2. Isso pode ser explicado pelo fato de que, especialmente nessa janela de exposição (6 a 18 horas), a exposição ao BFA 0,01 μM não afetou a taxa de crescimento de HepG2 em comparação ao controle. Isso pode ser possível porque a exposição ao BFA 0,01 μM teve efeitos tardios na proliferação celular, embora ainda pronunciados (Figura 33).

Além disso, é possível inferir a partir dos dados das curvas e das taxas de crescimento, que os efeitos do BFA e BFS diferem nesta linhagem celular. Embora as alterações mais significativas ocorram após a exposição à concentração mais elevada (100 μM) e a 0,1 μM de ambos os compostos, o BFS também diminuiu a confluência e o crescimento celular a 1 μM , enquanto o BFA não teve efeitos estatisticamente significativos nessa concentração, mas afetou a confluência celular a 0,01 μM . Portanto, a intensidade dos efeitos observados são estritamente dependentes da concentração do composto e do período da exposição, o que pode

ser possível devido aos efeitos específicos do composto químico, tais como a seletividade e especificidade do composto pelo receptor (LI et al., 2018) e o efeito da concentração da droga no número e na sensibilização dos receptores, outro mecanismo bem estudado que explica as curvas DRNM observadas para substâncias endócrinas (ISMAIL e NAWAZ, 2005).

4.2. Viabilidade celular de HepG2

A avaliação da viabilidade celular por ensaios *in vitro* com cultura de células permite estimar a porcentagem de populações de células saudáveis, seja contando diretamente o número de células vivas ou medindo sua capacidade metabólica. Esses ensaios são comumente usados em testes de toxicidade para avaliar a capacidade de um composto de causar morte celular, revelando o potencial tóxico de uma substância para uma linhagem celular específica. Diferentemente de um ensaio de proliferação (como o monitoramento da confluência celular ao longo do tempo), um ensaio de viabilidade não fornece qualquer informação sobre o número de células que se divide ativamente em uma população, nem diferencia células quiescentes de senescentes (COBB, 2019).

A viabilidade celular de HepG2 foi determinada após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de BFA e BFS (Figura 34). De acordo com a resposta DRNM observada para o crescimento de HepG2, após 72 horas de exposição a 100 e 0,001 μM de BFA, a viabilidade de HepG2 diminuiu drasticamente em 62% e 39%, respectivamente, em comparação com o DMSO (Figura 34-A). Para o BFS, a exposição a 100 μM não induziu alterações significativas na viabilidade de HepG2, no entanto, a exposição a 0,001 μM de BFS promoveu um efeito benéfico na viabilidade em comparação ao controle (Figura 34-B).

Figura 34. Viabilidade celular de HepG2 após 72 horas de exposição a (A) diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFA, 0,1% v/v DMSO, 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX; (B) diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS, 0,1% v/v DMSO, 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. * $p \leq 0,05$ vs controle, ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.

Novamente, após a exposição às diferentes concentrações de BFA, foi possível observar curvas dose-resposta não-lineares, uma vez que os efeitos mais pronunciados sobre a viabilidade celular de HepG2 foram observados após a exposição à concentração mais elevada e à concentração mais baixa de BFA (100 μ M e 0,001 μ M, respectivamente). Como este ensaio mediu a capacidade metabólica das células viáveis como explicado anteriormente, através da redução da resazurina

em resorufina pela população de células, este ensaio evidenciou que a exposição ao BFA é citotóxica e pode reduzir a porcentagem de HepG2 vivas mesmo em concentrações mais baixas (0,1 - 0,001 μM de BFA). Esses resultados corroboram vários estudos experimentais *in vitro* que também demonstraram que a exposição ao BFA produziu curvas DRNM em ensaios de viabilidade (revisado em VANDENBERG et al., 2014).

4.3. Curvas de crescimento e taxas de crescimento de INS-1E após a exposição a diferentes concentrações de BFA ou BFS

A exposição a 100 μM de BFA reduziu significativamente a confluência de INS-1E em comparação ao grupo controle após 10 horas de exposição (redução de 8,5%), atingindo uma redução de 60,8% após 72 horas de exposição (Figura 35). Curiosamente, 1 μM de BFA teve um efeito benéfico na confluência celular em comparação ao controle após 24 horas de exposição (aumento de 6,5%), efeito que parcialmente se manteve até o final do período de exposição (72h, aumento de 3,4%). A exposição a 0,001 μM de BFA levou a pequenos aumentos na confluência celular em comparação com o controle após 38 horas (aumento de 5%), 64-68 horas (aumento de cerca de 3,5%) e 72 horas (aumento de 3,4%) após a exposição; no entanto estes aumentos não foram consistentes ao longo do período de exposição.

Figura 35. Curvas de crescimento de INS-1E após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μM de BFA; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μM de DES e 100 μM de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.

Considerando a exposição às diferentes concentrações de BFS (Figura 36), apenas a exposição a maior concentração (100 μ M) levou a uma redução significativa na confluência de INS-1E em comparação com o DMSO. Esta redução foi de cerca de 10%, observado após as primeiras 14 horas de exposição, até aproximadamente 31%, redução observada no final do período de exposição (72 horas). Esses resultados demonstram claramente que a exposição à maior concentração de BFA inibiu completamente a proliferação celular de INS-1E, um efeito que é distinto da citotoxicidade ou toxicidade em geral, porém um efeito extremamente drástico, uma vez que ocasiona perda de células funcionais.

Figura 36. Curvas de crescimento de INS-1E após 72 horas de exposição a 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 μ M de BFS; 0,1% v/v DMSO; 0,1 μ M de DES e 100 μ M de MTX. ANOVA 2 vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p \leq 0,05$ vs controle.

Diferentemente de HepG2, as taxas de crescimento de INS-1E foram calculadas para 2 janelas de exposição específicas: (1) janela 1 de exposição (J1): as primeiras 12 horas de exposição (da 26^a a 38^a hora de exposição); (2) janela 2 de exposição (J2): as 12 horas que se seguiram (da 38^a a 50^a hora de exposição). As taxas de crescimento foram calculadas em dois períodos distintos, uma vez que as células INS-1E não haviam atingido a fase de crescimento exponencial durante a J1 (elas ainda estavam em fase de aceleração). Na J1 (Figura 37), foi possível verificar que 100 μ M de BFA inibiu significativamente o crescimento de INS-1E ($GR = 0 \text{ h}^{-1}$) enquanto 100 μ M de BFS diminuiu significativamente a taxa de crescimento em comparação com o controle (redução de 78,3%). Além disso, a exposição a 10 μ M de BFA levou a uma redução significativa na taxa de crescimento em comparação ao controle (redução de 12,1%).

Figura 37. Taxas de crescimento de INS-1E obtidas para a janela 1 de exposição à diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFA; diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS; 0,1 μ M de DES; 0,1 % v/v DMSO e 100 μ M de MTX. Teste de normalidade de Shapiro, seguido pelos testes T de Student (para dados paramétricos) ou Wilcoxon (dados não paramétricos). ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.

Na J2 (Figura 38), as células INS-1E expostas a 0,001 μ M de BFA também apresentaram taxas de crescimento significativamente menores em comparação ao controle DMSO (redução de 1,6%) e, de forma interessante, as células expostas a 10 μ M de BFS tiveram um aumento estatisticamente significativo nas taxas de crescimento comparado ao controle (aumento de 9,7%). Ainda, nesta janela de exposição, INS-1E expostas a 100 μ M de BFA apresentaram uma taxa de crescimento muito baixa e as células expostas a 100 μ M de BFS apresentaram uma redução na taxa de crescimento comparável àquela verificada na J1 (redução de 79,4% em comparação ao controle).

Figura 38. Taxas de crescimento de INS-1E obtidas para a janela 2 de exposição à diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFA; diferentes concentrações [100 - 0,001 μ M] de BFS; 0,1 μ M de DES; 0,1 % v/v DMSO e 100 μ M de MTX. Teste de normalidade de Shapiro, seguido pelos testes T de Student (para dados paramétricos) ou Wilcoxon (dados não paramétricos). * $p \leq 0,01$ vs controle, ** $p \leq 0,01$ vs controle, *** $p \leq 0,001$ vs controle.

4.4. Viabilidade celular de INS-1E

A viabilidade celular de INS-1E reduziu significativamente após 72 horas de exposição a 100 μ M de BFA (redução de 64,7%, Figura 39-A) e a 100 μ M de BFS (diminuição de 81%, Figura 39-B), ambos comparados ao controle, o que indica que a exposição à maior concentração de ambos os contaminantes induziu uma grande perda da capacidade metabólica de INS-1E, sendo que o BFS foi tão tóxico quanto o BFA neste ensaio. Houve uma tendência de aumento da viabilidade celular após a exposição a todas as outras concentrações de BFA, embora não estatisticamente diferente do controle, evidenciando um aumento da atividade metabólica e do potencial de redução intracelular quando as células foram expostas às menores concentrações de BFA, uma vez que a rezasurina monitora a atividade de enzimas redutoras (mitocondriais e citosólicas) das células vivas (RAMPERSAD, 2012).

Figura 39. Viabilidade celular de INS-1E após 72 horas de exposição a (A) diferentes concentrações [100 - 0,001 µM] de BFA; 0,1% v/v DMSO; 0,1 µM de DES e 100 µM de MTX; (B) diferentes concentrações [100 - 0,001 µM] de BFS; 0,1% v/v DMSO; 0,1 µM de DES e 100 µM de MTX. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. *** $p \leq 0,001$ vs controle.

4.5. Análise dos dados de metabolômica

Análises de metabolômica não-dirigida dos extratos intracelulares de HepG2 e INS-1E foram realizadas com o objetivo de investigar as vias desreguladas pelo BFA e BFS que poderiam ajudar a explicar como esses compostos afetam a homeostase

energética e, por fim, levam à desregulação metabólica. HepG2 e INS-1E foram as linhagens celulares escolhidas para este estudo, uma vez que essas células desempenham papéis importantes na regulação da homeostase e energética do organismo como um todo, como por exemplo, na síntese e metabolismo lipídico (HepG2) e na homeostase da glicose (INS-1E).

Como a exposição à concentração mais alta (100 μM) de ambos os compostos levou a efeitos citotóxicos significativos em ambas as linhagens celulares (HepG2 e INS-1E), como observado nas curvas de crescimento e nos ensaios de viabilidade, esta concentração foi excluída do experimento de metabolômica. Considerando todas as diferentes condições incluídas neste experimento, tais como os três períodos de exposição avaliados (24, 48 e 72h); as duas diferentes linhagens celulares em estudo (HepG2 e INS-1E); as 5 concentrações distintas de BFA ou BFS avaliadas em triplicata (10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 μM de BFA ou BFS), o controle positivo (0,1 μM de DES) e o controle de solvente (0,1% v/v DMSO, para o qual foram preparadas 9 réplicas técnicas); e considerando-se que cada replicata técnica foi injetada duas vezes no instrumento, o número total de *datasets* incluídos para a análise metabolômica foi 504 (84 *datasets* por período amostrado e por linhagem celular). Como duas amostras foram detectadas como injeções vazias (correspondendo a duas replicatas técnicas, uma amostra exposta a 0,1 μM de BFA e outra a 0,001 μM de BFS, ambas de HepG2), o número final de conjuntos de dados analisados foi 500.

Após o alinhamento de todos os *datasets*, o total de íons detectados em todas as amostras (removendo picos fantasmas) foi 12,376 e o número total de íons anotados de acordo com o HMDB40, considerando apenas íons com elevados *scores*, foi 354. Além disso, após a remoção de artefatos, ácidos graxos e dyhydrobiopterin (m/z : 238.0944), que foi o íon com a mais alta variação entre as amostras (Figura 40), 348 íons foram anotados para a análise dos dados.

Figura 40. Variação de íons interamostra dos 25 íons mais intensos detectados em todas as amostras de extratos celulares incluídas para as análises de qTOF.

Um PCA com todos os *datasets* foi então plotado após todas as etapas de pré-processamento de dados (Figura 41). Os dados obtidos de HepG2 e INS-1E estavam claramente separados no primeiro componente principal. Além disso, embora os dados de HepG2 obtidos de amostras coletadas após 24 e 48 horas se agrupassem no PCA (pontos azuis escuros e azuis claros), os dados de amostras coletadas após 72 horas de exposição não se agrupavam com os demais tempos. Após a normalização pela média de todos os *datasets*, ainda foi possível observar a separação dos dados obtidos por diferentes tempos de exposição e por linhagens celulares (Figura 42).

Figura 41. Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais) representando o primeiro e segundo componentes principais de todos os datasets obtidos antes do pré-processamento dos dados. Método de normalização: z-score.

Figura 42. Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais) representando o primeiro e segundo componentes principais de todos os dados normalizados pela média e log transformados. Método de normalização: z-score.

As análises de reprodutibilidade dos controles “batch” também foram realizadas antes e após a normalização dos dados. Os resultados são apresentados na Tabela 10. A normalização de todos os dados pela média reduziu a FDR dos controles de “batch” e, portanto, foi capaz de reduzir a variabilidade interamostra.

Tabela 10 – Análise de reprodutibilidade realizada antes e após a normalização dos dados representando a FDR dos controles de “batch”. Variância Desigual do teste t (Welch).

	Log2 (FC) a FDR 5%
<i>Dados sem normalização</i>	0,242
<i>Dados normalizados pela média</i>	0,095

Uma vez que os PCAs confirmaram que os dados estavam agrupados por tempo de amostragem e por linhagem celular, as análises diferenciais foram conduzidas entre as amostras expostas (tratadas com BFA, BFS ou DES) vs amostras não-expostas (controle de solvente) que pertenciam à mesma linhagem celular (HepG2 ou INS-1E) e que foram expostas pelo mesmo período de tempo (24, 48 ou 72h). Dessa forma, foram realizadas um total de 66 análises diferenciais, 33 análises diferenciais para células HepG2 tratadas e 33 para células INS-1E tratadas, dentre as quais 11 análises diferenciais foram realizadas por tempo de amostragem (após 24, 48 ou 72 horas de exposição aos contaminantes): 5 análises diferenciais entre as diferentes concentrações [10 – 0,001 μM] de BFA vs controle; 5 análises diferenciais entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFS vs controle; e 1 análise diferencial entre 0,1 μM de DES vs controle.

4.5.1. Análise dos dados de metabolômica de HepG2

Os resultados de todas as análises diferenciais conduzidas para HepG2 estão no *bubble grid* representado na Figura 43. Essas análises demonstram que as alterações mais relevantes no metaboloma apareceram após 48 e 72 horas de exposição aos contaminantes, evidenciando que a desregulação metabólica causada pelos bisfenóis não ocorre imediatamente após a exposição.

Figura 43. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de HepG2 entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFS vs DMSO; e 0,1 μ M de DES vs DMSO após 24, 48 e 72 horas de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa log2(FC). Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [FC = 1,5; $p \leq 0,01$].

Após 48 horas de exposição (Figura 44), os efeitos mais significativos no metaboloma de HepG2 foram observados após a exposição a 0,1 μM de BFA e a 0,1 e 0,001 μM de BFS. Curiosamente, levando em consideração a exposição às concentrações mais baixas de bisfenóis, a concentração de 0,1 μM (de ambos BFA e BFS) também foi a que mais reduziu a confluência celular e a taxa de crescimento de HepG2, 12 horas após a exposição.

Figura 44. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de HepG2 entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μM] de BFS vs DMSO; e 0,1 μM de DES vs DMSO após 48 de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa $\log_2(\text{FC})$. Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [FC = 1,5; $p \leq 0,01$].

As células HepG2 expostas a 0,1 μM de BFA exibiram níveis significativamente reduzidos de alguns aminoácidos (aas), tais como os aas de cadeia ramificada valina (Val), isoleucina (Ile) e leucina (Leu); e os aas aromáticos fenilalanina (Phe) e treonina (Thr). A mesma concentração de BFS (0,1 μM) regulou níveis de Thr e de seu derivado, glicina, enquanto 0,001 μM de BFS regulou níveis de glutamato, fosfofoserina (que pode ser convertida em serina na célula) (MURRAY et al. 2014) e acetil-aspartato, fonte de acetato na célula (PROKESCH et al., 2016). Todos estes aas são utilizados na síntese de moléculas que são intermediários importantes em reações químicas envolvidas na síntese de energia na célula viva, desta forma ambos BFA e BFS regulam vias do metabolismo energético nas células HepG2.

Curiosamente, após 48 horas, a exposição a 0,1 μM de BFA aumentou significativamente os níveis de ácido eicosatrienóico, que é formado a partir do ácido

linoleico, pertencente à via do metabolismo do ácido alfa (α)-linolênico e do ácido linoleico (NAUGHTON et al., 2016) e, a exposição a mesma concentração de BFS (0,1 μ M) levou a um aumento significativo dos níveis de ácido araquidônico, que é sintetizado a partir do supracitado ácido eicosatrienóico. Estes resultados evidenciam que ambos os bisfenóis, a 0,1 μ M, afetam a via do ácido eicosatrienóico. Além disso, após 72 horas de exposição, a via do metabolismo do ácido α -linolênico e do ácido linoleico ainda estavam desreguladas por ambos os contaminantes (Figura 44), no entanto em uma maior extensão (e após a exposição a 10 μ M de BFA e a 0,1 μ M de BFS), uma vez que a exposição a ambos os compostos aumentaram significativamente não somente os níveis dos ácidos eicosatrienóico e araquidônico, mas também os níveis de ácido docosahexaenóico (C22:6), o produto final derivado de várias etapas de reações de dessaturação e alongamento do ácido α -linolênico (DOMENICHELLO et al., 2015). Os níveis aumentados de C22:6 evidenciam que esse metabólito do ácido araquidônico está sendo gerado em maior extensão nas células HepG2 expostas a esses contaminantes.

Figura 45. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de HepG2 entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFS vs DMSO; e 0,1 μ M de DES vs DMSO após 72 de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa $\log_2(FC)$. Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [FC = 1,5; $p \leq 0,01$].

Ainda, foi possível verificar que a exposição ao BFA desencadeou um maior número de alterações metabólicas em comparação ao BFS no metaboloma de HepG2 após 72 horas (Figura 44). A exposição a todas as concentrações de BFA diminuiu significativamente os níveis de dois nucleosídeos de purina: inosina e hipoxantina,

que são produtos da degradação de adenosina 5'-monofosfato (AMP); e de uridina (não estatisticamente diferente a 10 μ M de BFA), um nucleosídeo de pirimidina (MURRAY et al., 2014). Além disso, os nucleotídeos de purinas AMP e guanosina-5'-monofosfato (GMP), bem como a pirimidina monofosfato de uridina (UMP), também apresentaram níveis diminuídos em comparação ao controle após a exposição a 10 e 1 μ M de BFA (GMP também apresentou níveis reduzidos após a exposição a 0,001 μ M de BFA). A exposição às concentrações mais baixas de BFS foi capaz de reduzir significativamente os níveis de hipoxantina (0,1 μ M de BFS) e de inosina (0,1-0,001 μ M de BFS).

De forma interessante, HepG2 apresentou níveis significativamente aumentados de glicerol fosfato após 24 horas de exposição a 10 μ M de BFA (vs controle), porém após 72 horas, os níveis detectados do mesmo metabólito estavam significativamente reduzidos (vs controle) nos extratos celulares após a exposição a 10, 1 e 0,1 μ M de BFA. Estes resultados mostram que o BFA regula positivamente a síntese de glicerol fosfato em um primeiro momento (24 horas) porém com o passar do tempo de exposição, os níveis deste metabólito passam a estar diminuídos (72 horas), possivelmente porque o glicerol fosfato esteja sendo consumindo em vias metabólicas onde ele é substrato para formação de moléculas altamente energéticas, como na síntese de triglicérides (TGs) (COLEMAN e LEE, 2004).

4.5.2. Análise dos dados de metabolômica de INS-1E

A análise do metaboloma intracelular das células INS-1E expostas a diferentes concentrações de BFA e BFS (variando de 10 a 0,001 μ M) nos diferentes tempos de exposição em que as células foram amostradas revelou que os contaminantes induziram alterações nas intensidades de metabólitos após períodos mais prolongados de exposição (após 48 e 72 horas). Curiosamente, a exposição ao controle positivo, na concentração avaliada (0,1 μ M de DES), não afetou os níveis de nenhum metabólito nos períodos estudados. Após 48 e 72 horas de exposição aos contaminantes, diferentes concentrações de BFA induziram mais alterações metabólicas quando comparadas às diferentes concentrações de BFS (Figura 45).

Figura 46. Bubble grid representando todas as análises diferenciais de INS-1E entre as diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFA vs DMSO; diferentes concentrações [10 - 0,001 μ M] de BFS vs DMSO; e 0,1 μ M de DES vs DMSO após 24, 48 e 72 horas de exposição aos contaminantes. O tamanho da bolha representa o valor de p, a intensidade da cor da bolha representa $\log_2(\text{FC})$. Os metabólitos diferencialmente expressos estão destacados em preto [FC = 1,5; $p \leq 0,01$].

Às 48 horas, a grande maioria das alterações observadas no metaboloma de INS-1E foi obtida após a exposição às concentrações mais baixas de BFA, variando de 0,1 μ M a 0,001 μ M. Em nosso estudo, muitas ceramidas (CER), incluindo C16, C18, C18:1, C22 e C24:1, apresentaram-se significativamente aumentadas após exposição a 0,1, 0,01 e 0,001 μ M de BFA, sendo que a exposição às diferentes concentrações avaliadas de BFS não alterou a expressão de CER nesta linhagem celular.

Além disso, assim como nas células HepG2, também foi possível observar um grande aumento nos níveis de metabólitos envolvidos no metabolismo do ácido α -linolênico e linoleico após 72 horas de exposição ao BFA, principalmente após exposição a 1 μ M, mas também após exposição a 0,01 e 0,001 μ M de BFA. Dentre estes metabólitos estão incluídos: ácido araquidônico; ácido eicosapentaenóico; ácido eicosatrienóico; ácido epoxi-eicosatrienóico; e leucotrienos A4 e B4. O BFS (10 e 1 μ M) desregulou somente os níveis de ácido eicosapentaenóico (vs controle). Assim, tanto o BFA quanto o BFS parecem exercer um papel importante na regulação de ácido araquidônico ou de seus precursores e metabólitos em ambas as linhagens celulares estudadas.

5. DISCUSSÃO

As curvas DRNM observadas para as curvas e para as taxas de crescimento de HepG2 após a exposição a ambos os contaminantes já foram descritas em vários estudos toxicológicos que avaliaram o efeito da exposição a diferentes concentrações de BFA em uma variedade de sistemas biológicos, incluindo células cultivadas, experimentos *in vivo* e estudos de populações expostas (revisado em VANDENBERG et al., 2014). Além disso, nossos resultados mostram outro efeito que vêm recebendo atenção significativa da comunidade científica quanto à exposição a desreguladores endócrinos, os efeitos deletérios após a exposição a concentrações consideradas baixas, por estarem em uma faixa de concentração a qual os seres vivos estão efetivamente expostos, ou ainda, por serem concentrações inferiores às utilizadas em estudos tradicionais de avaliação de toxicidade (MELNICK et al., 2002). Diversos estudos anteriores reportaram efeitos em baixas doses para o BFA em vários desfechos, tais como aumento da inflamação, adiposidade, resistência à insulina e efeitos adversos na fertilidade e no desenvolvimento neurológico (ALONSO-MAGDALENA et al., 2010; ANGLE et al., 2013; YANG et al., 2016). Concomitantemente, resultados de estudos *in vitro* claramente confirmam que, de fato, existem evidências concretas de curvas DRNM para o BFA (VILLAR-PAZOS et al., 2018).

Além disso deve-se destacar que, no presente estudo, a maior concentração testada de ambos os compostos teve o maior potencial citotóxico nas células HepG2, causando a maior redução no potencial de crescimento celular, um efeito semelhante ao observado após a exposição a droga com conhecido potencial citotóxico, o MTX. Esses resultados são concordantes com o que é postulado pela toxicologia tradicional - que concentrações mais altas das substâncias químicas devem ter efeitos mais pronunciados (VANDENBERG et al., 2019). Embora a regulamentação de produtos químicos tóxicos ainda se baseie nesse conceito, o que é verdadeiro para a maioria dos produtos químicos quando a toxicidade de concentrações extremamente elevadas é avaliada, é importante levar em consideração as curvas DRNM e os efeitos à baixas doses comumente verificados em diferentes estudos toxicológicos após a exposição a desreguladores endócrinos, a fim de se conduzir uma abordagem

satisfatória para a regulação destes compostos, considerando-se concentrações que são relevantes para a avaliação do risco associado à exposição humana.

Vandenberg et al. (2014) escreveram uma revisão de literatura sobre os estudos *in vitro* que avaliaram o BFA publicados entre 2007 e 2013, a fim de determinar a frequência de respostas não- monotônicas ao BFA. Eles concluíram que estudos que avaliaram a exposição a uma faixa mais ampla de concentrações eram mais propensos a identificar curvas DRNM em comparação àqueles que avaliaram uma faixa menor de doses. Isto foi confirmado pelos nossos resultados que avaliaram a proliferação e a viabilidade celular de HepG2, uma vez que curvas DRNM foram observadas após avaliação de 6 concentrações diferentes de BFA. Embora não tenhamos verificado curvas DRNM após a exposição ao BFS no ensaio de viabilidade, foram observados efeitos após exposição à baixas doses, uma vez que a menor concentração desse composto foi capaz de induzir um elevado aumento da capacidade metabólica de HepG2. Esses resultados demonstram a importância de se investigar os efeitos desses químicos em doses baixas e muito baixas, mesmo os efeitos de concentrações pico-molares, que não foram cobertas pelo nosso estudo, porém extremamente importantes, pois ainda estão na faixa de exposição humana.

O efeito inibitório sobre a proliferação celular de INS-1E observado para a maior concentração de BFA foi um efeito semelhante àqueles já demonstrados na literatura, onde altas doses de hormônios e análogos de hormônios podem inibir a proliferação celular, inclusive de células de insulinoma (AOKI et al., 2014; SONG et al., 2017). Além disso, um ligeiro aumento na proliferação de INS-1E foi observado após a exposição a 1 e a 0,001 μ M de BFA. A proliferação celular também é um sinal de citotoxicidade celular que não exclui a possibilidade de ocorrer efeitos tóxicos (WELSHONS et al., 2003). Embora não tenha sido drástico, esse também foi um efeito não-monotônico. Ainda é importante mencionar que o BFA é mais tóxico que o BFS para células de INS-1E, uma vez que o BFS somente exibiu potencial citotóxico nesta linhagem celular após a exposição à concentração mais elevada, não sendo capaz de inibir completamente a proliferação celular como a maior concentração de BFA.

Quanto às taxas de crescimento de INS-1E, exceto para os resultados obtidos após a exposição às concentrações mais elevadas de ambos os compostos, que se alinham com o que foi observado para as curvas de crescimento e que foram

consistentes nas duas janelas de exposição avaliadas, o tratamento com outras concentrações de ambos os compostos produziu resultados diferentes quanto às taxas de crescimento celular, que não foram consistentes ao comparar as duas janelas de exposição. Essas observações reforçam que os bisfenóis têm efeitos dose-dependentes e tempo dependentes e evidenciam que, dependendo da concentração e do composto químico (BFA ou BFS) ao qual as células INS-1E estão expostas, os efeitos esperados podem estar entre a indução da proliferação celular ou indução de citotoxicidade.

Em relação à viabilidade de INS-1E, de acordo com o que foi observado para as curvas e taxas de crescimento, a exposição a maior concentração de ambos os contaminantes resultou em efeitos citotóxicos para as células. Estes resultados estão de acordo com os achados de Weldingh e colaboradores (2017) que também demonstraram uma grande redução na viabilidade de INS-1E após a exposição a altas concentrações de BFA (500 e 50 μM de BFA por 72 h). No entanto, diferentemente de nossos achados, Lin et al. (2013) demonstraram que concentrações ainda mais baixas de BFA (2 a 0,002 μM) diminuíram a viabilidade celular de INS-1 após 48 horas de exposição, mostrando que essa linhagem celular pode ser mais sensível ao BFA do que a utilizada no presente estudo (INS-1E). Ainda, é importante destacar que nosso estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da exposição ao BFS em células derivadas de insulínoma.

Finalmente, os resultados obtidos após a exposição aos bisfenóis, comparando os mesmos “endpoints” avaliados em HepG2 e INS-1E, foram muito distintos. Ambos os compostos tiveram efeitos mais pronunciados na linhagem celular de hepatocarcinoma do que nas insulínomas, considerando-se os parâmetros avaliados. De fato, espera-se observar variabilidade nas respostas quando diferentes linhagens celulares e diferentes condições experimentais são avaliadas - em nosso estudo, HepG2 foram expostas após 4 horas de incubação, enquanto INS-1E foram expostas após 24 h de incubação. Essas diferenças podem refletir os fenótipos específicos de cada tipo celular, especialmente no que diz respeito às interações químicas específicas entre as moléculas de BFA ou BFS e seus possíveis alvos moleculares nessas células. Não se limitando a isso, há também o fato de que hepatócitos são as principais células envolvidas na desintoxicação de compostos químicos, incluindo os bisfenóis. Portanto, as células HepG2 podem se tornar mais metabolicamente ativas

para eliminar esses compostos e, portanto, mais sujeitas ao estresse oxidativo, o que já foi demonstrado por nosso grupo no tecido hepático, após exposição ao BFA e BFS (AZEVEDO et al., 2019).

Quanto às análises no metaboloma de HepG2 e INS-1E, diversos aas apresentaram níveis reduzidos no metaboloma de HepG2, 48 horas após a exposição a 0.1 μ M de BFA. Alguns destes aas (Val, Ile, Leu e Phe) podem ser convertidos em acetil-CoA (AKRAM, 2014) ou ainda servir como precursores de moléculas do ciclo do ácido cítrico (ciclo TCA), tais como fumarato (derivado da Phe) e succinil-CoA (derivado de Thr, Ile e Val) (MURRAY et al., 2014; YUE et al., 2019). A exposição a baixas concentrações de BFS também reduziu níveis de aas que podem ser utilizados para a síntese de acetil-CoA (acetil-aspartato, fonte de acetato, que é usado na produção de acetil-CoA) (PROKESCH et al., 2016) e na síntese de intermediários do ciclo TCA, como o glutamato, que é convertido em alfa-cetoglutarato por transaminação ou desaminação oxidativa (HADDAD e MOHIUDDIN, 2019); além de aas precursores de piruvato tais como glicina e fosfoserina (convertida em serina) (MURRAY et al., 2014).

Em concordância com nossas descobertas, um estudo recente que realizou análises de metabolômica não-dirigida em amostras obtidas do meio extracelular (meio de cultura) no qual células HepG2 foram cultivadas por 48 horas e expostas a 1, 0,1 e 0,01 μ M de BFA ou BFS mostrou que esses contaminantes desregularam vias relevantes nas quais também estão inseridos os aas encontrados desregulados em nosso estudo: metabolismo da fenilalanina; Metabolismo de D-glutamato; metabolismo de glicina, serina e Thr foram regulados pela exposição ao BFA; enquanto o metabolismo do aspartato e glutamato foi desregulado pela exposição à BFS (YUE et al. 2019).

Ambos os contaminantes também alteraram os níveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em HepG2 após 48 e 72 horas de exposição. A interferência do BFA com o metabolismo de PUFAs vem sendo reportada em estudos *in vivo*. O estudo de Chen e colaboradores (2012) corrobora nossos achados, uma vez que eles também demonstraram, em um estudo metabolômico não-dirigido, que a exposição a 50 mg/kg/dia de BFA por 8 semanas diminuiu os níveis de ácido linoleico e aumentou os níveis de ácido araquidônico no testículo de ratos machos *Sprague-Dawley*.

Dunder et al. (2018), após expor ratos fêmeas *Fischer 344* a 0,5 µg/kg/dia de BFA durante a gestação e lactação, encontraram alterações semelhantes na composição de AGs e PUFA's na prole. As alterações reportadas foram diminuição dos níveis de ácido linoleico (18:2n-6) e aumento dos níveis de ácido palmítico (16:0) nos triglicerídeos do fígado e do tecido adiposo branco inguinal de filhotes machos, bem como elevado índice lipogênico (estimado pela razão 16:0/18:2n-6 nesses tecidos) e aumento dos níveis de delta-6-dessaturase (apenas nos triglicerídeos hepáticos), uma enzima envolvida na conversão de ácido linoleico em PUFA's de cadeia longa.

O ácido araquidônico é um intermediário inflamatório essencial que medeia a inflamação tanto diretamente ou após sua conversão em muitas outras moléculas de sinalização incluindo prostaglandinas, eicosanóides, derivados epóxi-eicosanóides e leucotrienos através de várias vias, como a via da ciclooxigenase, citocromo P450, endocanabinóide e lipoxigenase (POMPEIA et al., 2003). Os metabólitos do ácido araquidônico também são mediadores em processos biológicos relacionados à imunidade e inflamação e também têm sido associados à progressão de muitas doenças metabólicas, tais como obesidade, diabetes e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (como revisado em (SONNWEBER et al. ., 2018)). Em relação ao BFA, muitos estudos epidemiológicos reportaram uma ligação entre a exposição ao BFA e o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias e obesidade (conforme revisado em (ROCHESTER et al., 2013), as mesmas doenças metabólicas às quais os metabólitos do ácido araquidônico estão associados.

O BFA é um desregulador endócrino e sua capacidade de se ligar a receptores de estrogênio nucleares e de membrana está bem documentada (NADAL et al., 2017). No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que o BFA e o BFS também podem se ligar a outros receptores, tais como o PPAR γ , promovendo sua atividade transcricional em pré-adipócitos primários humanos em diferenciação (exposição a 25 µM por 14 dias) (BOUCHER et al., 2016). A capacidade do BFA de se ligar a receptores de estrogênio e PPAR γ está potencialmente associada ao desenvolvimento de dislipidemias e ao prejuízo da homeostase lipídica induzida pela exposição ao BFA (GARCÍA-ARÉVALO, et al. 2014; LEJONKLOU et al., 2017). Previamente já havia sido relatado que o ácido araquidônico é capaz de induzir adipogênese e ganho de massa pela via da prostaciclina (via regulação positiva do

PPAR γ), seja através da ativação do PPAR beta ou PPAR delta (NAUGHTON et al., 2016). Portanto, uma vez que a exposição ao BFA e ao BFS induz a ativação do PPAR γ (AHMED e ATLAS, 2016), a regulação positiva do PPAR γ através do metabolismo do ácido araquidônico poderia exacerbar sua ativação por esses disruptores endócrinos, levando à promoção da adipogênese.

Vários estudos metabolômicos que avaliaram a exposição ao BFA em diferentes organismos e condições já demonstraram que o BFA induz alterações no metabolismo dos nucleosídeos. Yoon et al. (2017) reportaram que os níveis de xantina - a base purínica que é o produto de oxidação da hipoxantina durante a degradação do AMP - diminuíram em peixes-zebra (*Danio rerio*) após a exposição a 0,01, 0,1 e 1 mg/L de BFA, enquanto os níveis de seu precursor, hipoxantina, estavam aumentados logo após a exposição a 0,1 mg/L de BFA. Também, Zeng et al. (2013) encontraram níveis reduzidos de hipoxantina na urina de ratos *Sprague-Dawley* após exposição a 10 e 100 μ g/kg/dia de BFA, enquanto Chen et al. (2014) relataram níveis mais baixos de uracil, adenina, hipoxantina, 2'- desoxiguanosina e guanosina também na urina de ratos *Sprague-Dawley* após a exposição a uma baixa dose de BFA (0,5 μ g/kg/dia). Os níveis diminuídos de nucleosídeos e nucleotídeos de purinas e pirimidinas observados nas células HepG2 podem estar associados a um comprometimento da síntese *de novo* de nucleotídeos, o que poderia ocasionar uma diminuição na síntese de ácidos nucléicos, uma vez que essas moléculas são as matérias-primas para a construção de DNA e RNA. Isso pode interferir com a replicação celular e com a síntese de proteínas e, consequentemente induzir a morte celular, que pode ser um dos possíveis mecanismos pelo qual o BFA e o BFS podem ser citotóxicos para essas células.

Quanto às alterações nos níveis de glicerol fosfato observadas entre 24 e 72 horas após a exposição ao BFA (10 μ M) no metaboloma de HepG2, os resultados obtidos no presente estudo corroboram o que foi reportado em nosso estudo proteômico conduzido previamente. Análises proteômicas não-direcionadas de extratos hepáticos obtidos de ratos *Wistar* expostos cronicamente a 50 μ g/kg/dia de BFA ou BFS, realizadas por nosso grupo, demonstraram que a exposição ao BFA (assim como ao BFS) aumentou significativamente os níveis de *glucokinase activity-related sequence 1* (Gykl1), uma enzima que possui atividade glicerol quinase em roedores (HUQ et al., 1996). As glicerol quinases são enzimas importantes que catalisam a síntese de glicerol fosfato, que é um substrato para a formação de TGs

no fígado (COLEMAN e LEE, 2004). Portanto, os resultados obtidos nas análises metabolômicas reforçam que o BFA regula a síntese de uma molécula precursora de TG nos hepatócitos; e também corroboram os dados publicados na literatura que mostram que o BFA aumenta os níveis de TGs em plasma (MARMUGI et al., 2012; LEJONKLOU et al., 2017) e fígado de roedores (MARMUGI et al., 2012; GARCÍA-AREVALO, et al. 2014; KE et al. al., 2016).

CER podem ser sintetizadas *de novo* nas células a partir de serina e palmitato ou pela ativação da esfingomielinase neutra (NSMase) pelo ácido araquidônico, uma enzima que hidrolisa a esfingomielina para gerar CER. Quando sintetizadas a partir da esfingomielina, as CER atuam como segundos mensageiros para induzir a ativação de caspases, levando à apoptose (TSERNG e GRIFFIN, 2004). Anteriormente, já havia sido demonstrado que a geração de CER via hidrólise de esfingomielina por NSMase em células INS-1 transfectadas levou à apoptose das células de insulinoma induzida por estresse no retículo endoplasmático e que a ativação dessa via foi induzida por uma fosfolipase A2 independente de cálcio (iPLA2 β), a enzima responsável pela hidrólise do ácido araquidônico a partir de fosfolipídios da membrana (LEI et al., 2007).

Assim como em células HepG2, também foi observado um aumento nos níveis de metabólitos envolvidos no metabolismo do ácido α -linolênico e linoleico em INS-1E após 72 horas de exposição ao BFA ou BFS, sendo que o BFA regulou mais metabólitos nesta linhagem celular (e em diferentes concentrações) comparado ao BFS. O ácido araquidônico é um PUFA que, além de ser sintetizado a partir de ácido linoleico, também é um constituinte das membranas celulares. Após ser hidrolisado pela enzima fosfolipase A2 (PLA₂), o ácido araquidônico é liberado dos glicerofosfolipídios de membrana (KUDO e MURAKAMI, 2002). O ácido araquidônico e seus metabólitos, como mencionado anteriormente, são mediadores em processos inflamatórios e desempenham papéis importantes na regulação funcional de vários órgãos e sistemas. Além disso, o ácido araquidônico também pode atuar como mediador do apoptose celular *in vitro* em concentrações superiores às fisiológicas (POMPEIA et al., 2003).

Estudos anteriores demonstraram que baixas concentrações de E2, um agonista clássico de REs, induziu rapidamente a ativação de PLA₂ em células MCF-7

de câncer de mama através de fosforilação de ERK1/2 dependente de MAPK (CAIAZZA et al., 2010; THOMAS et al., 2006). Sabe-se que o BFA pode se ligar a ambos subtipos de ERs, ER α e ER β (BOLLI et al., 2010) e uma grande quantidade de dados sugere que a ativação de ERs pelo BFA pode não apenas ativar repostas estrogênicas por mecanismos nucleares, mas também ativar as respostas extranucleares rápidas que são igualmente ativadas por E2, resultando em fosforilação de ERK/MAPK e consequentemente ativação de PLA₂ (MARINO et al., 2012; ACCONCIA et al., 2015).

A proliferação ou apoptose das células beta (β)-pancreáticas são reguladas por um equilíbrio entre a razão crescimento/morte das células β . Em nosso estudo, apesar de a exposição às diferentes concentrações de BFA ou BFS (variando de 10 - 0,001 μ M) não induzir morte celular após 72 horas, foi possível verificar pequenas alterações nas taxas de crescimento de INS-1E na J1 (10 μ M de BFA) e na J2 (0,001 μ M de BFA e 10 μ M de BFS). As alterações verificadas a nível molecular (metaboloma) possam talvez indicar as vias moleculares inicialmente afetadas após a exposição a concentrações ambientalmente relevantes desses contaminantes. Como as células HepG2 e β expressam ERs (NADAL et al., 2009; SHEN et al., 2018), aqui propomos que a ligação de BFA ou BFS aos ERs leva à ativação de vias extranucleares e consequentemente à ativação de PLA₂, que pode ser o mecanismo pelo qual esses compostos podem aumentar a formação do ácido araquidônico e de seus metabólitos nas células INS-1E e HepG2. Essas descobertas lançam luz sobre potenciais mecanismos através dos quais esses contaminantes podem levar à efeitos deletérios sobre a função e sobrevivência de células β , já demonstrados em muitos estudos que avaliaram a exposição por períodos prolongados ao BFA (NADAL et al., 2009; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, et al., 2018).

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados evidenciam que tanto o BPA quanto o BPS exibiram curvas dose-resposta nao-monotônicas para a maioria dos parâmetros avaliados em HepG2, com efeitos pronunciados também após exposição a baixas doses, o que corresponde a um cenário mais realista, plausível comparado a exposições humanas. Esses achados enfatizam a importância de avaliar efeitos de amplas faixas de concentrações, para evitar a subestimação do potencial tóxico desses produtos químicos.

Considerando os dois tipos de células em estudo, o BFA parece ser mais tóxico do que o BFS sobre os parâmetros avaliados, no entanto, a exposição ao BFS também levou a resultados citotóxicos importantes e alterações significativas no metaboloma de ambas as linhas celulares. As alterações observadas no metaboloma de HepG2 e INS-1E foram tempo-dependentes - ocorrendo principalmente após 48 e 72 horas de exposição - e dose-dependentes, sendo que os compostos apresentaram alguns mecanismos de toxicidade semelhantes, mesmo em linhagens celulares diferentes. É importante ressaltar que o BFA e o BFS regularam níveis de metabólitos que participam de processos inflamatórios, o que poderia estar associado aos efeitos lipogênicos em HepG2 e à indução dos efeitos citotóxicos ou da proliferação celular observados em INS-1E. Este estudo lança luz sobre os potenciais mecanismos de toxicidade dos bisfenóis que pode desencadear a patogênese e a progressão de distúrbios metabólicos e reforça a necessidade de considerar alternativas mais seguras do que o BFS para a substituição do BFA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises proteômicas e metabolômicas apresentadas nos capítulos I e II desta tese são estudos complementares que permitiram a identificação das principais proteínas e metabólitos desregulados após a exposição aos bisfenóis A e S em tecidos e células essenciais na regulação da homeostase energética. Ambos os estudos auxiliam na elucidação das principais vias de toxicidade dos bisfenóis, tornando evidente o prejuízo ao metabolismo energético e o risco de desenvolvimento de distúrbios metabólicos associados à exposição a estes desreguladores endócrinos. Ainda, o presente trabalho fornece informações relevantes para os estudos de avaliação de risco e avaliação da toxicidade destes compostos e reforça a necessidade de elaboração de legislações específicas que regulamentem o uso do BFS em produtos de consumo e a busca por alternativas mais seguras para a substituição do BFA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCONCIA, F., PALLOTTINI, V., MARINO, M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. **Dose Response**. v. 13, n. 4, 2015.
- AGARWAL, A. et al. Dynamin-related Protein 1 inhibition mitigates bisphenol A-mediated alterations in mitochondrial dynamics and neural stem cell proliferation and differentiation. **J Biol Chem**, v. 291, n. 31, p. 15923-15939, 2016.
- AHMED, S., ATLAS, E. Bisphenol S- and bisphenol A-induced adipogenesis of murine preadipocytes occurs through direct peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. **Int J Obes**, v. 40, n. 10, p. 1566–1573, 2016.
- AKRAM, M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell Biochem Biophys**. v. 68, n. 3, p. 475-478, 2014.
- ALONSO-MAGDALENA, P. et al. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 9, p. 1243–1250, 2010.
- ALONSO-MAGDALENA, P. et al. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. **Environ Health Perspect**, v. 114, p. 106-112, 2006.
- ALTOMONTE, J. et al. Foxo1 mediates insulin action on apo C-III and triglyceride metabolism. **J Clin Invest**, v. 114, n. 10, p. 1493-503, 2004.
- ANDRIKOPOULOS, S. et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 295, n.6, p. E1323–E1332, 2008.
- ANGLE, B.M. et al. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BFA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 256-268, 2013.
- ANJUM, S. et al. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of mouse. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 11, p. 2849-2854, 2011.
- ANVISA, 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/embalagens/bisfenol-a>, acessado em 5 de setembro de 2017.
- AOKI, T. et al. Somatostatin analog inhibits the growth of insulinoma cells by p27-mediated G1 cell cycle arrest. **Pancreas**. v. 43, n. 5, p. 720-729, 2014.
- ASHLEY-MARTIN, J. et al. A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol A exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. **Environmental Health**, v. 13, p. 84, 2014.

ÅVALL, K. et al. Apolipoprotein CIII links islet insulin resistance to β -cell failure in diabetes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 112, n. 20, p. 2611-2629, 2015.

AYALA, J.E. et al. NIH Mouse Metabolic Phenotyping Center Consortium. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Dis Model Mech**, v. 3, n. 9-10, p. 525-34, 2010.

AYTÉ, J. et al. Rat mitochondrial and tosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases are encoded by two different genes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, n. 10, p. 3874-3878, 1990.

AZEVEDO, L.F., et al. Long-term exposure to bisphenol A or S promotes glucose intolerance and changes hepatic mitochondrial metabolism in male Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 110694, 2019.

BAŞAK, K., et al. Does maternal exposure to artificial food coloring additives increase oxidative stress in the skin of rats? **Hum Exp Toxicol**, v. 36, n. 10, p. 1023–1030, 2017.

BATISTA, T.M. et al. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33814, 2012.

BEAUSOLEIL, C. et al. Low dose effects and non-monotonic dose responses for endocrine active chemicals: science to practice workshop: workshop summary. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 847-856, 2013.

BEGER, R.D., SUN, J., SCHNACKENBERG, L.K. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 243, p. 154–166, 2010.

BETANCOURT, A.M. et al. Proteomic analysis in mammary glands of rat offspring exposed in utero to bisphenol A. **J Proteomics**, v. 73, n. 6, p. 1241–1253, 2010.

BIEDERMANN, S., TSCHUDIN, P., GROB, K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 1, p. 571–576, 2010.

BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quím Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BOARD, P.G., MENON, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3267–3288, 2013.

BOLLI, A. et. al. Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. **IUBMB Life**, v. 62, n. 9, p. 684–687, 2010.

BOUCHER, J.G. et al. Bisphenol A and bisphenol S induce distinct transcriptional profiles in differentiating human primary preadipocytes. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0163318, 2016.

BOUCHER, J.G., AHMED, S., ATLAS, E. Bisphenol S induces adipogenesis in primary human preadipocytes from female donors. **Endocrinology**, v. 157, p. 1397–1407, 2016.

BOWE, J.E. et al. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. **J Endocrinol**, v. 222, p. 3, p. G13-25, 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CABATON, N.J. et al. Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. **Environ Health Perspect**, v. 121, n. 5, p. 586-593, 2013.

CAIAZZA, F., HARVEY, B.J., THOMAS, W. Cytosolic phospholipase A2 activation correlates with HER2 overexpression and mediates estrogen-dependent breast cancer cell growth. **Mol Endocrinol**, v. 24, n. 5, p. 953-968, 2010.

CALAFAT, A.M. et al. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 39-44, 2008.

CALLAHAN, L.A., SUPINSKI, G.S. Downregulation of diaphragm electron transport chain and glycolytic enzyme gene expression in sepsis. **J Appl Physiol**, v. 99, n. 3, p. 1120-1126, 2005.

CAMPBELL, I.J., DRUCKER, D. Islet α cells and glucagon-critical regulators of energy homeostasis. **Nat Rev Endocrinol**, v. 11, n. 6, p. 329-338, 2015.

CARON, S. et al. Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 3, p. 513–519, 2010.

CHEN, M. et al. Bisphenol A alters n-6 fatty acid composition and decreases antioxidant enzyme levels in rat testes: a LC-QTOF-based metabolomics study. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. 447-454, 2012.

CHEN, M. et al. Metabolomic analysis reveals metabolic changes caused by bisphenol A in rats. **Toxicological Sciences**, v. 138, n. 2, p. 256–267, 2014.

CHEN, M., et al. Transcriptional regulation of the apo C-III gene by insulin in diabetic mice: Correlation with changes in plasma triglyceride levels. **J Lipid Res**, v. 35, n. 11, p. 1918–1924, 1994.

CHEN, Z. et al. Long-term exposure to a 'safe' dose of bisphenol A reduced protein acetylation in adult rat testes. **Sci Rep**, v. 7, p. 40337, 2017.

COBB, L. Cell Proliferation Assays and Cell Viability Assays. **Mater Methods**, v. 9, p. 2799, 2019.

COLEMAN, R.A, LEE, D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in Lipid Research**. v. 43, n. 2, p. 134-176, 2004.

DEKANT, W.; VÖLEKL, W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, p. 114–134, 2008.

DING, S. et al. High-fat diet aggravates glucose homeostasis disorder caused by chronic exposure to bisphenol A. **J Endocrinol**. v. 221, n. 1, p. 167–179, 2014.

DO, M.T., et. al. Urinary bisphenol A and obesity in adults: results from the Canadian Health Measures Survey. Concentration urinaire de bisphénol A et obésité chez les adultes: résultats de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé. **Health Promot Chronic Dis Prev Can**. v. 37, n. 12, p. 403–412, 2017.

DOMENICHIELLO, A.F., KITSON, A.P., BAZINET, R.P. Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain? **Prog Lipid Res**. V. 59, p. 54-66, 2015.

DONG, X. et al. Proteomic profile and toxicity pathway analysis in zebrafish embryos exposed to bisphenol A and di-n-butyl phthalate at environmentally relevant levels. **Chemosphere**. v. 193, p. 313–320, 2018.

DUNDER, L. et al. Low-dose developmental bisphenol A exposure alters fatty acid metabolism in Fischer 344 rat offspring. **Environ Res**. n. 166, p. 117–129, 2018.

DUVILLIÉ, B. et al. Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, n. 10, p. 5137–5140, 1997.

EFSA, 2006. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on request from the Commission related to 2,2-bis(hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) Question number EFSA-Q-2005–100, adopted on 29 November 2006. **The EFSA Journal**, v. 428, p. 1-75, 2006.

EFSA, 2015. European Food Safety Authority , <<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150121>>, acessado em 5 de setembro de 2017.

ELADAK, S. et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. **Fertility & Sterility**, v. 103, n. 1, p. 11-21, 2015.

ELIAS, J.E., GYGI, S.P. Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. **Methods Mol Biol**, v. 604, p. 55–71, 2010.

ELSWEFY, S.E., et. al. Inflammation, oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats. **Int J Exp Pathol**, v. 97, n. 5, p. 369–379, 2016.

EU, 2003. European Union Risk Assessment Report. Bisphenol A, CAS No: 80-05-7. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission Joint Research Centre, 3rd Priority List, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.

FANG, F. et al. Effects of Bisphenol A on glucose homeostasis and brain insulin signaling pathways in male mice. **Gen Comp Endocrinol**, v. 212, p. 44-50, 2015.

FUHRER, T. et. al. High-throughput, accurate mass metabolome profiling of cellular extracts by flow injection-time-of-flight mass spectrometry. **Anal Chem**. v. 83, n. 18, p. 7074–7080, 2011.

GALYON, K. D. et al. BPA exposure alters rat offspring hepatic and skeletal muscle insulin signaling protein abundance. **Am J Obstet Gynecol**, v. 216, n. 3, p. 290.e1-290.e9, 2017.

GARCÍA-AREVALO, M. et al. Exposure to bisphenol-A during pregnancy partially mimics the effects of a high-fat diet altering glucose homeostasis and gene expression in adult male mice. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100214, 2014.

GARCÍA-ARÉVALO, M. et al. Maternal Exposure to Bisphenol-A During Pregnancy Increases Pancreatic β -Cell Growth During Early Life in Male Mice Offspring. **Endocrinology**, v. 157, n. 11, p. 4158–4171, 2016.

GRAMEC SKLEDAR, D. et. al. Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. **Xenobiotica**. v. 45, n. 6, p. 511-519, 2015.

GROMADA, J. et al. α -cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. **Endocr. Rev.** v. 28, n. 1, p. 84–116, 2007.

GUNDRY, R.L., et. al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. **Curr Protoc Mol Biol**, v. 10, n. 25, 2009.

HADDAD, A., MOHIUDDIN, S.S. Biochemistry, Citric Acid Cycle. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541072/>. Acessado em 15/09/2019.

HALL, B.G. et. al. Growth rates made easy. **Mol Biol Evol**. v. 31, n. 1, p. 232-238, 2014.

HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U., JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 51–88, 2005.

HÉLIÈS-TOUSSAINT, C. et al. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 280, p. 224-235, 2014.

HERRERO, Ó. et al. The BFA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae), **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0193387, 2018.

HORSEFIELD, R. et al. Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. **J Biol Chem**, v. 281, n. 11, p. 7309-7316, 2006.

HOSHINAGA, H. et al. Molecular cloning and characterization of the rat cytochrome c oxidase subunit Vb gene. **J Biochem**, v. 115, n. 2, p. 194-201, 1994.

HUANG, Y.Q. et al. Bisphenol A (BFA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. **Environment International**, v. 42, p. 91-99, 2012.

HUC, L. et al. 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**, v. 26, p. 709-717, 2012.

HUQ, A.H. et al. Isolation, mapping, and functional expression of the mouse X chromosome glycerol kinase gene. **Genomics**, v. 36, n. 3, p. 530-534, 1996.

ISMAIL, A., NAWAZ, Z. Nuclear hormone receptor degradation and gene transcription: an update. **IUBMB Life**, v. 57, p. 483-490, 2005.

IVRY DEL MORAL, L. et al. Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4'-sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 mice. **Toxicology**, v. 11, n. 20, p. 357-358, 2016.

JIANG, Y. et al. BPA-induced DNA hypermethylation of the master mitochondrial gene PGC-1 α contributes to cardiomyopathy in male rats. **Toxicology**, v. 329, p. 21-31, 2015.

JIANG, Y. et al. Mitochondrial dysfunction in early life resulted from perinatal bisphenol A exposure contributes to hepatic steatosis in rat offspring. **Toxicol Lett**, v. 228, n. 2, p. 85-92, 2014.

KE, Z.H. et al. Bisphenol A Exposure May Induce Hepatic Lipid Accumulation via Reprogramming the DNA Methylation Patterns of Genes Involved in Lipid Metabolism. **Sci Rep**, v. 6, p. 31331, 2016.

KENDALL, L.V., et al. Replacement, Refinement, and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents. **ILAR J**, v. 59, n. 2, p. 177-194, 2018.

KHAN, S. et al. Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. **Environ Toxicol**, v. 31, n. 12, p. 1922-1934, 2016.

KIRCHNER, H. et al. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. **Mol Metab**, v. 5, p. 171-183, 2016.

KUDO, I., MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** v. 68-69, p. 3-58, 2002.

LAKIND, J.S.; NAIMAN, D.Q. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology.** v. 1, p. 272-279, 2011.

LANG, C., et al. Impaired ketogenesis is a major mechanism for disturbed hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term cholestasis and after relief of biliary obstruction. **J Hepatol**, v. 37, n 5, p. 564-571, 2002.

LANG, I. A. et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. **The Journal of the American Medical Association**, v. 300, p. 1303-1310, 2008.

LAPWORYH, D. J. et al. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287-303, 2012.

LE MAGUERESSE-BATTISTONI, B. et al. Effects of bisphenol A on metabolism and evidences of a mode of action mediated through endocrine disruption. **Mol Cell Endocrinol.** v. 475, p. 74-91, 2018.

LE MARCHAND, S., PISTON, D. W. Glucose suppression of glucagon secretion: metabolic and calcium responses from α -cells in intact mouse pancreatic islets. **J Biol Chem**, v. 285, n. 19, p. 14389-14398, 2010.

LEI, X. et. al. The group VIA calcium-independent phospholipase A2 participates in ER stress-induced INS-1insulinoma cell apoptosis by promoting ceramide generation via hydrolysis of sphingomyelins by neutral sphingomyelinase. **Biochemistry.** V. 46, n. 35, p. 10170-10185, 2007.

LEJONKLOU, M.H. et al. Effects of Low-Dose Developmental Bisphenol A Exposure on Metabolic Parameters and Gene Expression in Male and Female Fischer 344 Rat Offspring. **Environ Health Perspect.** v. 125, n. 6, p. 67-85, 2017.

LEVIN, Y. The role of statistical power analysis in quantitative proteomics. **Proteomics**, v. 11, p. 2565-2567, 2011.

LEVIN, Y., BAHN, S. Quantification of proteins by label-free LC-MS/MS. **Methods Mol Biol**, v. 658, p. 217-231, 2010.

LI, G. Z., et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and production spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, p. 1696-1719, 2009.

LI, Y. et al. Differential *in Vitro* Biological Action, Coregulator Interactions, and Molecular Dynamic Analysis of Bisphenol A (BFA), BFAF, and BFS Ligand-ER α Complexes. **Environ Health Perspect**, v. 126, n. 1, p. 017012, 2018.

LIAO, C. et al. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. **Environ Sci Technol**, v. 46, n. 12, p. 6860-6866, 2012b.

LIAO, C. et al. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residue. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 12, p. 6515-6522, 2012a.

LIAO, C.; KANNAN, K. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 9372-9379, 2011.

LIN, Y., et al. Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. **Cell Death and Disease**, vol. 4, no. 1, p. e460, 2013.

LIU, B. et al. Bisphenol A substitutes and obesity in US adults: analysis of a population-based, cross-sectional study. **Lancet Planet Health**, v. 1, n. 3, p. e114-e122, 2017.

LIU, J., et al. Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure. **PLoS One**, v. 8, p. e64143, 2013.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LJUNGGREN, A. S. et al. Altered heart proteome in fructose-fed Fisher 344 rats exposed to bisphenol A. **Toxicology**, v. 347, p. 6-16, 2016.

LOHMAN, D.C. et al. Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 44, p. E4697-E4705, 2014.

LORZA-GIL, E. et al. Coenzyme Q(10) protects against β -cell toxicity induced by pravastatin treatment of hypercholesterolemia. **J Cell Physiol**, v. 234, n. 7, p. 11047-11059, 2019.

LUO, G., WEI, R., WANG S. Paternal bisphenol A diet changes prefrontal cortex proteome and provokes behavioral dysfunction in male offspring. **Chemosphere**, v. 184, p. 720-729, 2017.

MAĆCZAK, A., et al. Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). **Toxicol In Vitro**, v. 41, p. 143-149, 2017.

MACKAY, H., ABIZAID, A. A plurality of molecular targets: The receptor ecosystem for bisphenol-A (BFA). **Horm Behav**, v. 101, p. 59-67, 2018.

MAGGIOLINI, M., PICARD, D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. **J Endo**, v. 204, n. 2, p. 105-114, 2010.

MALIDE, D. et al. Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. **J Histochem Cytochem**, v. 43, n. 1, p. 11-19, 1995.

MARINO, M., et. al. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. **Steroids**, v. 77, n. 10, p. 910–917, 2012.

MARMUGI, A. et al. Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycaemia and hypercholesterolemia in mice. **Toxicology**, v. 325, p. 133-143, 2014.

MARMUGI, A. et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 395–407, 2012.

MARROQUI, L. et. al. Mitochondria as target of endocrine-disrupting chemicals: implications for type 2 diabetes. **J Endocrinol**, v. 239, n. 2, p. R27–R45, 2018.

MCGUINNESS, O.P. et al. NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 4, p. E849-55, 2009.

MELNICK, R. et. al. Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. **Environ Health Perspect**, v. 110, n. 4, p. 427-431, 2002.

MELZER, I. M., et. al. The Apaf-1-binding protein Aven is cleaved by Cathepsin D to unleash its anti-apoptotic potential. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 9, p. 1435-1445, 2012.

MELZET, D. et al. Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. **Circulation**, v. 125, p. 1482-1490, 2012.

MIYAWAKI, J. et al. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol A increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 14, p. 245-252, 2007.

MONTEIRO, M.S. et al. Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 2, p. 257–271, 2013.

MOON, M.K. et al. Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin resistance. **J Endocrinol**, v. 226, n. 1, p. 35-42, 2015.

MOON, M.K. et. al. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. **J Korean Med Sci**, v. 27, n. 6, p. 644-652, 2012.

MORGENSTERN, R., ZHANG, J., JOHANSSON, K. Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles. **Drug Metab Rev**, v. 43, n. 2, p. 300–306, 2011.

MURRAY, R. K. et al. Bioquímica ilustrada de Harper. 29. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. pg: 167.

NADAL, A. et al. Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 176, p. 16-22, 2018.

NADAL, A. et. al. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nat Rev Endocrinol**. v. 13, n. 9, p. 536–546, 2017.

NADAL, A., et al. Down-regulation of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by insulin: the role of the forkhead transcription factor FKHRL1. **Biochem J**, v. 366, n. 1, p; 289-297, 2002.

NADAL, A., et al. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 21, p. 11603–11608, 2000.

NADAL, A., et al. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 304, n. 1-2, p. 63-68, 2009.

NAUGHTON, S.S., et al. Linoleic acid and the pathogenesis of obesity. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, n. 125, p. 90–99, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 4ª edição. *Sarvier*, São Paulo, 2006.

NOURIAN, A. et al. Effects of bisphenol-S low concentrations on oxidative stress status and in vitro fertilization potential in mature female mice. **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 8, n. 4, p. 341–345, 2017.

NYE, C.K., HANSON, R.W., KALHAN, S.C. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. **J Biol Chem**, v. 283, n. 41, p. 27565–27574, 2008.

OKS, O. et. al. The UPR(mt) Protects *Caenorhabditis elegans* from Mitochondrial Dysfunction by Upregulating Specific Enzymes of the Mevalonate Pathway. **Genetics**, v. 209, n. 2, p. 457-473, 2018.

ORTIZ-VILLANUEVA, E. et. al. Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated metabolomic and transcriptomic approach. **Environ Pollut**. v. 231, n. 1, p. 22-36, 2017.

PAL, S. et. al. Bisphenol S impairs blood functions and induces cardiovascular risks in rats. **Toxicol Rep**, v. 4, p. 560-565, 2017.

PELCH, K. et. al. A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. **Toxicology**. v. 424, p., 2019.

PLANELLÓ, R., et. al. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. **Aquat Toxicol**, v. 105, n. 1-2, p. 62-70, 2011.

POMPEIA, C., LIMA, T., CURI, R. Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? **Cell Biochem Funct.** v. 21, n. 2, p. 97-104, 2003.

PORRECA, L. et al. Molecular targets of developmental exposure to bisphenol A in diabetes: a focus on endoderm-derived organs. **Obes Rev**, v. 18, n. 1, p. 99-108, 2017.

PROKESCH, A. et. al. N-acetylaspartate catabolism determines cytosolic acetyl-CoA levels and histone acetylation in brown adipocytes. **Sci Rep.** v. 6, p. 23723, 2016.

QIU, W. et al. Actions of bisphenol-A and bisphenol-S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish. **Endocrinology**, v. 157, p. 636–647, 2016.

QIU, W. et al. The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 173, p. 192-202, 2019.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 758-760, 1998.

RABILLOUD, T., LESCUYER, P. Proteomics in mechanistic toxicology: history, concepts, achievements, caveats, and potential. **Proteomics**, v. 15, n. 5-6, p. 1051–1074, 2015.

RAMIREZ, T. et al. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. **Arch Toxicol**, v. 92, n. 2, p. 893-906, 2018.

RAMPERSAD, S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel)**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

RAMZY, A. et al. Insulin-Deficient Mouse β -Cells Do Not Fully Mature but Can Be Remedied Through Insulin Replacement by Islet Transplantation, **Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 83–102, 2018.

RANCÈRE, F. et al. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. **Environmental Health**, v. 1, p. 14:46, 2015.

RESCIGNO T., et al. Involvement of nutrients and nutritional mediators in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene expression. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 4, p. 3306-3314, 2018.

RICHARDSON, S.D.; TERNES, T.A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 4614-4648, 2011.

ROBERTSON, D.G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicol Sci**, v. 85, p. 809–822, 2005.

ROCHESTER, J.R. Bisphenol A and human health: a review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 132-155, 2013.

ROCHESTER, J.R., BOLDEN, A.L. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. **Environ Health Perspect**, v. 123, n. 7, p. 643–650, 2015.

ROPERO A. B. et al. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. **Int J Androl**. v. 31, n. 2, p. 194-200, 2008.

ROSEN, E.D. et al. C/EBFAlpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. **Genes Dev**, v. 16, p. 22–26, 2002.

SADOUL, B. et al. Bisphenol A in eggs causes development-specific liver molecular reprogramming in two generations of rainbow trout. **Sci Rep**. v. 7, n. 1, p. 14131, 2017.

SAHEBEKHTIARI, N. et al. Deficiency of the mitochondrial sulfide regulator ETHE1 disturbs cell growth, glutathione level and causes proteome alterations outside mitochondria. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1865, n. 1, p. 126–135, 2019.

SAHEBEKHTIARI, N. et al. Quantitative proteomics suggests metabolic reprogramming during ETHE1 deficiency. **Proteomics**, v. 16, n. 7, p. 1166–1176, 2016.

SANDIN, M., KROGH, M., HANSSON, K., LEVANDER, F. Generic workflow for quality assessment of quantitative label-free LC-MS analysis. **Proteomics**. V. 11, p. 1114-1124, 2011.

SAPIR, A. Controlled sumoylation of the mevalonate pathway enzyme HMGS-1 regulates metabolism during aging. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 37, p. E3880-E3889, 2014.

SAUVÉ, S., DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chem Cent J**, v. 8, n. 1, p. 15, 2014.

SEACHRIST, D. D. et. al. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. **Reprod Toxicol**. v. 59, p. 167–182, 2016.

SHEN, M., CAO, J., SHI, H. Effects of Estrogen and Estrogen Receptors on Transcriptomes of HepG2 Cells: A Preliminary Study Using RNA Sequencing. **Int J Endocrinol**, 2018: 5789127, 2018.

SHERLEY, J. L., STADLER, P. B., STADLER, J. S. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. **Cell Proliferation**, v. 28, p. 137-144, 1995.

SHIAO, M., et al. Adaptive evolution of the insulin two-gene system in mouse. **Genetics**. v. 178, n. 3, p. 1683-1691, 2008.

SKOGLAND ENERSTVEDT, K., SYDNES, M.O., PAMPANIN, D.M. Study of the plasma proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effect of exposure to two PAHs and their corresponding diols. **Chemosphere**. v. 183, p. 294–304, 2017.

SOMM, E. et al. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. **Environ Health Perspect**, v. 117, p. 1549–1555, 2009.

SONG, S. et al. Perinatal BFA exposure induces hyperglycemia, oxidative stress and decreased adiponectin production in later life of male rat offspring. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 4, p. 3728-3742, 2014.

SONG, W. et. al. Testosterone inhibits the growth of prostate cancer xenografts in nude mice. **BMC Cancer**. V. 17, n. 1, p. 635, 2017.

SONNWEBER, T. et. al. Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **Int J Mol Sci**. v. 19, n. 11, p. E3285, 2018.

SRIRAM, G. et al. Global metabolic effects of glycerol kinase overexpression in rat hepatoma cells. **Mol Genet Metab**, v. 93, n. 2, p. 145-159, 2008.

STURLA, S.J. et al. Systems toxicology: from basic research to risk assessment. **Chem Res Toxicol**, v. 27, n. 3, p. 314-329, 2014.

SUN, S. et al. Inhibition of protein carbamylation in urea solution using ammonium-containing buffers. **Anal Biochem**, v. 446, p. 76-81, 2014.

TEEGUARDEN, J.G., HANSON-DRURY, S. A systematic review of Bisphenol A "low dose" studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting "low-dose" effects of chemicals. **Food Chem Toxicol**, v. 62, p. 935-948, 2013.

THOMAS, W. et. al. Estrogen induces phospholipase A2 activation through ERK1/2 to mobilize intracellular calcium in MCF-7 cells. **Steroids**, v. 71, p. 256–265, 2006.

TRASANDE, L. et al. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. **The Journal of the American Medical Association**, v. 308, p. 1113-1121, 2012.

TREMBLAY-FRANCO, M. et al. Dynamic Metabolic Disruption in Rats Perinatally Exposed to Low Doses of Bisphenol-A. **PLoS One**. v. 10, n. 10, p. e0141698, 2015.

TSERNG, K.Y., GRIFFIN, R.L. Ceramide metabolite, not intact ceramide molecule, may be responsible for cellular toxicity. **Biochem J**, v. 380, Pt. 3, p. 715-722, 2004.

TSURUGI, K., et al. Isolation of eukaryotic ribosomalproteins. Purification and characterization of the 60 S ribosomal subunitproteins L4, L5, L7, L9, L11, L12, L13, L21, L22, L23, L26, L27, L30, L33, L35', L37, and L39. **J Biol Chem**, v. 251, n. 24, p. 7940-7946, 1976.

UCHIUMI, T., et al. Identification of neighboring protein pairs inrat liver 60S ribosomal subunits cross-linked with dimethyl suberimidate ordimethyl 3,3'-dithiobispropionimide. **J Biochem**, v. 88, n. 4, p. 1033-1044, 1980.

ULLAH, H. et al. Bisphenol S induces oxidative stress and DNA damage in rat spermatozoa in vitro and disrupts daily sperm production in vivo, **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 99, n.5, p. 953-965, 2017.

ULLAH, H. et. al. Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: a histological and biochemical study. **Chemosphere**, v. 152, p. 383–391, 2016.

USEPA, 2011. *United States Environmental Protection Agency*, <<http://epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm>>, acessado em 05/01/2015.

USEPA, 2014. *United States Environmental Protection Agency*, <<http://www2.epa.gov/columbiariver/chemicals-emerging-concern>>, acessado em 20/11/2014.

USGS. *United States Geological Survey*, <<http://toxics.usgs.gov/regional/emc/>>, acessado em 20/11/2014.

VAHDATI HASSANI, F. et al. Proteomics and phosphoproteomics analysis of liver in male rats exposed to bisphenol A: Mechanism of hepatotoxicity and biomarker discovery. **Food Chem Toxicol**, v. 112, p. 26–38, 2018.

VANDENBERG, L.N. et al. Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 75–95, 2009.

VANDENBERG, L.N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocr Rev**, v. 33, n. 3, p. 378-455, 2012.

VANDENBERG, L.N. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. **Vitam Horm**. v. 94, p. 129–165, 2014.

VANDENBERG, L.N., HUNT, P.A., GORE, A.C. Endocrine disruptors and the future of toxicology testing - lessons from CLARITY-BPA. **Nat Rev Endocrinol**. v. 15, n. 6, p. 366-374, 2019.

VEILLEUX, A. et. al. Glucocorticoid-induced androgen inactivation by aldo-keto reductase 1C2 promotes adipogenesis in human preadipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 8, p. E941-E949, 2012.

VILLAR-PAZOS, S. et. al. Author Correction: Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca(2+) entry in mouse pancreatic β -cells. **Sci Rep**. v. 8, n. 1, p. 4262, 2018.

VIÑAS, R., WATSON, C.S. Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. **Environ Health Perspect**. v. 121, p. 352–358, 2013a.

VIÑAS, R., WATSON, C.S. Mixtures of xenoestrogens disrupt estradiol-induced non-genomic signaling and downstream functions in pituitary cells. **Environ Health**, v. 12, p. 26, 2013b.

- VÖLKEL, W. et al. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. **Toxicology Letters**, v. 179, p. 155-162, 2008.
- VOM SAAL, F. S. et al. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BFA) and obesity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 354, p. 74–84, 2012.
- WANG, K., ZHAO, Z., JI, W. Bisphenol A induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner. **Biomed. Pharmacother**, v. 117, p. 109182, 2019.
- WANG, M. et al. A systematic review of metabolomics biomarkers for Bisphenol A exposure. **Metabolomics**, v. 14, n. 4, p. 45, 2018.
- WANG, W. et al. Bisphenol S induces obesogenic effects through deregulating lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Chemosphere**, v. 199, p. 286-296, 2018.
- WEI, J. et al. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 152, p. 3049–3061, 2011.
- WELDINGH, N. et al. Bisphenol A Is More Potent than Phthalate Metabolites in Reducing Pancreatic β -Cell Function. **Biomed Res Int**, v. 4614379, 2017.
- WELSHONS, W.V. et al. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 8, p. 994-1006, 2003.
- WESTON, L.A., BAUER, K.M., HUMMON, A.B. Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC-MS analysis of complex proteomes. **Anal Methods**, v. 5, n. 18, p. 10, 2013.
- WILLIAMS, K.E. et al. Quantitative proteomic analyses of mammary organoids reveals distinct signatures after exposure to environmental chemicals. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 113, n. 10, p. E1343–E1351, 2016.
- WU, L.H. et al. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. **Sci Total Environ**, v. 615, p. 87-98, 2018.
- XIE, M., LI, F. Effects of bisphenol A exposure during lactation on testicular mitochondria in male mouse offspring. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 43, n. 6, p. 962-966, 2014.
- YANG, G.C. Preface: occurrence and fate of emerging contaminants. **J Hazard Mater**, v. 277, p. 1–2, 2014.
- YANG, M. et al. Bisphenol A Promotes Adiposity and Inflammation in a Nonmonotonic Dose-response Way in 5-week-old Male and Female C57BL/6J Mice Fed a Low-calorie Diet. **Endocrinology**, v. 157, n. 6, p. 2333-2345, 2016.

YANG, M., LEE, H.S., PYO, M.Y. Proteomic biomarkers for prenatal bisphenol A-exposure in mouse immune organs. **Environ Mol Mutagen.** v. 49, n. 5, p. 368–373, 2008.

YOON, C. et. al. ¹H-NMR-based Metabolomic Studies of Bisphenol A in Zebrafish (Danio Rerio). **J Environ Sci Health B.** v. 52, n. 4, p. 282-289, 2017.

YUE, S. et al. Metabolomic modulations of HepG2 cells exposed to bisphenol analogues. **Environment international.** v. 129, p. 59-67, 2019.

ZAMPIERI, M. et al. Frontiers of high-throughput metabolomics. **Curr Opin Chem Biol.** v. 36, p. 15–23, 2017.

ZENG, J. et. al. Effect of bisphenol A on rat metabolic profiling studied by using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 13, p. 7457–7465, 2013.

ZHANG, R., LIU, R., ZONG, W. Bisphenol S. Interacts with catalase and induces oxidative stress in mouse liver and renal cells. **J Agric Food Chem.** v. 64, n. 34, p. 6630–6640, 2016.

ZHANG, X., LIU, R. Advances in BPA-induced oxidative stress and related effects and mechanisms in liver. **Mini Rev Med Chem.** v. 1, p. 1991-2017, 2018.

ZHANG, Z. et al. Subchronic bisphenol S exposure affects liver function in mice involving oxidative damage. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 92, p. 138–144, 2017.

ZHAO, F. et. al. Bisphenol S exposure impairs glucose homeostasis in male zebrafish (Danio rerio). **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 147, p. 794–802, 2018.

ZHAO, L., HARTUNG, T. Metabonomics and toxicology. **Methods Mol Biol**, v. 1277, p. 209-231, 2015.

ZHOU, J., et al. A proteomics based approach to assessing the toxicity of bisphenol A and diallyl phthalate to the abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). **Chemosphere.** v. 79, n. 5, p. 595-604, 2010.

ZOU, X. et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling? **J Bioenerg Biomembr.** v. 49, n. 4, p. 325–333, 2017.

ANEXO I

Tabela A-1 – Identificação das proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico de amostras de fígado do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS.

Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession number	Razão (BFA/ controle)	P-value (teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Processos biológicos (classificação Panther) ^a
ETHE1_ persulfide dioxygenase / Ethe1	B0BNJ4	1.60	0.0021**	18 / 6	cellular process / metabolic process
C-1-Tetrahydrofolate synthase / LOC680432	D3ZZM8	1.76	0.0161*	36 / 6	cellular process / metabolic process
RCG31390 / Sfn	G3V9A3	1.82	0.0097**	10 / 5	Cellular process
Disabled homolog 2-interacting protein / Dab2ip	Q6P730	1.51	0.0106*	3 / 2	Cellular process/ metabolic process /response to stimulus
Exportin 6 / Xpo6	G3V858	1.71	0.0160*	6 / 5	-
Cation channel_ sperm-associated 4 / Catsper4	D4A0V7	1.65	0.0200*	5 / 3	-
Serine/threonine-protein kinase pim-1 / Pim1	P26794	1.77	0.0142*	3 / 2	Cellular process / metabolic process
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_ mitochondrial / Sdhb	P21913	1.78	0.0051**	10 / 3	Cellular process / metabolic process respiratory electron transport chain
Glucokinase activity_ related sequence 1 (Predicted) / Gyl1	D3Z8F7	1.82	0.0231*	7 / 2	Cellular process / metabolic process lipid metabolic process
Dystrophin-related protein 2 / Drp2	Q9EPA0	1.93	0.0278*	6 / 2	cellular component organization or biogenesis
Glutathione S-transferase_ theta 3 / Gstt3	D3Z8I7	0.65	0.0075**	12 / 8	cellular process / metabolic process
Serotransferrin / Tf	P12346	0.62	0.0118*	41 / 2	
Poly (RC) binding protein 2 / Pcbp2	Q6AYU5	0.41	0.0173*	11 / 4	Cellular process / developmental process / localization / metabolic process / multicellular organismal process
SET-binding protein 1 / Setbp1	F1M4Q7	0.65	0.0151*	6 / 2	-
Keratin_ type II cytoskeletal 8 / Krt8	Q10758	0.62	0.0462*	45 / 16	-

Tabela A-1: (continuação)

Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession number	Razão (BFA/ controle)	P-value (teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Processos biológicos (classificação Panther) ^a
Ig gamma-2B chain C region / Igh-1a	P20761	0.60	0.0372*	4 / 3	Biological regulation / cellular component organization or biogenesis /cellular process / immune system process / localization / metabolic process /multicellular organismal process / response to stimulus
Keratin_ type I cytoskeletal 18 / Krt18	Q5BJY9	0.63	0.0475*	41 / 15	-
SEC14-like protein 3 / Sec14I3	Q9Z1J8	0.52	0.0453*	5 / 2	localization
Mediator complex subunit 16 / Med16	D3ZHA9	0.63	0.0462*	7 / 4	cellular process / metabolic process
Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial / Hadha	Q64428	0.51	0.0175*	53 / 21	cellular process / metabolic process
26S proteasome regulatory subunit 6A / Psmc3	Q63569	0.44	0.0422*	18 / 8	-
Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial / Sod2	P07895	0.47	0.0443*	10 / 2	-
Pyridoxal kinase / Pdxk	O35331	0.51	0.0142*	11 / 2	cellular process / metabolic process
Aldo-keto reductase family 1 member C21 / Akr1c21	Q6AYQ2	0.57	0.0363*	11 / 2	-
Protocadherin beta 21 / Pcdhb21	G3V9G0	0.43	0.0330*	7 / 2	Cellular Process / Biological adhesion
Ubiquilin 4 / Ubqln4	D4A3P1	0.68	0.0468*	7 / 2	metabolic process
Death-associated protein 3 / Dap3	A0A0G2K264	0.53	0.0392*	2 / 2	-
Acylpyruvase FAHD1_ mitochondrial / Fahd1	Q6AYQ8	0.40	0.0115*	6 / 3	metabolic process
Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase / Eprs	A0A0G2JZI2	0.45	0.0261*	5 / 2	Cellular process / metabolic process
Ubiquilin-1 / Ubqln1	Q9JJP9	0.35	0.0100**	9 / 2	metabolic process

Tabela A-2 – Identificação das proteínas diferencialmente expressas no extrato proteico de amostras de fígado do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS.

Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession number	Razão (BFS/ controle)	P-value (teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Processos biológicos (classificação Panther) ^a
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9_ mitochondrial / Coq9	Q68FT1	2.19	0.0002***	7 / 2	Cellular process / metabolic process
Aldehyde oxidase 3 / Aox3	Q5QE80	1.67	0.0435*	5 / 3	Cellular process / metabolic process
Glutathione S-transferase alpha-1 / Gsta2	P00502	2.69	0.0227*	34 / 2	-
Similar to Ab2-095 / RGD1309079	D4A3J1	2.28	0.0029**	4 / 2	Biological regulation / Cellular process / response to stimulus
Actin_ beta-like 2 / Actbl2	D3ZRN3	2.09	0.0040**	14 / 3	cellular component organization or biogenesis / Cellular process / localization
6-Phosphogluconolactonase / Pgls	P85971	2.05	0.0329*	14 / 3	Cellular process / metabolic process
Stomatin-like protein 2_ mitochondrial / Stoml2	Q4FZT0	1.61	0.0016**	14 / 3	-
Double-stranded RNA-binding protein Stau2 homolog 2 / Stau2	F1LN29	3.18	0.0012**	15 / 2	-
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 / Trpv6	Q9R186	2.23	0.0059**	4 / 2	Cellular process
RCG61099_ isoform CRA_b / Srsf3	Q0ZFS8	8.20	0.0008***	6 / 2	Metabolic process
Cytochrome c oxidase subunit 5B_ mitochondrial / Cox5b	P12075	1.65	0.0229*	7 / 4	Cellular process / localization / metabolic process
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_ mitochondrial / Sdhb	P21913	1.93	0.0011**	10 / 3	Cellular process / metabolic process
T-complex protein 1 subunit alpha / Tcp1	P28480	2.69	0.0001***	17 / 2	cellular component organization or biogenesis / Cellular process / metabolic process
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_ cytoplasmic / Hmgcs1	P17425	2.04	0.0499*	3 / 2	Cellular process / metabolic process
S-phase kinase-associated protein 1 / Skp1	Q6PEC4	1.50	0.0314*	4 / 2	-
Beta-enolase / Eno3	P15429	1.69	0.0085**	17 / 4	Metabolic process
Glucokinase activity_ related sequence 1 (Predicted) / Gyl1	D3Z8F7	2.39	0.0483*	7 / 2	Cellular process / metabolic process

Tabela A-2: (continuação)

Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession number	Razão (BFS/ controle)	P-value (teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Processos biológicos (classificação Panther) ^a
Prefoldin 5 (Predicted)_ isoform CRA_a / Pfdn5	B5DFN4	1.56	0.0070**	5 / 2	Cellular process / metabolic process
UDP-glucuronosyltransferase / Ugt2a1	F1LLV5	2.26	0.0321*	10 / 2	-
Dystrophin-related protein 2 / Drp2	Q9EPA0	3.04	0.0083**	6 / 2	Cellular component organization or biogenesis
Microsomal glutathione S-transferase 1 / Mgst1	P08011	5.95	0.0084*	4 / 2	Cellular process / metabolic process
Zinc finger and BTB domain-containing protein 4 / Zbtb4	D4A8X0	1.66	0.0404*	4 / 3	Cellular process / metabolic process
Aspartate aminotransferase_ mitochondrial / Got2	P00507	1.59	0.0010*	35 / 9	-
Purine nucleoside phosphorylase / Pnp	P85973	0.65	0.0447*	15 / 5	-
Poly (RC) binding protein 2 / Pcbp2	Q6AYU5	0.52	0.0258*	11 / 4	Cellular process / developmental process / localization / metabolic process / multicellular organismal process
Ubiquilin 4 / Ubqln4	D4A3P1	0.33	0.0218*	7 / 2	metabolic process
Ubiquilin-1 / Ubqln1	Q9JJP9	0.09	0.0026**	9 / 2	metabolic process
CDK5 regulatory subunit-associated protein 2 / Cdk5rap2	708451	0.42	0.0366*	14 / 3	-
AU RNA binding protein enoyl-coenzyme A hydratase (Predicted)_ isoform CRA_a / Auh	F1LU71	0.48	0.0011*	18 / 4	Cellular process / metabolic process
Uncharacterized protein	F1LVA4	0.58	0.0110*	3 / 2	-
Adenosine deaminase domain-containing 2 / Adad2	F1M8B2	0.47	0.0223*	2 / 2	Cellular process / localization / metabolic process / response to stimulus
Glutathione S-transferase A6 / Gsta6	Q6AXY0	0.59	0.0359*	11 / 2	-
Cyclin-dependent kinase 9 / Cdk9	Q641Z4	0.45	0.0037*	2 / 2	Cellular process / metabolic process
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein_ mitochondrial / C1qbp	O35796	0.24	0.0027*	8 / 2	Cellular process / metabolic process

^a Duas proteínas não foram identificadas no Panther

Tabela A-3 – Proteínas identificadas exclusivamente no extrato protéico de amostras de fígado do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA e/ou do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS (proteínas não identificadas no grupo controle).

Descrição da Proteína / gene	Uniprot Acession number	Expressa por	Peptídeos totais/ únicos	Processos biológicos (classificação Panther)
Signal peptide peptidase-like 2B / Sppl2b	Q5PQL3	BFA / BFS	7 / 2	membrane protein proteolysis
Pleckstrin homology and RhoGEF domain-containing G4 / Plekhg4	D3ZQ60	BFA / BFS	6 / 2	nervous system process
Annexin A3 / Anxa3	P14669	BFA	2 / 2	positive regulation of cell migration
Myosin regulatory light chain 12B / Myl12b	P18666	BFS	4 / 2	developmental process

Tabela A-4 – Proteínas suprarreguladas no extrato proteico de amostras de pâncreas do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS. * $p \leq 0.05$.

Nº	Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession Number	Razão (BFA/ controle)	P-value (Teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Função Molecular (GO)	Processos Biológicos (GO)	Via em que está envolvida
1	Kinesin-like protein / Kifc2	A0A0G2K857	2.31	0.001***	7/2	ATP- dependent microtubule motor activity	microtubule-based movement	-
2	Carbonic anhydrase 3 / Ca3	P14141	2.04	0.0002***	26/13	carbonate dehydratase activity	response to oxidative stress	-
3	Importin 4 / Ipo4	D4A2D7	2.83	0.002**	3/2	nuclear localization sequence binding/ protein transporter activity	NLS-bearing protein import into nucleus	-
4	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial / Trap1	Q5XHZ0	4.42	0.0009***	7/2	protein kinase binding /unfolded protein binding	protein folding / response to stress	-
5	Fibromodulin / Fmod	G3V6E7	2.02	7.174142e-05***	5/2	-	collagen fibril organization	-
6	Family with sequence similarity 114, member A2 / Fam114a2	D3ZC89	2.44	0.0007***	5/2	-	-	-
7	Dystrophin / Dmd	P11530	2.27	0.03*	21/4	Actin-binding	myotube cell development	
8	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1_ mitochondrial /Oxct1	B2GV06	2.26	0.008**	4/2	transferase activity	carbohydrate metabolic process/ fatty acid metabolic process	-

Tabela A-5 – Proteínas subreguladas no extrato proteico de amostras de pâncreas do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS. * $p \leq 0.05$.

Nº	Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession Number	Razão (BFA/ controle)	P-value (Teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Função Molecular (GO)	Processos Biológicos (GO)	Via em que está envolvida
1	60S ribosomal protein L8/Rpl8	P62919	0.06	3.33 e-05***	4/4	<i>RNA binding / structural constituent of ribosome</i>	<i>translational elongation / translational termination</i>	<i>Metabolism of RNA</i>
2	Phospholipase A2 / Pla2g4f	D3Z9B7	0.36	0.0001***	5/3	<i>calcium ion binding/ calcium- dependent phospholipid binding/ phospholipase A2 activity</i>	<i>glycerolipid catabolic process /glycerophospholi pid metabolic process</i>	<i>Phospholipid metabolism</i>
3	60S ribosomal protein L30 / Rpl30	P62890	0.21	0.0005***	4/3	<i>RNA binding / structural constituent of ribosome</i>	-	<i>Metabolism of RNA</i>
4	Creatine kinase B-type / Ckb	P07335	0.45	0.0001***	9/2	<i>Kinase activity</i>	-	<i>Metabolism of amino acids and derivatives</i>
5	Globin a4 /Hbb	P02091	0.38	0.01**	25/2	<i>drug binding / heme binding</i>	<i>cellular catabolic process/ cellular response to chemical stimulus</i>	-
6	40S ribosomal protein S5 / Rps5	P24050	0.40	0.002**	10/3	<i>mRNA binding / rRNA binding / structural constituent of ribosome</i>	<i>organelle assembly/ ribosomal small subunit biogenesis</i>	<i>rRNA processing/ Metabolism of RNA</i>
7	40S ribosomal protein S13 / Rps13	P62278	0.33	0.003**	7/3	<i>rRNA binding / structural constituent of ribosome</i>	-	-

Tabela A-5: (continuação):

Nº	Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession Number	Razão (BFA/ controle)	P-value (Teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Função Molecular (GO)	Processos Biológicos (GO)	Via em que está envolvida
8	Alpha-1-acid glycoprotein / Orm1	P02764	0.44	0.01**	12/5	-	-	-
9	Polyadenylate-binding protein 1 / Pabpc1	Q9EPH8	0.38	0.01**	12/2	<i>mRNA 3'-UTR binding/ single-stranded RNA binding</i>	-	-
10	40S ribosomal protein S10 / Rps10	P63326	0.43	0.04*	3/2	<i>RNA binding /structural constituent of ribosome</i>	<i>Organelle assembly/ ribosomal small subunit biogenesis</i>	-
11	Eukaryotic translation initiation factor 4_ gamma 2 / Eif4g2	F1LN59	0.35	0.05*	5/3	<i>mRNA binding /translation initiation factor activity</i>	<i>translational elongation/ translational termination</i>	
12	Nucleobindin 2_ isoform CRA_b / Nucb2	Q9JI85	0.14	0.01*	3/3	<i>Calcium ion binding</i>	<i>Cellular calcium ion homeostasis</i>	-
13	Trypsin V-A	P32821	0.41	0.02*	5/3	<i>serine-type endopeptidase activity</i>	-	-
14	Insulin-1 / Ins1	P01322	0.01	0.002**	4/3	<i>MAP kinase activity/ signaling receptor binding</i>	<i>activation of MAPK activity/ glucose homeostasis</i>	<i>Insulin/ MAP kinase cascade- >Insulin/ Insulin like growth factor</i>
15	40S ribosomal protein S24 / Rps24	P62850	0.16	0.02*	4/2	-	<i>cellular component biogenesis / translation</i>	-
16	Isoleucyl-tRNA synthetase / lars	F1LS86	0.12	0.02*	9/3	<i>catalytic activity, acting on RNA / ligase activity</i>	<i>translational elongation/ translational termination</i>	-

Tabela A-5: (continuação):

Nº	Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession Number	Razão (BFA/ controle)	P-value (Teste T)	Peptídeos totais/ únicos	Função Molecular (GO)	Processos Biológicos (GO)	Via em que está envolvida
17	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 / Pebp1	P31044	0.41	0.05*	10/5	<i>ATP binding / RNA binding / protein kinase binding</i>	<i>MAPK cascade</i>	<i>MAPK family signaling cascades</i>
18	60S ribosomal protein L27 / Rpl27	P61354	0.10	0.03*	4/3	<i>structural constituent of ribosome</i>	-	-
19	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A / Anp32a	P49911	0.47	0.03*	7/3	<i>histone binding</i>	-	<i>Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements</i>
20	60S ribosomal protein L32 / Rpl32	P62912	0.49	0.04*	2/2	-	-	<i>Metabolism of RNA</i>
21	PH and SEC7 domain-containing protein 1 / Psd	G3V8J5	0.38	0.02*	4/3	-	-	-
22	40S ribosomal protein S8 / RGD1566369	P62243	0.18	0.03*	3/3	<i>structural constituent of ribosome</i>	<i>maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript</i>	-
23	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia]_ mitochondrial / Cps1	P07756	0.43	0.05*	37/16	<i>Ligase activity</i>	<i>cellular amino acid metabolic process</i>	<i>De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis- >Carbamoyl phosphate synthetase</i>
24	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q / Syncrip	Q7TP47	0.23	0.04*	5/3	<i>mRNA binding</i>	<i>regulation of mRNA stability</i>	-
25	Cytochrome c oxidase subunit 5B_ mitochondrial / Cox5b	P12075	0.48	0.04*	3/2	<i>cytochrome-c oxidase activity</i>	<i>ATP synthesis coupled proton transport</i>	-
26	Ubiquitin-fold modifier 1 / Ufm1	Q5BJP3	0.09	0.04*	3/2	-	<i>protein modification by small protein conjugation</i>	-

Tabela A-6 – Proteínas exclusivas no extrato proteico de amostras de pâncreas do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFA submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS. * p ≤ 0.05.

Nº	Descrição da Proteína	Peptídeos totais /únicos	Função Molecular (GO)	Processos Biológicos (GO)	Via em que está envolvida
1	Complement C4	102/2	cytokine activity	response to stimulus	—
2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase_cytosolic [GTP]	4/2	carboxy-lyase activity	cellular glucose homeostasis	Pyruvate metabolism
3	Tropomodulin-2	3/2	cytoskeletal protein binding	cytoskeleton organization	—
4	Signal recognition particle subunit SRP72	6/3	-	cellular process	—
5	Chymotrypsin-C	4/2	serine-type peptidase activity	proteolysis	—

Tabela A-7 – Proteínas suprarreguladas no extrato proteico de amostras de pâncreas do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS. * p ≤ 0.05.

Nº	Descrição da Proteína / gene	Uniprot Acession Number	P-value (Teste T)	Razão (BFS/ controle)	Peptídeos totais/únicos	Processos Biológicos (GO)
1	Apolipoprotein C-III / Apoc3	P06759	0.0007***	2,86	4/2	<i>triglyceride homeostasis</i>
2	Apolipoprotein E / Apoe	P02650	0.0005***	2,05	19/7	<i>cholesterol homeostasis</i>
3	E3 SUMO-protein ligase PIAS3 / Pias3	O70260	0.0005***	3,68	3/2	<i>protein sumoylation</i>
4	Isovaleryl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial / Ivd	P12007	0.003**	2,27	4/2	<i>fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase</i>
5	Maleylacetoacetate isomerase / Gstz1	P57113	0.0009***	2,38	2/2	<i>glutathione metabolic process / L-phenylalanine catabolic process</i>
6	Polymerase I and transcript release factor (Predicted) /Ptrf	P85125	0.003**	2,13	20/9	<i>termination of RNA polymerase I transcription</i>
7	Autophagy and beclin 1 regulator 1 / Ambra1	F1LNQ2	0.01**	2,15	5/3	<i>Autophagosome assembly</i>
8	DNA polymerase gamma 2_ accessory subunit / Polg2	D3ZYP7	0.006**	3,80	4/2	<i>mitochondrial DNA metabolic process / mitochondrion morphogenesis</i>
9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 / Hnrnpa1	P04256	0.01**	2,32	12/5	<i>mRNA splicing, via spliceosome</i>
10	Uncharacterized protein / Fam114a2	D3ZC89	0.0006***	2,13	5/2	–
11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U / Hnrnpu	Q6IMY8	0.02*	2,11	12/3	<i>mRNA splicing/ regulation of chromatin organization</i>
12	Alpha-amylase /Amy1a	E9PSQ1	0.04*	2,14	13/2	<i>carbohydrate metabolic process</i>
13	Importin 4 / Ipo4	D4A2D7	0.01**	2,50	3/2	<i>protein import into nucleus, translocation</i>
14	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 / Acs11	P18163	0.01**	2,04	49/18	<i>Fatty acid metabolism/ Lipid metabolism</i>

Tabela A-8 – Proteínas subreguladas no extrato proteico de amostras de pâncreas do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS. * p ≤ 0.05 *versus* controle.

Nº	Descrição da Proteína / gene	Uniprot Accession Number	P-value (Teste T)	Razão (BFS/ controle)	Peptídeos totais/ únicos	Função Molecular (GO) ^a	Processos Biológicos (GO) ^a	Via em que está envolvida
1	Synapse defective Rho GTPase homolog 2 / Syde2	F1LVD8	7.40e-07***	0.35	6/2	-	<i>regulation of GTPase activity</i>	<i>Rho GTPase cycle</i>
2	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_mitochondrial / Hmgcs2	P22791	0.0001028	0.46	5/2	<i>HMG-CoA synthase activity</i>	<i>ketone body biosynthetic process</i>	<i>(R)-mevalonate biosynthesis</i>
3	Phospholipase A2 / Pla2g4f	D3Z9B7	4.96e-05	0.32	5/3	<i>phospholipase activity</i>	<i>immune system process/phospholipid metabolic process</i>	<i>arachidonic acid metabolic pathway</i>
4	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 / Mapkapk2	F1M9C0	0.000656	0.25	3/2	<i>protein kinase activity</i>	<i>MAPK cascade/response to stimulus</i>	<i>p38 MAPK pathway/ RAS pathway</i>
5	Kinesin-1 heavy chain / Kif5b	Q2PQA9	0.0018298	0.47	6/2	<i>microtubule binding/ microtubule motor activity</i>	<i>cellular component movement</i>	<i>Endocytosis</i>
6	Centrosomal protein POC5 / Poc5	Q4V891	0.000656	0.04	3/2	<i>identical protein binding</i>	<i>cell cycle</i>	–
7	Eukaryotic translation initiation factor 5 / Eif5	Q07205	0.0001053	0.47	5/4	<i>translation initiation factor activity</i>	<i>regulation of translational initiation</i>	<i>RNA transport</i>
8	Complement C5 / C5	A0A096P6L9	0.0052003	0.49	6/2	<i>endopeptidase inhibitor activity</i>	<i>positive regulation of chemokine secretion</i>	<i>Regulation of Complement cascade</i>
9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 B / Timm10b	Q9R1B1	0.0018298	0.30	2/2	<i>metal ion binding</i>	<i>protein transport</i>	–
10	60S ribosomal protein L27 / RGD1563835	P61354	0.002914	0.07	4/3	<i>structural constituent of ribosome</i>	<i>rRNA processing/ translation</i>	-

Tabela A-8: (continuação):

11	RCG31562_isoform CRA_c / Tardbp	I6L9G6	0.0002744	0.38	6/2	<i>double-stranded DNA binding/ RNA binding</i>	<i>response to endoplasmic reticulum stress / RNA splicing</i>	–
12	8-oxoguanine DNA glycosylase / Ogg1	O70249	0.0061013	0.13	4/2	<i>damaged DNA binding</i>	<i>nucleotide-excision repair, DNA incision</i>	<i>base-excision repair</i>
13	Alpha-1-acid glycoprotein / Orm1	P02764	0.0068117	0.42	12/5	<i>drug binding</i>	<i>acute-phase response/ inflammatory response</i>	–
14	40S ribosomal protein S5 / Rps5	P24050	0.000656	0.42	10/3	<i><u>structural constituent of ribosome</u></i>	<i><u>biosynthetic process/ translation</u></i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
15	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q / Syncrip	Q7TP47	0.0011146	0.16	5/3	<i>RNA binding</i>	<i>mRNA processing/RNA splicing</i>	<i>spliceosome pathway</i>
16	40S ribosomal protein S19-like / LOC100910336	P17074	0.0002744	0.03	10/3	<i>RNA binding/ structural constituent of ribosome</i>	<i>rRNA processing / translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
17	GTPase IMAP family member 4 / Gimap4	Q8K3K9	0.0317437	0.13	6/2	<i>GTP binding</i>	<i>immune system process</i>	–
18	Chymotrypsin-like / Ctrl	G3V8J3	0.0014326	0.20	6/4	<i>peptidase activity</i>	<i>proteolysis</i>	<i>Pancreatic secretion</i>
19	60S ribosomal protein L11 / Rpl11	P62914	0.012094	0.45	7/2	<i>structural constituent of ribosome</i>	<i>cellular component biogenesis</i>	–
20	60S ribosomal protein L22 / LOC100360057	P47198	0.0204892	0.38	7/3	<i>structural constituent of ribosome</i>	<i>cytoplasmic translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>

Tabela A-8: (continuação):

21	60S ribosomal protein L4 / Rpl4	P50878	0.0014326	0.08	6/3	<i>structural constituent of ribosome</i>	<i>cytoplasmic translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
22	Peptidylprolyl isomerase / Fkbp11	G3V7V5	0.0204892	0.02	5/3	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity</i>	<i>chaperone-mediated protein folding</i>	–
23	40S ribosomal protein S17 / Rps17	P04644	0.0082932	0.08	6/4	<i>RNA binding/ structural constituent of ribosome</i>	<i>rRNA processing/ translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
24	Tyrosine--tRNA ligase / Yars	Q4KM49	0.0100445	0.40	7/5	<i>aminoacyl-tRNA ligase activity</i>	<i>Protein biosynthesis</i>	–
25	Ribosomal protein S15, pseudogene 2 / Rps15	D3ZAK6	0.0144925	0.17	4/2	<i>structural constituent of ribosome</i>	<i>ribosomal small subunit assembly / translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
26	Protein phosphatase 4 regulatory subunit 3C / Ppp4r3c	D4A007	0.0332414	0.25	3/2	–	–	–
27	60S ribosomal protein L8 / RGD1561333	P62919	0.0172712	0.14	4/4	<i>RNA binding/ structural constituent of ribosome</i>	<i>cytoplasmic translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
28	40S ribosomal protein S7 / Rps7	P62083	0.0082932	0.32	11/4	<i>RNA binding</i>	<i>cell differentiation/ cytoplasmic translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
29	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 / Pcsk7	Q62849	0.0086252	0.34	4/3	<i>peptidase activity</i>	<i>protein processing</i>	–

Tabela A-8: (continuação):

30	40S ribosomal protein S13 / Rps13	P62278	0.0172712	0.40	7/3	<i>RNA binding/ structural constituent of ribosome</i>	<i>negative regulation of RNA splicing/ translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
31	Colipase / Clps	P17084	0.0045131	0.05	9/7	<i>enzyme activator activity</i>	<i>digestion / lipid catabolic process</i>	<i>Fat digestion and absorption</i>
32	Zymogen granule membrane protein 16 / Zg16	Q8CJD3	0.0055596	0.14	7/4	<i>carbohydrate binding</i>	<i>protein transport</i>	–
33	Integrin alpha-D / Itgad	Q9QYE7	0.0144925	0.45	4/2	–	<i>cell adhesion</i>	<i>Regulation of actin /cytoskeleton</i>
34	60S ribosomal protein L30 / Rpl30	P62890	0.0172712	0.30	4/3	<i>RNA binding/ structural constituent of ribosome</i>	<i>cytoplasmic translation</i>	<i>ribosome biogenesis pathway/ translation pathway</i>
35	Eukaryotic translation initiation factor 4B / Eif4b	Q5RKG9	0.0023164	0.22	5/5	<i>translation initiation factor activity</i>	<i>formation of translation preinitiation complex</i>	<i>mTOR signaling pathway/PI3K-Akt signaling pathway</i>
36	Similar to RIKEN cDNA 1700088E04 / RGD1359634	Q6AYH8	0.0284207	0.44	2/2	–	–	–
37	Chymotrypsin-like elastase family member 2A / Cela2a	P00774	0.0082932	0.30	9/3	<i>serine-type peptidase activity</i>	<i>proteolysis</i>	<i>Protein digestion and absorption</i>
38	40S ribosomal protein S24 / Rps24	P62850	0.0045131	0.16	4/2	<i>RNA binding/ structural constituent of ribosome</i>	<i>rRNA processing / translational initiation</i>	–
39	Elongation factor 1-delta / Eef1d	Q68FR9	0.012094	0.32	13/7	<i>translation elongation factor activity</i>	<i>mRNA transcription</i>	–
40	Insulin-2 / Ins2	P01323	0.0596571	0.01	3/2	<i>hormone activity/insulin receptor binding</i>	<i>fatty acid homeostasis/ glucose homeostasis</i>	<i>PI3K-Akt signaling pathway/Insulin signaling pathway</i>

Tabela A-8: (continuação):

41	Tumor necrosis factor ligand 1b / Tnfsf15	Q8K3Y7	0.0241843	0.15	2/2	tumor necrosis factor receptor binding	apoptotic process	Cytokine-cytokine receptor interaction
42	Leucine-rich repeat-containing protein 59 / Lrrc59	Q5RJR8	0.0284207	0.22	7/5	cadherin binding / RNA binding	–	–
43	Catenin (Cadherin associated protein)_alpha 1 / Ctnna1	Q5U302	0.0066342	0.12	10/3	actin binding/ structural constituent of cytoskeleton	cell adhesion/ cellular component morphogenesis	–
44	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit / Prkar1a	P09456	0.0387211	0.18	8/6	cAMP binding	regulation of protein kinase activity	Insulin signaling pathway
45	Carboxypeptidase B / Cpb1	D3ZAM3	0.0241843	0.39	10/2	metallocarboxypeptidase activity	proteolysis	–
46	Glucagon / Gcg	P06883	0.0387211	0.03	5/5	hormone activity	–	glucagon signaling pathway
47	Cationic trypsinogen / Prss3b	P08426	0.0284207	0.25	7/6	serine-type endopeptidase activity	digestion/ proteolysis	Pancreatic secretion/ Protein digestion and absorption

^a Uma proteína não foi identificada no Panther

Tabela A-9– Proteínas exclusivas no extrato proteico de amostras de pâncreas do grupo exposto a 50 µg/kg/dia de BFS submetidas à análise proteômica por LC-MS/MS.

Nº	Descrição da Proteína	Peptídeos totais/únicos	Função Molecular (GO)	Processos Biológicos (GO)	Via em que está envolvida
1	Complement C4	102/2	–	<i>ectoderm development</i>	–
2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase_ cytosolic [GTP]	4/2	<i>cytokine activity</i>	<i>Proteolysis/ response to stimulus</i>	–
3	Tropomodulin-2	3/2	<i>cytoskeletal protein binding</i>	<i>cytoskeleton organization</i>	–
4	Chymotrypsin-C	4/2	<i>Binding/ carboxy-lyase activity</i>	<i>cellular glucose homeostasis/fatty acid metabolic process</i>	<i>Pyruvate metabolism</i>
5	Retinol-binding protein 1	7/2	<i>serine-type peptidase activity</i>	<i>proteolysis</i>	–

ANEXO II – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da expressão proteica e parâmetros bioquímicos relacionados com Diabetes mellitus tipo II e dislipidemias em animais expostos aos contaminantes bisfenóis A e S", registrada sob nº 15.1.979.60.7, sob a responsabilidade de Lara Ferreira Azevedo e Fernando Barbosa Júnior, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

A proposta foi aprovada em reunião de 25/02/2017 e o relatório final aprovado em reunião de 30/05/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA – FCFRP/USP).

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	29/11/2015 a 01/08/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais aprovados	72
Nº de animais utilizados	66
Peso/Idade	150 g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 11 de junho de 2019.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

ANEXO III – Publicações relacionadas à tese

1) Azevedo, L.F., Porto Dechandt, C.R., Cristina de Souza Rocha, C., Hornos Carneiro, M.F., Alberici, L.C., Barbosa, F. Jr. Long-term exposure to bisphenol A or S promotes glucose intolerance and changes hepatic mitochondrial metabolism in male Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**. 132:110694, 2019. Doi: 10.1016/j.fct.2019.110694.

2) Azevedo, L.F., Hornos Carneiro, M.F., Porto Dechandt, C.R., Cassoli, J. S., Alberici, L.C., Barbosa, F. Jr. Global liver proteomic analysis of Wistar rats chronically exposed to low-levels of bisphenol A and S. **Environ Research**. 182: 109080, 2020. Doi: 10.1016/j.envres.2019.109080

3) Manuscrito em fase de redação relativo aos dados do Capítulo II:

Ferreira Azevedo, L., Miguel Masiero, M., Cherkaoui, S., Hornos Carneiro, M. F., Zamboni, N.1, Barbosa Júnior, F. BPS plasticizer replacement displays similar phenotypic and metabolic responses to BPA in human cells.