# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

### Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo

## Mariana Aguilera Alencar da Silva

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Tania Marcourakis

SÃO PAULO 2016

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

### Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo

### Mariana Aguilera Alencar da Silva

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Tania Marcourakis

SÃO PAULO 2016 Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Mariana Aguilera Alencar da

 S586a Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo / Mariana Aguilera Alencar da Silva. -- São Paulo, 2016.

99p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Marcourakis, Tania

1. Toxicologia 2. Xenobiótico 3. Apoptose 4. Hipocampo I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador.

615.9 CDD

Mariana Aguilera Alencar da Silva

#### Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

> Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania Marcourakis orientador/presidente

> > 1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 31 de Agosto de 2016.

Aos meus pais **Evelin Munhos Aguilera da Silva** e **Josemar Alencar da Silva** por todo o apoio, pelo incentivo a sempre buscar ser uma pessoa melhor, por não me deixarem desistir nunca, pelos valores que me ensinaram, pelo amparo nos momentos mais difíceis e pelo amor sempre tão presente.

Ao restante da minha família e aos meus queridos amigos, pelo apoio, palavras de incentivo e pela alegria que me ajudaram a enfrentar essa caminhada de uma forma mais leve.

A **Prof.**<sup>a</sup> **Dr.**<sup>a</sup> **Tania Marcourakis**, obrigada por me aceitar e deixar que eu embarcasse neste grande desafio, obrigada pelos ensinamentos, paciência, orientação, pelas palavras de incentivo, pelas broncas e elogios e acima de tudo obrigada por me ajudar a ser uma profissional melhor.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

**Charles Chaplin** 

### Agradecimentos

A Deus pela minha vida e pela sabedoria concedida para que eu pudesse chegar ao final dessa jornada.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa concedida.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula de Melo Loureiro e ao Dr Tiago Franco de Oliveira pelo auxílio na realização dos ensaios de quantificação do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Helena Poliselli Farsky e a MSc. Lorena Nascimento Pantaleão pelo auxílio na realização dos ensaios de citometria de fluxo.

A Dr.<sup>a</sup> Fernanda Faião Flores pela ajuda na repadronização do ensaio de *Western Blotting*.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helenice de Souza Spinosa e a todo o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP na obtenção e manutenção dos animais utilizados neste projeto.

Ao Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia pela imensa colaboração, por todos os ensinamentos, ajuda e apoio ao longo do meu mestrado.

A MSc. Mariana Sayuri Berto Udo pela grande ajuda e companheirismo nos experimentos, pelos ensinamentos, apoio e paciência ao longo do meu projeto.

A aluna de graduação e iniciação científica Mariane de Queiroz Oliveira pela ajuda e amizade.

A aluna de MSc. Tatiana Costa Andrioli e a aluna de graduação Natália Trigo Balestrin pelo auxílio nos ensaios de *Western Blotting* e pelo apoio e amizade sempre presentes.

As alunas da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania, companheiras de trabalho e amigas, Stephanie, Ana Carolina, Lidia, Yuli, obrigada pela amizade.

E por fim, aos funcionários da tóxico Ângelo, Rose e Samantha por todo o suporte durante o meu mestrado.

# Lista de Figuras

| Figura 1:  | Estrutura química do Bisfenol A  | 2  |
|------------|--|----|
| Figura 2:  | Mecanismos de ação do estrógeno nas células  | 7  |
| Figura 3:  | Mecanismos celulares e moleculares de ação de BPA na indução<br>de doenças crônicas humanas  | 9  |
| Figura 4:  | Diferenças morfológicas entre os processos de apoptose e necrose   | 13 |
| Figura 5:  | Ativação da Apoptose pelas vias Extrínseca e Intrínseca  | 14 |
| Figura 6:  | Ensaio da atividade mitocondrial obtida pelo teste de MTT para os horários de 6, 12, 24 e 48 horas de exposição  | 31 |
| Figura 7:  | Ensaio de citotoxicidade a partir da liberação da enzima Lactato<br>Desidrogenase (LDH) para os horários de 6, 12, 24 e 48 horas<br>de exposição   | 32 |
| Figura 8:  | Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para soluções de BPA nas concentrações de 200 e 250 µM  | 33 |
| Figura 9:  | Taxa de absorção do Bisfenol A por células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal expostas a 200 ou 250 µM  | 34 |
| Figura 10: | Gráficos representativos do tipo Dot-Plot adquiridos em citômetro<br>de fluxo das populações celulares marcadas com Anexina-V e Pl<br>de células neuronais provenientes de cultura primária<br>hipocampal tratadas com o BPA pelos períodos de 3, 6 e 9 horas<br>de exposição                  | 35 |
| Figura 11: | Porcentagem da proporção de células vivas, em processo de apoptose, necrose e apoptose tardia para as células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250 µM) e nos diferentes períodos de exposição (3, 6 e 9 horas) | 36 |

- Figura 12: Porcentagem do aumento do cálcio intracelular em células 37 neuronais provenientes de cultura primária hipocampal tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250 µM)
- Figura 13: Média da intensidade de fluorescência da caspase-8 ativa em 38 células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250 μM) nos períodos de exposição de 3, 6 e 9 horas
- Figura 14: Média da intensidade de fluorescência da caspase-9 ativa em 39 células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250 µM) nos períodos de exposição de 3, 6 e 9 horas
- Figura 15: Média da intensidade de fluorescência da caspase-3 ativa em 40 células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250 µM) nos períodos de exposição de 3, 6 e 9 horas
- Figura 16: Western Blotting de Bax e Bcl-2 em células neuronais 41 provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 µM de BPA pelo período de 3 horas
- Figura 17: Western Blotting de Bax e Bcl-2 em células neuronais 42 provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 µM de BPA pelo período de 6 horas
- Figura 18: Western Blotting de Bax e Bcl-2 em células neuronais 42 provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 µM de BPA pelo período de 9 horas
- Figura 19: Razão das proteínas Bax/Bcl-2 nos períodos de 3, 6 e 9 horas 43 em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 µM de BPA
- Figura 20: Géis representativos da caspase-8 e caspase-9 em células 44 neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 µM de BPA pelo período de 3 horas
- Figura 21: Géis representativos das caspase-8, caspase-9 e caspas-3 em 44-45 células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo postas a 200 e 250 µM de BPA pelo período de 6 horas

- Figura 22: Géis representativos das caspase-8, caspase-9 e caspas-3 em 46 células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 µM de BPA pelo período de 9 horas
- Figura 23: Western Blotting dos receptores de estrógeno ER-α e ER-β em 47-48 células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 μM de BPA nos períodos de exposição de 3, 6 e 9 horas

### Lista de Tabelas

| Tabela 1: | Códigos e nomes dos kits utilizados para o ensaio de citometria | 26 |
|-----------|---|----|
|           | de fluxo na avaliação da expressão das proteínas Caspases 8, 9  |    |
|           | e 3.  |    |

- Tabela 2:Composição das soluções utilizadas no ensaio de Western28Blotting
- Tabela 3:Nomes, diluições e marcas dos anticorpos utilizados no ensaio de29Western Blotting.

### Lista de Anexos

- **Anexo 1**: Protocolo n º 473/2014 aprovado pela Comissão de Ética em 69 Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- Anexo 2: Protocolo n º 3999110614 aprovado pela Comissão de Ética em 71
  Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e
  Zootecnia.
- Anexo 3: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de 74 Mestrado/Doutorado.
- Anexo 4: Ficha do Aluno

76

## Sumário

| 4.4. Avaliação da Atividade Apoptótica e Necrótica por Citometria de fluxo utilizando<br>os marcadores Anexina-V e PI |
|---|
| 4.5. Avaliação da Concentração de Ca <sup>2+</sup> intracelular37   |
| 4.6. Avaliação da Expressão dos Marcadores Celulares (Caspase 8, 9 e 3) por<br>Citometria de Fluxo                    |
| 4.7. Análise das Proteínas Anti e Pró-apoptóticas (Bax, Bcl-2, Caspases 8, 9 e 3) por Western Blotting                |
| 4.8. Análise Proteica dos Receptores de Estrógeno ER-α e ER-β por Western<br>Blotting46                               |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>   |
| 6. CONCLUSÃO  |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   |

#### Resumo

SILVA, A. A. M. Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo. 2016. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O Bisfenol A (BPA) é usado na fabricação de plásticos de policarbonato e resinas epóxi. A exposição pré-natal a esse agente pode causar diversos efeitos, tais como: antecipação da puberdade, hiperplasia de próstata, diminuição do número de diminuição dos níveis de espermatozoides, testosterona, alteração do desenvolvimento e organização tecidual da glândula mamária, diminuição da resposta celular induzida por hormônios, câncer de mama, diabetes, doenças cardiovasculares, alterações das funções de enzimas hepáticas, além de efeitos sobre o desenvolvimento cognitivo. Poucos estudos avaliam os efeitos do BPA sobre as células neuronais, porém existem evidências de que este agente induza a apoptose. O presente trabalho tem como objetivo estudar a neurotoxicidade do BPA, avaliando vias de sinalização que levam a indução da apoptose em cultura primária de hipocampo. As células foram expostas ao BPA nas concentrações de 50, 100, 150, 200, e 250 µM (0,1% DMSO v/v) pelos períodos de 6, 12, 24, e 48 horas para a realização dos ensaios da atividade mitocondrial (MTT) e citotoxicidade pela liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH). A partir dos resultados de MTT e LDH, foram adotados novos horários de exposição (3, 6 e 9 horas) utilizando somente as concentrações de 200 e 250 µM. Neste novo desenho experimental, foi realizada a quantificação da concentração de BPA na cultura primária por HPLC-PDA, determinação da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular pela quantificação da fluorescência do Fluo-4 AM, caracterização dos mecanismos envolvidos na morte celular por citometria de fluxo e Western Blotting, e avaliação dos receptores de estrógeno ER-α e ER-β por Western Blotting. Nossos resultados apontam que aproximadamente 20% de BPA na concentração de 250 µM após 6 horas de exposição e 18% para a concentração de 200 µM com 9 horas de exposição foram absorvidos pela cultura celular. O ensaio do MTT mostrou que as células expostas a 200 e 250 µM de BPA, por 12, 24 e 48 horas, apresentaram diminuição significativa da função mitocondrial em relação ao controle. Porém, não houve liberação de LDH para o meio de cultura para nenhuma das concentrações de BPA em nenhum dos

períodos de incubação, o que sugere que não houve rompimento da membrana plasmática. Foi observada atividade apoptótica somente com a concentração de 250 µM no período de exposição de 6 horas por citometria de fluxo. Não foram encontradas células em necrose, nem alteração na concentração de cálcio intracelular em nenhuma das condições estudadas. Na avaliação dos marcadores de morte celular, observamos aumento da razão de Bax/Bcl-2 para a concentração de 250 µM em todos os períodos de exposição e aumento das caspases 8, 9 e 3 para a concentração de 250 µM no período de exposição de 6 horas, indicando que o BPA deve ativar tanto a via intrínseca como a extrínseca no processo de apoptose. Verificamos ainda, por Western Blotting, que a cultura primária de hipocampo apresenta os receptores de estrógeno ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ . A exposição ao BPA aumentou os ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  avaliados por Western Blotting para as duas concentrações estudadas no período de 6 horas de exposição e, para o período de exposição de 9 horas, houve um aumento do ER-α para a concentração de 250 μM e do ER-β para a concentração de 200 μM. É possível concluir que o BPA pode levar a morte das células neuronais hipocampais por apoptose por ambas as vias intrínseca e extrínseca, sendo o processo de morte celular mais evidente para a concentração de 250 µM no período de 6 horas de exposição. Sugerimos ainda que o aumento observado em ambos os receptores de estrógeno possa representar uma tentativa de interrupção ou reversão do processo de morte celular.

**Palavras-Chave:** Bisfenol A, neurotoxicidade, cultura primária de hipocampo, apoptose, caspases, desregulador endócrino, receptores de estrógeno.

#### Abstract

SILVA, A. A. M. **Evaluation of Bisphenol A neurotoxicity in primary culture of hippocampus**. 2016. 99f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bisphenol A (BPA) is used in the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins. The prenatal exposure to this agent may cause several effects, such as anticipation of puberty, prostate hyperplasia, reduced number of sperm, reduced testosterone levels, alteration in the development and tissue organization of the mammary gland, decreased cellular response induced by hormones, breast cancer, diabetes, cardiovascular disease, changes in the functions of liver enzymes, and effects on cognitive development. Few studies have evaluated the effects of BPA in neuronal cells, however there are evidences that this agent may induce apoptosis. This work aims to study the neurotoxicity of BPA, by analyzing the signaling pathways of apoptosis in hippocampus primary culture. Cells were exposed to BPA at 50, 100, 150, 200, and 250 µM (0.1% DMSO v/v) for 6, 12, 24, and 48 hours for the assay of mitochondrial activity (MTT) and the release of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH). From the results of MTT and LDH, new exposure times (3, 6 and 9 hours) and only 200 and 250 µM were used. In this new experimental design we performed the quantification of the BPA concentration in the primary culture by HPLC-PDA, intracellular Ca<sup>2+</sup> quantification by Fluo-4 AM assay and the characterization of the mechanisms involved in cell death by flow cytometry and Western Blotting assays. Furthermore, evaluation of the estrogen receptor ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  was done by Western Blotting. Our results demonstrate that about 20% of the BPA concentration of 250 µM after 6 hours of exposure and 18% for the concentration of 200 uM with 9 hours of exposure were absorbed by the cell culture. Cells exposed to 200 and 250 µM of BPA for 12, 24 and 48 hours, showed a significant decrease in mitochondrial function, by the MTT assay, compared to control. However, there was no release of LDH into the culture medium for any of the BPA concentrations in any of incubation times studied, which suggests no rupture of the plasma membrane by BPA. Apoptotic activity was observed after 6 hours of exposure to 250µM BPA by flow cytometry. It was not observed cell necrosis and changes in intracellular calcium concentration in any of the studied conditions. Regarding the cell death markers, exposure to 250 µM BPA in all periods of exposure resulted in an increased Bax/Bcl-2 ratio; moreover, an increase in caspase 8, 9 and 3 was detected after exposure to 250  $\mu$ M BPA for 6 hours. Taken together, these findings indicate that BPA activates both the intrinsic and the extrinsic pathway during the apoptotic process. We also verified by Western Blotting the presence of the estrogen receptors ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  at the primary culture of hippocampus, and that they can be modulated by BPA. The exposure to 200 and 250  $\mu$ M BPA for 6 hours caused an increase of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ , however, 9 hours of exposure to 200  $\mu$ M and 250  $\mu$ M BPA increased the expression of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ , respectively. In conclusion, BPA can lead hippocampal neuronal cells to death by both, intrinsic and extrinsic, apoptotic pathways and this process is more evident at 250  $\mu$ M BPA after 6 hours of exposure. Furthermore, we suggest that the increase of both estrogen receptors might represent an attempt to interrupt or reverse the cell death process.

**Keywords:** Bisphenol A, neurotoxicity, hippocampus primary culture, apoptosis, caspases, endocrine disrupter, estrogen receptors.

1. Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Bisfenol A

O Bisfenol A (BPA), [2,2-bis (4-hydroxphenyl) propano, CAS 80-05-7] (Figura 1) foi sintetizado pela primeira vez em 1891 pelo químico russo A.P. Dianin. É formado pela condensação do fenol com a acetona (por isso o sufixo A no final) na presença de um catalisador, geralmente o ácido clorídrico ou uma resina poliestireno sulfonada. Sua estrutura molecular consiste em um átomo de carbono tetraédrico central com dois grupos metil e dois grupos fenólicos. O BPA é um componente químico industrial comum em muitos produtos, sendo que seu uso tem crescido ao longo dos últimos 58 anos, constituindo-se em um dos produtos químicos com a mais elevada produção mundial. Entre os usos do BPA destaca-se a fabricação de alguns polímeros (policarbonatos, resinas epóxi, polisulfona e poliacrilatoplásticos), plásticos de cloreto de polivinila e retardadores de chama. Apesar de não ser formado naturalmente no meio ambiente, é altamente presente nos dias de hoje devido a sua alta produção, consumo e subsequente introdução ambiental. Em 2003, a produção global de BPA foi de 3,2 milhões de toneladas e seu consumo global em 2011 foi estimado acima de 5,5 milhões de toneladas, justificando ser um dos produtos químicos mais comercializados no mundo (EFSA, 2010; WELSHONS; NAGEL; VOM SAAL, 2006; FLINT et al., 2012; REZG et al., 2014; CORRALES et al., 2015).



Figura1: Estrutura química do Bisfenol A. (RICHTER et al., 2007).

O policarbonato é um polímero que apresenta alta transparência e resistência térmica e mecânica. Devido a estas características, o policarbonato é muito utilizado na fabricação de mamadeiras, galões de água mineral, entre outras embalagens e utensílios para o armazenamento de alimentos e bebidas. A resina epóxi por sua vez, é muito utilizada no revestimento de latas e outras embalagens metálicas (ANVISA, 2013). Atualmente, as aplicações de policarbonato e resinas epóxi foram estendidas para outros usos, tais como óculos de sol, materiais de construção, CD-ROM, dispositivos médicos e materiais odontológicos. Todos esses usos industriais de BPA geraram a estimativa de que mais de 100 toneladas de BPA são liberados na atmosfera a cada ano de produção (REZG et al., 2014).

#### 1.2. Exposição ao BPA

Devido a sua capacidade de lixiviação, pequenas quantidades de BPA podem migrar para os alimentos e bebidas e consequentemente serem ingeridas (ANVISA, 2013). Este processo de lixiviação pode ocorrer por dois processos diferentes, a difusão do BPA residual presente nos plásticos de policarbonato após o processo de fabricação e a hidrólise do mesmo que pode ser favorecida pelo aumento de temperatura, pH ou ainda por alguns compostos químicos presentes em alguns alimentos (EHLERT; BEUMER; GROOT, 2008; MERCEA, 2009; HOEKSTRA; SIMONEAU, 2011).

Estudos mostram que a concentração média de BPA em alguns alimentos pode atingir a faixa de 10 a 70 µg/kg (WHO, 2010). O BPA tem sido detectado em concentrações significativas em produtos à base de carne (0,49-56 µg/kg), em peixes (7,1-102,7 µg/kg), vegetais e frutas (11,0-95,3 µg/kg) e cereais (1,0-3,8 µg/kg) (MICHAŁOWICZ, 2014). Contudo, a exposição ao BPA não ocorre somente por meio de alimentos contaminados, outras fontes de exposição vem sendo caracterizadas. Colin et al. (2014) analisaram 291 amostras de água potável e verificaram que as concentrações médias e máximas de BPA nessas amostras foram de 14 ng/L e 1,3 µg/L, respectivamente. Já no solo, as concentrações variam entre <0,1 a 1000 µg/kg dependendo da quantidade e do tipo de efluentes e resíduos que este solo recebeu. Já em amostras de ar, as concentrações de BPA ficaram em torno de <100 ng/m<sup>3</sup> em

residências e prédios comerciais (RUDEL et al., 2011; WILSON et al., 2007; CORRALES et al., 2015)

Os seres humanos chegam a ingerir de 1,7 a 2,7 µg de BPA por dia, a partir de alimentos contaminados por acondicionamento ou cultivo, além do BPA presente na poeira que o indivíduo pode deglutir juntamente com os alimentos, apresentando concentrações que variam de 0,008 a 0,014 µg por dia (DEKANT; VÖLKEL, 2008; EHLERT; BEUMER; GROOT, 2008; CAO; CORRIVEAU; POPOVIC, 2009; GROFF, 2010; LOGANATHAN; KANNAN, 2011). A União Europeia estima que estejamos expostos ao BPA em um intervalo de 10 a 600 µg/dia ou 0,7 a 9 µg BPA/kg/dia, considerando todas as fontes de exposição (NAIK; VIJAYALAXMI, 2009).

Em 2006, a agência regulamentadora *European Food Safety Authority* (EFSA) definiu que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do BPA fosse de 0,05 mg/kg de peso corpóreo/dia. Este valor baseia-se na dose de 5mg/kg de peso corpóreo/dia, que corresponde à dose que não se observa nenhum efeito adverso (NOAEL - *no-observed-adverse-effect level*), e que foi identificada em dois estudos de toxicidade com roedores (EFSA, 2010).

Como precaução, alguns países, inclusive o Brasil, proibiram a importação e a fabricação de mamadeiras que contenham o BPA. Esta proibição está vigente desde janeiro de 2012 e vem sendo aplicada pela RDC 41/2011 (EFSA, 2010; ANVISA, 2013). Para os demais tipos de recipientes e utensílios, o uso do BPA ainda é permitido, contudo há um limite específico de migração deste composto estabelecido na RDC 56/2012 que corresponde a 0,6 mg/kg (ANVISA, 2013).

#### 1.3. Toxicocinética

O BPA é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e sua distribuição ocorre em diversos órgãos como fígado, rins, tecido adiposo, ovários, útero e diversas regiões do encéfalo, uma vez que o mesmo consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) (KIM et al., 2004). Sua biotransformação ocorre no intestino e no fígado de humanos e roedores, sendo a formação de um produto de biotransformação conjugado com o ácido glicurônico (GLcA-BPA) a principal via de biotransformação. Contudo, o produto da conjugação do BPA com sulfato, formando

4

um complexo S-BPA também foi encontrado em hepatócitos isolados de ratos, porém, em menor quantidade (ZALKO et al., 2003; YOSHIHARA et al., 2004; EFSA, 2010).

As enzimas envolvidas na conjugação do BPA são UDP-glucuronil-transferases (UGT) e sulfotransferases (SULT), sendo que a reação de sulfatação representa menos de 20% em humanos e menos de 5% em roedores. Ambas as famílias enzimáticas consistem de isoformas diferentes, podendo apresentar diferença tanto de afinidade quanto de eficiência na biotransformação do BPA (EFSA, 2010).

Foram relatadas variações na disponibilidade do GLcA-BPA em roedores e em humanos. Uma das características mais importantes é que, em roedores, o GLcA-BPA formado no fígado é transportado para a bile e em seguida submetido à circulação entero-hepática resultando em retenção e, consequentemente concentrações mais elevadas de BPA livre no sangue ao longo do tempo. Em seres humanos, o GLcA-BPA formado no fígado cai na corrente sanguínea e alcança os rins. Devido à alta solubilidade em água, o GLcA-BPA é rapidamente excretado na urina, sugerindo assim que a circulação entero-hepática não ocorra em humanos (VÖLKEL et al., 2002).

Alguns estudos realizados observando a biotransformação do BPA no fígado de roedores apresentaram também a formação de outros produtos de biotransformação além do GLcA-BPA. A formação de 5-hidroxi BPA (BPA catecol) sendo possivelmente convertido em BPA-o-quinona foram detectados a partir da oxidação via citocromo P450 na fração S9. Estudos anteriores observaram que o BPA-o-quinona promove a formação de adutos de DNA danificando o material genético, além disso, sabe-se que o BPA-o-quinona esta presente em reações redox e na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ATKINSON; ROY, 1995; YOSHIHARA et al., 2004; JAEG et al., 2004).

#### 1.4. Atividade Estrogênica do BPA

Desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias exógenas que alteram as funções do sistema endócrino e, por consequência, produzem inúmeros efeitos adversos à saúde. Os DEs influenciam na homeostase, desenvolvimento e na proliferação celular, mimetizando ou inibindo as ações dos hormônios endógenos e alterando a função de regulação do sistema endócrino. Alguns DEs possuem a capacidade de mimetizar o hormônio estrógeno, ligando-se a receptores estrogênicos e acarrentando disfunções em nosso organismo como problemas no sistema reprodutor masculino e feminino, surgimento de câncer de mama e de próstata, alteração de funções metabólicas podendo levar à diabetes, alteração de funções neuroendócrinás, problemas cardiovasculares, entre outros. (YOON et al., 2014).

O estrógeno é um hormônio sintetizado em todos os vertebrados, está envolvido no controle de funções e processos dos órgãos reprodutivos em adultos. Nos mamíferos, o estrógeno promove a formação de características sexuais secundárias femininas, regula os ciclos reprodutivos e afeta o comportamento sexual e maternal. Possui também múltiplas funções não-reprodutivas, afetando a força e a densidade óssea, as concentrações lipídicas no sangue, deposição de gordura, balanço de água e sais minerais e funções cerebrais, como a memória. Ainda que em menor extensão, a sinalização do estrógeno tem papel importante no sistema reprodutor masculino, como a maturação do esperma (EICK; THORNTON, 2011; ALBALAT et al., 2011; BONDESSON et al., 2014). O estrógeno desempenha um papel crucial no estágio inicial do desenvolvimento embrionário, e seus receptores são expressos mesmo em embriões de pré-implantação (HIROI et al., 1999). Existe uma diferença na distribuição dos receptores de estrógeno Eα e Eβ no organismo. Útero, mama, glândula pituitária, ossos e tecido cardiovascular apresentam ER-α, já a próstata, células granulosas do ovário, rins, pulmão e sistema imunológico possuem ER-β (LEE et al., 2007). Estudos em ratos e camundongos mostram que ambos os receptores são expressos tanto em neurônios como em células da glia em diferentes regiões do encéfalo O receptor ER-α é mais expresso no hipocampo e no córtex nas primeiras duas semanas de vida, já o receptor ER-β é mais abundante no córtex em encéfalos de animais adultos. Enquanto o papel do receptor alfa pareça estar principalmente relacionado na diferenciação sexual, o receptor beta está mais envolvido no desenvolvimento de funções e na migração de interneurônios no encéfalo (WILSON; WESTBERRY, 2009; BONDESSON et al., 2014).

Os receptores de estrógeno encontram-se no citoplasma e no núcleo da célula e funcionam como fatores de transcrição ligante-ativados, possuindo acesso direto ao DNA celular, incluindo o de neurônios. Uma vez formado o complexo estrógenoreceptor, uma sequência de eventos se inicia, levando a alterações na conformação da molécula dos receptores promovendo alterações na taxa de transcrição gênica, o que caracteriza a via clássica ou genômica (Figura 2). Essa característica permite ao estrógeno ativar ou inibir a transcrição de certos genes resultando em um estímulo ou inibição da síntese de determinadas proteínas, alterando o estado funcional da célula em questão (BEAR et al., 2002).



**Figura 2:** Possíveis mecanismos de ação do estrógeno na célula. O estrógeno pode atuar por meio de mecanismos genômicos ou não-genômicos. Os mecanismos genômicos envolvem a ativação dos receptores de estrógeno (ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ) que, em seguida, transloca para o núcleo da célula, como heterodímeros ou homodímeros para se ligar a elementos responsivos ao estrógeno (EREs) ou ativar os sítios da proteína ativadora 1 (AP-1), resultando na ativação da transcrição. Mecanismos não-genômicos ocorrem por meio da ligação do estrógeno em seus receptores ou a um receptor acoplado à proteína G (GPR30). Esta ligação pode ocorrer intracelularmente ou na membrana plasmática (mERS), ativando sistemas de segundos mensageiros, tais como os que envolvem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ou 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc), vias que também podem ativar a transcrição ou promover outros efeitos. (Adaptado de GOGOS et al., 2015).

Uma via alternativa de ação do estrógeno, porém não bem esclarecida, tem sido descrita. Nesta via, o estrógeno pode se ligar a sítios específicos na membrana plasmática, como o GPR30 (receptor acoplado a proteína G), ativando vias de sinalização associadas à membrana celular, como as ERKs (proteína quinase regulada por sinais extracelulares) e outros membros das MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos). Estas sinalizações podem promover modificações no estado de fosforilação de algumas proteínas e alterações nas concentrações intracelulares de segundos mensageiros, como o AMPc (3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico) e cálcio intracelular, sendo estes mecanismos característicos da chamada via não-

clássica ou não-genômica de ação do estrógeno (POZZO-MILLER; INOUE; MURPHY, 1999; WALTON; DRAGUNOW, 2000; GARCIA-SEGURA; AZCOITIA; DONCARLOS, 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004).

A atividade estrogênica do BPA foi descoberta ao acaso por investigadores da Universidade de Stanford que identificaram uma proteína de ligação de estrógeno em leveduras, e em seguida investigaram se a mesma possuía um ligante endógeno. Após o primeiro relato de que a levedura produziu estradiol, foi descoberto que a atividade estrogênica não veio a partir da levedura, mas sim de meios de cultura que foram preparados com água autoclavada em frascos de policarbonato. A partir da ligação da substância investigada com o receptor de estrógeno em bioensaios, o composto estrôgenico foi purificado e identificou-se que se tratava do BPA (JONATHAN; STEINMETZ, 1998; HIROI et al., 1999). Cerca de 2-3 µg/L de BPA foram detectados na água auto-clavada e em seguida foi testada a autenticidade da atividade estrogênica do BPA utilizando quatro critérios: a ligação ao receptor de estrógeno; a proliferação das células cancerosas de mama MCF-7; a indução dos receptores de progesterona e a reversão da ação estrogênica pelo tamoxifeno. Após os testes, o BPA mostrou-se eficaz como composto estrogênico (JONATHAN; STEINMETZ, 1998).

Até recentemente, o BPA era considerado um estrógeno sintético fraco, alguns bioensaios em útero de ratas, camundongos fêmeas e até em células provenientes de câncer de mama humano mostraram que o mesmo poderia ser de 1.000 a 2.000 vezes menos potente que o estrógeno. No entanto, estudos de mecanismos moleculares têm revelado uma variedade de caminhos pelos quais o BPA pode estimular respostas celulares em doses mais baixas. Resultados recentes mostram que em diversos tecidos, não só o BPA tem a eficácia do estradiol, como é igualmente potente (WELSHONS; NAGEL; SAAL, 2006; ACCONCIA; PALLOTTINI; MARINO, 2015).

Já está bem estabelecido que o BPA pode exercer alguns de seus efeitos por meio de sua ligação com os receptores ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , induzindo sinais estrogênicos que modificam a expressão de genes de resposta ao estrógeno. Os mecanismos envolvidos na regulação de genes mediada pelos receptores de estrógeno são muito complexos, e dependem do recrutamento de fatores de co-regulação específicos de cada tecido, que afetam de maneiras diferentes a interação dos receptores de estrógeno com seus elementos responsivos em diferentes genes-alvo (WETHERILL et al., 2007).

Sabe-se que o BPA, assim como o estrógeno, possui características lipofílicas sendo, portanto, capaz de atravessar facilmente as membranas celulares. O BPA possui a capacidade de interagir de forma diferenciada nos domínios dos receptores ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  de estrógeno ligando-se a eles tanto de forma clássica como nãoclássica. O BPA pode agir de forma diferenciada nos receptores E $\alpha$  e E $\beta$ , podendo se ligar aos receptores  $\beta$  como agonista e nos receptores  $\alpha$  como agonista ou antagonista, atividades estas que são concentração e tempo dependentes (HIROI et al., 1999; OSTERLUND; HURD, 2001; ACCONCIA; PALLOTTINI; MARINO, 2015; CORRALES et al., 2015).

Devido a sua característica de DE, o BPA vem tendo um importante papel na etiologia de algumas doenças, sendo que já existem estudos epidemiológicos correlacionando o BPA com diferentes doenças crônicas humanas (Figura 3) (REZG et al., 2014).



**Figura 3:** Mecanismos celulares e moleculares de ação do BPA na indução de doenças crônicas humanas. AR: receptor andrógeno, ER: receptor de estrógeno, ERK: proteína quinase regulada por sinais extracelulares, ERR-γ: receptor gamma relacionado ao estrógeno, GPR 30: proteína G acoplada ao receptor 30, GR: receptor de glicocorticoides, a JNK: proteína quinase c-Jun N-terminal, o NF-kB: fator nuclear kappa B, THR: receptor de hormônios da tiroide. (Adaptado de REZG et al., 2014).

A diabetes, doença que afeta cerca de 347 milhões de pessoas no mundo, vem sendo associada à exposição cada vez maior ao BPA. Estudos experimentais mostram que o BPA pode afetar o metabolismo da glicose por meio de diversos mecanismos, incluindo a resistência à insulina, disfunções nas células-beta, adipogênese, inflamação e estresse oxidativo, o que corrobora as correlações entre o BPA e a diabetes (ALONSO-MAGDALENA et al., 2006, 2010).

Outra correlação que foi evidenciada é o aumento das doenças cardiovasculares, assim como da sua predisposição e a exposição ao BPA, porém, são poucos os estudos que investigaram esta relação. Estes estudos relataram que há um risco do desenvolvimento de doença arterial coronariana em homens e mulheres aparentemente saudáveis expostos ao BPA. Indivíduos com estenose coronariana grave apresentaram maior concentração de BPA na urina em comparação aos indivíduos sem comprometimento do sistema cardiovascular (MELZER et al., 2012 a,b).

O BPA pode ainda estar relacionado ao aumento de disfunções renais, doenças respiratórias, além de participar da indução de câncer em diferentes sistemas do nosso organismo (REZG et al., 2014). De fato, alguns estudos sugeriram que o BPA pode atuar como um agente cancerígeno levando à incidência de tumores malignos nas glândulas mamárias. Mais ainda, outros estudos mostraram que o BPA pode levar ao desenvolvimento de câncer hematopoiético e tumores nos testículos de animais experimentais (HUFF, 2001; KERI et al., 2007; ACEVEDO et al., 2013; SOTO et al., 2013). O aumento de certos tipos de câncer devido a exposição ao BPA pode ocorrer devido ao mesmo participar de diversos processos celulares, tais como a metilação do DNA e a remodelação da cromatina durante o desenvolvimento do organismo. Outra forma do BPA levar ao surgimento de diferentes tipos de câncer é por meio da sua ligação e afinidade com os receptores de estrógeno (KERI et al., 2007; MICHAŁOWICZ, 2014).

Além do potencial para promover o surgimento de diversos tipos de doenças crônicas, o BPA é bastante conhecido por causar disfunções no sistema reprodutivo, tanto feminino como masculino. Já foi comprovado que a exposição de ratas prenhes ao BPA pode levar à abertura vaginal precoce nas fêmeas, assim como antecipar o ciclo estral em sua prole. No caso de animais machos, pode levar ao aumento do peso

da próstata (MARKEY et al., 2003). Outros estudos mostraram que a exposição ao BPA de roedores ainda em desenvolvimento evidenciou alterações na estrutura e funções encefálicas devido ao efeito deste composto nos receptores hormonais. O BPA também pode causar alterações no desenvolvimento de órgãos reprodutivos, na excreção de testosterona e na produção de esperma em alguns animais (RICHTER et al., 2007).

Mudanças comportamentais como hiperatividade, aumento da agressividade, alterações no comportamento social e sexual, alterações no sistema cognitivo e ansiolítico também foram observadas em animais expostos ao BPA (FARABOLLINI et al., 2002; KAWAI et al., 2003; ISHIDO et al., 2004).

Aos efeitos causados pelo BPA podem ser incluídos também alterações de mecanismos moleculares, incluindo alterações genéticas (aduto de DNA, a aneuploidia, mutagenicidade), alterações epigenéticas (metilação do DNA, modificações de histonas, expressão de microRNA), estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e perturbações na sinalização celular (REZG et al., 2014). O BPA pode ainda inibir a atividade da aromatase, o que diminuiria a conversão da testosterona em estradiol, podendo causar implicações na diferenciação sexual no encéfalo de animais em desenvolvimento. Estas atividades adicionais evidenciam o potencial do BPA em afetar outras vias endócrinas por diversos mecanismos (RUBIN, 2011).

#### 1.5. Morte Celular

Os processos de apoptose e necrose constituem os principais mecanismos pelos quais ocorre a morte celular. Cada modo de morte celular é caracterizado por alterações morfológicas particulares e vias de sinalização molecular distintas que podem ser observados de uma maneira geral na Figura 4 (LAMKANFI; DIXIT, 2010).

O termo apoptose foi criado originalmente para descrever um padrão de alterações morfológicas relacionadas ao que chamamos de "morte celular programada" normal e em alguns processos patológicos *in vivo*. A apoptose ocorre no processo de formação de órgãos durante o desenvolvimento embrionário e na homeostase de organismos adultos. Dentre os seus processos morfológicos podemos citar: retração celular (picnose), perda do contato com células vizinhas, condensação

da cromatina e formação de vacúolos citoplasmáticos que levam à formação de bolhas na célula, também chamados de corpos apoptóticos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; WYLLIE et al., 1980; STRASSER; CONNOR; DIXIT, 2000).

Características bioquímicas da apoptose incluem aumento de cálcio, espécies reativas de oxigênio, diminuição no potencial da membrana mitocondrial interna, ativação de proteases seletivas, clivagem do DNA em fragmentos internucleossômicos, clivagem seletiva de várias proteínas celulares e translocação de fosfatidilserina para o exterior da membrana plasmática (STRASSER; CONNOR; DIXIT, 2000; SALVESEN; RIEDL, 2008).

A necrose por sua vez tem sido tradicionalmente usada por patologistas para se referir a áreas de tecido morto, sem se referir a um mecanismo particular pelo qual a morte celular ocorreu. No entanto, o termo também é popular como uma descrição de um modo de morte celular independente de caspase, que pode ser observado sob condições de isquemia, hipóxia, neoplasia, infecção microbiana, inflamação, e exposição a toxinas. Notavelmente, as características morfológicas de células necróticas são opostas às observadas durante a apoptose (VANDEN BERGHE et al., 2010).

Enquanto que no processo de apoptose as células diminuem, o volume das células necróticas aumenta. Ao contrário da fragmentação do DNA observada durante a apoptose, a necrose apresenta uma hidrólise mais desorganizada, embora ampla, de cromatina. Finalmente, enquanto que as células em apoptose formam corpos apoptóticos fechados por membranas intactas, a integridade da membrana plasmática é perdida precocemente durante a necrose (LAMKANFI; DIXIT, 2010)

A lise celular conduz inevitavelmente ao extravazamento do conteúdo intracelular para o espaço extracelular, tornando a necrose um processo considerado como pró-inflamatório e patológico de morte celular que resulta em danos nos tecidos (MATZINGER, 1994; SHI; ZHENG; ROCK, 2000).



**Figura 4:** Diferenças morfológicas entre os processos de morte celular apoptose e necrose. A retração da integridade da membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos tornam a apoptose um programa de morte imunologicamente silencioso. Em contraste, o processo de inflamação é observado quando as células morrem por necrose, secretando citocinas pró-inflamatórias e liberando seu conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular. A condensação da cromatina e a fragmentação do DNA são características da apoptose, enquanto que os núcleos de células necróticas incham juntamente com as demais organelas (Adaptado de LAMKANFI; DIXIT, 2010).

A morte celular causada pelo processo apoptótico é caracterizada pela ativação de uma série de proteases conhecidas como caspases. A cascata de caspases é normalmente sinalizada em dois passos: caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) são recrutadas em grandes complexos de proteínas onde são submetidas à oligomerização e se ativam (BOATRIGHT et al., 2003; OBERST et al., 2010). O DISC (*Death-induced signaling complex*), juntamente com o apoptossomo, são os principais complexos responsáveis pela ativação das caspases iniciadoras e ambos estão intimamente ligados à ativação de ambas as vias da apoptose, a via intrínseca e a extrínseca (Figura 5) (SAELENS et al., 2004).



**Figura 5**. Ativação da Apoptose pelas vias Extrínseca e Intrínseca. A interação do ligante CD95 com o seu receptor induz a formação de um complexo que recruta fator de morte celular, representado por FADD. Este, por sua vez, cliva a pró-caspase-8 e, consequentemente, ativa a caspase-8 que age clivando a pró-caspase-3 em caspase-3, responsável pela formação de substratos apoptóticos. A clivagem da pró-caspase-8 pode ser inibida por uma proteína presente no citosol celular (c-FLIP). A morte celular pode ser desencadeada por estimulação da via mitocondrial em resposta à sinalização extracelular e por danos ao DNA. Há ativação de membros pró-apoptóticos, como o caso da proteína Bax, que estimula a formação de poros na mitocôndria, liberando citocromo c que, juntamente com a Apaf-1 e a pró-caspase-9, formam o apoptossomo. Esse complexo cliva a pró-caspase-3, ativando-a. Além do citocromo c, há liberação da AIF (flavoproteína capaz de inibir a clivagem da pró-caspase-3). Além disso, pode ocorrer a clivagem da proteína Bid por meio da caspase-8, estimulando a liberação de citocromo c pela mitocôndria. As linhas que terminam em setas representam ativação, enquanto que as que terminam em traço representam inibição (Adaptado de HENGARTNER, 2000).

A via extrínseca da apoptose é desencadeada pela ativação de ligantes dos receptores de morte, tais como o TNF (*Tumoral Necrosis Factor*), Fas-ligante (FasL) e o (TRAIL) aos seus respectivos receptores transmembranares (STRASSER; CONNOR; DIXIT, 2000; PETER; KRAMMER, 2003).

O Fas é um dos receptores de morte mais bem caracterizados e desempenha um papel crucial em uma variedade de processos imunológicos. A agregação destes receptores com a molécula FADD (*Fas-associated death domain*) promove o recrutamento e a ativação das caspases 8 e 10, iniciando a formação do DISC (LAMKANFI; DIXIT, 2010). Em algumas células, a ativação de caspase-8 leva à 14 clivagem de pró-caspase-3 e ativação de caspase-3, que é considerado o ponto de não retorno na apoptose dependente de caspase. Em outras células, a caspase-8 ativada leva à clivagem da proteína pró-apoptotica BID (*BH3-interacting domain death agonist*), que leva à formação de permeabilizadores da membrana mitocondrial, conhecido por BID truncado (tBID), causando estresse e disfunção mitocondrial (GALLUZZI et al., 2012).

Em contrapartida, a via intrínseca da apoptose é iniciada quando as proteínas apoptogênicas tais como citocromo c, SMAC/Diablo, e HtrA2/Omi são libertadas a partir do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol, essa liberação ocorre em resposta a uma variedade de danos que podem ser causados por quimioterápicos, radiação UV, infecção microbiana, entre outros. O extravasamento de tais proteínas se dá quando poros na membrana externa mitocondrial se abrem; esse processo é chamado de permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP - *mitochondrial outer membrane permeabilization*) que resultará no colapso no potencial da membrana (SAFA, 2012). A abertura desses poros é controlada por proteínas que são membros da família Bcl-2. Elas podem ser divididas em proteínas pró-apoptóticas: Bax e Bak, que quando oligomerizam-se promovem a abertura dos poros na membrana mitocondrial e proteínas anti-apoptóticas: Bcl-2 e Bcl-xL, que quando associadas com Bax e Bak as inativam (SHORE; NGUYEN, 2008; SPENCER; SORGER, 2011).

A liberação do citocromo c juntamente com o Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) leva à formação do apoptossomo. Este complexo proteíco de mais de 700 kDa promove a ativação da caspase-9, que uma vez ativada, irá clivar e ativar as caspases efetoras (caspases-3, 6 e 7) degradando os substratos nucleares do citoesqueleto e do citoplasma que culminarão na morte celular (CAIN; BRATTON; COHEN, 2002; SAELENS et al., 2004).

Para atingir plena atividade, as caspases efetoras processadas precisam ser liberadas de seus inibidores endógenos IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*). Esta tarefa é realizada por proteínas de morte mitocondriais, tais como HtrA2/Omi e SMAC/Diablo, que "sequestram" as IAPs permitindo a total ativação das caspases efetoras (FISCHER; JÄNICKE; SCHULZE-OSTHOFF, 2003; SAELENS et al., 2004; TIMMER; SALVESEN, 2007; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).
Após extensa revisão pelo Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos, estudos avaliando a toxicidade do BPA no desenvolvimento de fetos, bebês e crianças, especialmente os efeitos sobre o encéfalo e comportamento, ganharam mais atenção. Estes estudos indicaram que o BPA pode induzir anomalias no encéfalo e tubos neurais em embriões de roedores cultivados *in vitro*, além de inibir a proliferação e diferenciação celular e induzir a apoptose em células neuronais como, por exemplo, células do mesencéfalo e do hipocampo (LIU et al., 2013). Uma vez que foram relatados efeitos como déficit na memória espacial, aumento da ansiedade e diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) a partir de estudos *in vivo* realizados com o BPA, o hipocampo mostrou-se uma estrutura de grande importância para o estudo das ações do BPA (FAN et al., 2013; LUO et al., 2013).

A indução da apoptose em células neuronais pode ocorrer por diversas vias de sinalização. Foi observado em estudos realizados com células de linhagem hipocampal HT-22 que o BPA pode induzir a apoptose pela geração EROS devido ao aumento intracelular de cálcio, alteração da via de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs), proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), proteínas quinases c-Jun N-terminal (JNK) e aumento de caspase 3. Observou-se também que o BPA ativou a via intrínseca da apoptose em células do mesencéfalo (LIU et al., 2013). Poucos estudos avaliam os efeitos do BPA no sistema nervoso central, tendo sido utilizados diferentes tipos de culturas celulares, além de diferentes parâmetros terem sido avaliados. Assim, nossa proposta é de estudar os mecanismos de sinalização envolvidos no processo apoptótico causado pelo BPA em cultura primária de hipocampo, além de estimar quanto de BPA é absorvido por essas células. O hipocampo é uma estrutura fundamental para as funções cognitivas, função esta que tem se mostrado comprometida em alguns indivíduos expostos à esta substância.



#### 2.OBJETIVOS

Avaliar a neurotoxicidade do BPA com ênfase nas vias de sinalização de apoptose em cultura primária de hipocampo.

#### 2.1. Estratégias experimentais

Os possíveis efeitos neurotóxicos do BPA foram avaliados *in vitro* em cultura primária hipocampal por meio dos seguintes ensaios.

- Viabilidade celular mensurando a atividade mitocondrial por meio do ensaio MTT;

- Determinação da citotoxicidade pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH);

 Quantificação do Bisfenol A em meio de cultura após os períodos de exposição por HPLC-PDA;

 Avaliação da atividade apoptótica e necrose por Citometria de Fluxo utilizando os marcadores Anexina-V e PI;

 Avaliação da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular pela quantificação da fluorescência do Fluo-4 AM (Fluo-4);

- Análise das caspases 8, 9 e 3, por Citometria de Fluxo;

 Análise das proteases Bax e Bcl-2, caspases 8, 9 e 3 e receptores de estrógeno Eα e Eβ por Western Blotting.

# 3. Materíais e

Métodos

#### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

O projeto foi aprovado pelas comissões de ética das Faculdades de Ciências Farmacêuticas (nº 473/2014) e Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (nº 3999110614). (Anexos 1 e 2)

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, prenhes, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Durante o período em que permaneceram no biotério os animais tiveram acesso livre à água e comida (ração para roedores Nuvlab CR1<sup>®</sup>), com temperatura controlada ( $21 \pm 2 \, {}^{\circ}$ C) e ciclo claro-escuro de doze horas (luz ligada às 7h00). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno (16 cm de altura, 30 cm de largura e 38 cm de comprimento) forradas com maravalha, contendo 4 fêmeas por caixa. Todos os experimentos foram realizados no período claro (8h00 – 12h00).

Para o cruzamento, foi colocado 1 macho para cada 3 fêmeas, permanecendo por uma noite. Na manhã seguinte, os animais foram separados, e as fêmeas submetidas ao lavado vaginal para confirmação do acasalamento e verificação da prenhez. Uma vez constatada a prenhez, as ratas foram separadas e identificadas na região da cauda.

#### 3.2 Cultura primária de Neurônios Hipocampais

O método de estabelecimento da cultura foi baseado nos trabalhos de Banker & Cowan (1977), Huettner & Baughman (1986) e Jahr & Stevens (1987) e é composta por 93% de neurônios, conforme caracterizado por Garcia et al. (2012).

Ratas prenhes entre o 18-19 dia gestacional foram anestesiadas com Xilazina/Cetamina (5:50 mg/kg) e uma cesariana foi realizada para a retirada dos fetos. Os fetos foram imediatamente decapitados com tesoura, a caixa craniana aberta e os hemisférios encefálicos foram separados. Com auxílio de uma lupa, os hipocampos foram identificados e dissecados. Para a manutenção do tecido, a estrutura foi mantida em solução de meio neurobasal (Gibco<sup>®</sup>) estéril contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>). O tecido foi

manuseado sobre um papel de filtro umedecido em EBSS *Earle's Balanced Salt Solution*, sobre uma placa de Petri e gelo por baixo.

As células hipocampais isoladas foram obtidas utilizando-se o método de digestão proteolítica com tripsina (GARCIA et al., 2012).

Sob fluxo laminar, os hipocampos foram transferidos para uma placa de petri, onde foram lavados com solução de EBSS filtrada por duas vezes, sendo picotados em seguida de modo a obter pequenos pedaços de tecido. O material foi então transferido para um Erlenmeyer (25 mL) contendo uma solução de tripsina (0,25%) (Gibco<sup>®</sup>), cujo pH foi ajustado, com carbogênio, para 7,4. O frasco contendo os fragmentos de hipocampo foi colocado em banho com agitação plana a 37°C, permanecendo por 10 minutos. Em seguida, a solução resultante da digestão com tripsina foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL contendo 2 mL de solução de descanso (4 mL de EBSS, contendo 222 µL de DNAse 5000 U/mL (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) ressuspensa em EBSS e 444 µL de soro fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>®</sup>) 10%, ajustando o pH para 7,2-7,4 com o carbogênio. O tubo foi posteriormente centrifugado a 1.258 rpm (300g) por 3 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi desprezado e o restante ressuspendido em 2 mL da mesma solução de descanso. O tecido foi então disperso com pipetas Pasteur com diâmetros decrescentes, por cerca de 20 vezes cada. O frasco foi centrifugado novamente a 1.258 rpm (300g) por 7 minutos a 20°C, sendo que após este período, o sobrenadante foi desprezado e o resultante ressuspenso em 1 mL de meio pronto constituído de 40 mL de meio neurobasal, sem fenol, 100 µL de glutamina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) 200 mM, 400 µL de penicilina/estreptomicia (10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina), 800 µL de suplemento B-27 (Gibco<sup>®</sup>) e 100 µL de glutamato (Sigma Aldrich®) 10 mM.

Uma alíquota de 10 µL da amostra foi corada com 10 µL de azul de Tripan (concentração de 10% em *Phosphate* Buffered *Saline* - PBS) para a contagem do número de células obtidas. As células foram contadas em câmara de Neubauer e, em função do número de células obtidas, foi realizada diluição com meio neurobasal de modo a obter o número de células/mL proporcional para o diâmetro dos poços das diferentes placas utilizadas. Os poços foram pré-tratados com poli-I-lisina (PLL) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>), para melhor aderência dos neurônios à mesma. As placas com as células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 horas, metade

do meio de cultura foi substituído por um meio novo (neurobasal com suplemento B-27, glutamina, glutamato e antibiótico).

Para o preparo das placas com PLL, adicionou-se a quantidade suficiente da solução de PLL para cobrir o fundo do poço de uma placa estéril. Após cerca de 30 minutos, para certificar o contato do polímero com a placa, o excedente foi removido e aguardou-se até que a placa estivesse totalmente seca. Todas as etapas foram realizadas sob fluxo laminar.

#### 3.3. Determinação da Atividade Mitocondrial (MTT)

Foi utilizado o método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5difeniltetrazólio, ou brometo de tetrazólio) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) para avaliar a atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983; LIU et al., 1997). Na presença da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, a qual está ativa quando o metabolismo da cadeia respiratória está intacto, o MTT é reduzido em formazan que é, posteriormente, solubilizado em solvente orgânico e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 570 nm (ABE; SAITO, 1999; IOUDINA; UEMURA; GREENLEE, 2004).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com uma densidade de  $5x10^4$  células/poço. Após sete dias de crescimento, as células foram incubadas com diferentes soluções de BPA (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1% nas seguintes concentrações (50, 100, 150, 200 e 250 µM). Além das soluções de BPA, foram utilizados o controle (meio neurobasal, glutamina e antibiótico), um segundo controle (meio neurobasal, glutamina e DMSO a 0,1%) e como controle positivo foi utilizado KCI 250 mM, conforme padronizado pelo nosso grupo (Garcia et al., 2012). As exposições foram realizadas nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas.

Após os períodos de exposição, todo o meio de cultura foi substituído por um novo meio (100  $\mu$ L) contendo o sal de MTT (5 mg/mL em PBS). As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e a placa foi coberta com papel alumínio para proteção contra a luz. Posteriormente, a solução de MTT foi retirada e em seguida foram adicionados 200  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) em todos os poços e a placa foi submetida à agitação por 30 minutos. Após o período de agitação foi feita a leitura utilizado o leitor de microplacas multicanal *Synergy H1*® (Biotek – Winooski,

VM, USA). Foram realizadas três culturas independentes e cada tratamento foi realizado em sextuplicata, os dados foram analisados pelo software *Gen 5 data analysis* versão 5. e os resultados foram expressos em porcentagem relativos ao grupo controle.

#### 3.4. Determinação da Citotoxicidade (LDH)

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica, assim sua detecção no fluído extracelular é um indicativo de morte ou perda da integridade da membrana. Constitui-se, portanto, em um método sensível e eficaz na avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade (LOPES, 2010). Após os períodos de incubação (6, 12, 24 e 48 horas) com as soluções de exposição, conforme descrito no item anterior, o sobrenadante foi retirado da placa de 96 poços e armazenado a -80°C até o momento do experimento. O ensaio foi realizado utilizando o Kit Cytotox-ONE<sup>TM</sup> Homogeneous Membrane Integrity Assay - Promega. O princípio deste método baseia-se na conversão de resazurina em um produto fluorescente, a resorufina, na presença de lactato, NAD+ e diaforase. A geração do produto fluorescente resorufina é proporcional à quantidade de LDH. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de microplacas multicanal Synergy H1® (Biotek – Winooski, VM, USA) utilizando comprimento de onda (λ<sub>excitação</sub> = 560 nm; λ<sub>emissão</sub> = 590 nm). Uma vez que o kit é fotossensível, o experimento foi realizado no abrigo da luz. O experimento foi realizado em três culturas independentes e cada tratamento foi realizado em quadruplicata, os dados foram analisados pelo software Gen 5 data analysis versão 5. e os resultados foram expressos em porcentagem relativos ao grupo controle.

#### 3.5. Determinação da Concentração de BPA Absorvido por Células de Cultura Primária Hipocampal

Para a determinação da taxa de absorção do BPA, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços (1,8x10<sup>6</sup> células/poço). Após o período de adesão celular (7 dias), iniciou-se a exposição com 200  $\mu$ M ou 250  $\mu$ M de BPA (DMSO 0,1%, v:v) diluído no meio de cultura, durante os intervalos de 3, 6 e 9 horas. Alíquotas do

meio de cultura (100 µL) foram injetadas no sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) - DAD (*Diode–Array Detection*) constituído por um equipamento da empresa Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com três bombas LC–20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA–20AV, um auto injetor (Proeminence SIL– 20AC), uma válvula de comutação de fluxo de 6 canais (FCV–20AH2) e um forno para colunas (CTO–10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM–20A. Os dados foram processados pelo *software* LC–Solution 1.21. (Shimadzu, Japão). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: uma coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré–coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H<sub>2</sub>O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% em metanol (Solução B), a 40 °C, com fluxo de 1 mL/minuto (0 – 25 minutos, 20 – 100 % de B; 25 – 27 minutos, 100 % de B; 27 – 28 minutos, 100 – 20% de B; 28 – 38 minutos, 20% de B;). O detector DAD foi fixado em 278 nm para a quantificação do BPA livre no meio de cultura.

#### 3.6. Avaliação da Atividade Apoptótica e Necrótica por Citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina-V e PI

A análise por citometria de fluxo foi realizada após marcação com o conjugado fluoresceína (FITC) - Anexina V (Anexina V - FITC) e lodeto de Propídio (PI). As células foram ajustadas para a concentração de 7,2x10<sup>5</sup> células/poço e plaqueadas em placas de 12 poços. Foram utilizados os seguintes grupos: Controle (meio neurobasal, glutamina e antibiótico), segundo controle (meio neurobasal, glutamina e DMSO a 0,1%), controle positivo de morte utilizando Glutamato 10 mM e o BPA em duas concentrações 200 e 250  $\mu$ M, pelos períodos de 3, 6 e 9 horas. Após o período de incubação, foi realizado o desprendimento das células da placa e a centrifugação das mesmas. As células foram lavadas com PBS gelado e então ressuspendidas em 100  $\mu$ L do *Binding Buffer* na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/mL e incubadas por 15 minutos no abrigo da luz com 1  $\mu$ L de Anexina V-FITC e 1  $\mu$ L de PI provenientes do *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* – BD Pharmingen<sup>TM</sup>. A Anexina V é uma proteína ligada a fosfolipídios que tem alta afinidade pela fosfatidilserina, já o PI foi utilizado para distinguir células viáveis de não viáveis. A leitura e a análise da

marcação das células hipocampais foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus, a fluorescência da Anexina-V/FITC foi medida nos canais FL-1 e Pl no canal FL-2. Foram realizadas três culturas independentes e os resultados foram expressos em porcentagem relativos ao grupo controle.

#### 3.7. Avaliação de Concentração de Ca<sup>2+</sup> Intracelular

Para avaliar a presença do cálcio intracelular, foi utilizado o indicador de Ca<sup>2+</sup> Fluo-4 AM (Fluo-4) (*Molecular Probe - Life Technologies®*), pois ao entrar em contato com o cálcio, emite fluorescência, a qual pode ser quantificada por meio de um leitor de fluorescência e a mesma é diretamente proporcional à concentração de cálcio intracelular.

As células foram cultivadas em placa de 96 poços ( $5x10^4$  células por poço) e no sétimo dia após a realização da cultura primária hipocampal, foi realizado o experimento. O indicador de Ca<sup>2+</sup> Fluo-4 AM (Fluo-4) foi solubilizado com DMSO obtendo-se assim uma solução com concentração de 5 mM. Esta solução foi adicionada a um tampão de ensaio (50 mL de HBSS 10X, 10 mL de HEPES 1 M, 175 mg de NaHCO3, e água Milli-Q q.s.p. 100 mL, pH 7,4) para a obtenção de uma solução de 5 µM do corante Fluo-4. Foram adicionados 40 µL do corante Fluo-4 (5 µM) em cada poço da placa de 96 poços e a mesma foi incubada em estufa, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 60 minutos. Decorrido esse período, o corante foi removido da placa, as células foram lavadas com o mesmo tampão de ensaio e mantidas em tampão (60 µL) a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período a leitura da fluorescência basal do cálcio foi realizada, e posteriormente foram adicionadas as substâncias de interesse e a medida da fluorescência foi feita novamente.

O procedimento foi realizado no abrigo da luz, visto que o Fluo-4 AM é fotossensível e ambas as leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de  $(\lambda_{excitação} = 485 \text{ nm}; \lambda_{emissão} = 520 \text{ nm})$  utilizado o leitor de microplacas multicanal *Synergy H1*® (Biotek – Winooski, VM, USA). Foram realizadas duas culturas independentes, e os tratamentos foram realizados entre 10 a 35 replicatas, os dados foram analisados pelo software *Gen 5 data analysis* versão 5 e os resultados foram expressos em porcentagem relativos ao grupo controle.

#### 3.8. Avaliação da Expressão dos Marcadores Celulares (Caspases 8, 9 e 3) por Citometria de Fluxo

As células hipocampais foram cultivadas em placas de 12 poços (7,2x10<sup>5</sup> células por poço) e tratadas com as substâncias de interesse pelos períodos de 3, 6 e 9 horas. Para avaliação da expressão dos marcadores celulares (caspases 8, 9 e 3) foram utilizados os Kits da marca Calbiochem<sup>®</sup>.

Cada kit possui um marcador FITC específico (Tabela 1), este marcador se liga de forma irreversível à caspase ativada, emitindo um sinal de fluorescência que pode ser mensurado por citometria de fluxo.

| Código | Nome do produto                     |  |
|--------|-------------------------------------|--|
| QIA113 | Caspase-8 Detection Kit (FITC-IETD- |  |
|        | FMK)                                |  |
| QIA115 | Caspase-9 Detection Kit (FITC-LEHD- |  |
|        | FMK)                                |  |
| QIA91  | Caspase-3 Detection Kit (FITC-DEVD- |  |
|        | FMK)                                |  |

**Tabela 1:** Códigos e nomes dos kits utilizados para o ensaio de citometria de fluxo na avaliação da expressão das proteínas Caspases 8, 9 e 3.

As células foram expostas às substâncias de interesse pelos períodos de 3, 6 e 9 horas, e desprendidas da placa utilizando uma solução de tripsina (0,25%), que foi neutralizada com SFB (10%). Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Após a lavagem das células com PBS, foi adicionado 300  $\mu$ L do *Wash Buffer* fornecido no kit e 1  $\mu$ L do marcador FITC (específico para cada caspase). As células foram incubadas por 30 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e ao final da incubação as células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com o *Wash Buffer* por duas vezes mantendo a centrifugação de 3000 rpm por 5 minutos. O pellet resultante da última centrifugação foi ressuspendido em 300  $\mu$ L do *Wash Buffer* e a leitura e a análise da marcação das

células hipocampais foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus no canal FL-1. 0s resultados foram expressos em média da intensidade de fluorescência.

#### 3.9. Análise das Proteínas por Western Blotting

As células hipocampais foram tratadas com as substâncias de interesse pelos períodos de 3, 6 e 9 horas. Ao término da exposição, as células foram lavadas com PBS e desprendidas com solução de tripsina (0,25%) e lisadas com tampão de lise RIPA. Os extratos celulares foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos à 4°C. Após a quantificação das proteínas totais na amostra pela técnica de Bradford (1976), foi realizada a análise da expressão das proteínas anti e pró-apoptóticas propostas, (Bax, Bcl-2, caspases 8, 9 e 3).

Foram utilizadas 40 µg de proteínas totais para todas as proteínas estudadas. As amostras foram preparadas com tampão Laemmli (1970) e aquecidas à 99°C durante 5 minuto, antes de carregar o gel de acrilamida 15%. A separação eletroforética foi realizada por 160 minutos sob diferença de potencial elétrico de 90V nos primeiros 10 minutos, e 100V até o final da eletroforese. A transferência foi realizada em membrana de Fluoreto de Polivinilideno - PVDF em 0,40 A por 120 minutos para as proteínas Bax, Bcl-2 e os receptores de estrógeno E $\alpha$  e E $\beta$ . Para as caspases 8, 9 e 3 a transferência foi realizada fixando o potencial elétrico de 70 V por 180 minutos em geladeira. Após a transferência, as membranas foram rapidamente coradas com corante de *Ponceau* para a verificação da eficácia do processo de transferência. Após esse processo, as membranas foram lavadas para a total remoção do corante de *Ponceau*, e então incubadas com solução bloqueadora (5% de leite em TBS-T – *Tris Buffered Saline* com Tween), com a finalidade de saturar os sítios de ligação inespecíficos. A Tabela 2 apresenta de forma resumida a composição das soluções utilizadas no ensaio de *Western Blotting*.

| Solução                 | Composição  |
|-------------------------|---|
| Tampão de eletroforese  | 25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% SDS   |
| Tampão de transferência | 25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% Metanol   |
| TBS-T                   | 20 mM Tris; 150 mM NaCl pH 7,6; 0,2% Tween  |
| Solução bloqueadora     | 5% leite desnatado (Molico <sup>®</sup> ) em TBS-T (p/v)  |
| Tampão Laemmli          | Tris-HCl 25 mM pH 6,8; 2% SDS; 10% Glicerol; 0,002% azul<br>de bromofenol                           |
| Tampão de lise RIPA     | Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton-X<br>1% (v/v) e Ácido Deoxicolato 0,25% (p/v) |

Tabela 2: Composição das soluções utilizadas no ensaio de Western Blotting

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* à 4°C, sob agitação constante, com os anticorpos primários específicos para Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-8, caspase-9, receptores E $\alpha$  e E $\beta$  (Tabela 3), seguindo as especificações recomendadas pelo fabricante (Tabela 3). Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T (6x de 5 minutos) e então incubadas com o anticorpo secundário (Diluição 1:3000) conjugado com peroxidase *horseradish* (GE Heathcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). O sinal foi detectado com o uso do kit de detecção luminescente *ECL Western Blotting detection Reagents* (GE Heathcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). A  $\beta$ -actina (controle interno - Sigma Aldrich®) foi utilizada como fator normalizador. As imagens foram detectadas (ImageQuant 400, GE Healthcare) e digitalizadas (IQuantCapture 400, v.1.0.0, GE Healthcare). As intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas pelo programa ImageQuant (Amersham Imager 600RGB, GE Healthcare) e expressas em unidades arbitrárias. O cálculo foi realizado pela razão entre a densitometria das bandas específicas e das bandas de  $\beta$ -actina.

| Códigos  | Anticorpo<br>primário | Diluição | Fabricante                          | Anticorpo<br>secundário |
|----------|-----------------------|----------|-------------------------------------|-------------------------|
| #2772    | Anti Bax              | 1:1000   | Cell Signalling                     | Anti Rabbit             |
| #2876    | Anti Bcl-2            | 1:2500   | Cell Signalling                     | Anti Rabbit             |
| ab32351  | Anti Caspase-3        | 1:1000   | Abcam                               | Anti Rabbit             |
| ab119892 | Anti Caspase-8        | 1:1000   | Abcam                               | Anti Mouse              |
| ab28131  | Anti Caspase-9        | 1:500    | Abcam                               | Anti Mouse              |
| sc-787   | Anti ERα              | 1:200    | Santa Cruz<br>Biotechnology,<br>INC | Anti Mouse              |
| ab3576   | Anti ERβ              | 1:500    | Abcam                               | Anti Rabbit             |

Tabela 3: Nomes, diluições e marcas dos anticorpos utilizados no ensaio de Western Blotting.

#### 3.10. Análise estatística

Os resultados foram comparados pela análise de variância (ANOVA), seguido do teste de *Comparação múltipla de Dunnett's*, onde as diferenças foram consideradas significativas a partir de p < 0,05. Para a determinação da concentração de BPA foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

4. Resultado

#### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Determinação da Atividade Mitocondrial (MTT)

A partir do ensaio do MTT (Figura 6), foi observado que as células hipocampais expostas às concentrações de 50, 100 e 150 µM de BPA pelos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas não apresentaram redução estatisticamente significativa da atividade mitocondrial em relação ao controle.

Por outro lado, as concentrações de 200 e 250 µM de BPA, nos períodos de 12, 24 e 48 horas, apresentaram diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle. A concentração de 250 µM também apresentou redução estatisticamente significativa da atividade mitocondrial das células expostas ao BPA no período de 6 horas.



**Figura 6** – Resultados dos ensaios da atividade mitocondrial (MTT) (n=3, culturas independentes realizadas em sextuplicata). A) 6 horas de exposição ao BPA; B) 12 horas de exposição ao BPA; C) 24 horas de exposição ao BPA e D) 48 horas de exposição ao BPA. Ctrl = controle; DMSO = dimetilsulfóxido; KCI = cloreto de potássio. Dados expressos como "média ± EPM"; \*\*p<0,01 e \*\*\*\*p<0,0001 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett*'s).

#### 4.2. Determinação da Citotoxicidade (LDH)

Não houve liberação de LDH de forma estatisticamente significativa para o meio de cultura após as exposições da cultura primária de hipocampo à diferentes concentrações do BPA nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas (Figura 7).



**Figura 7** - Resultados dos ensaios de citotoxicidade (Lactato Desidrogenase - LDH) (n=3, culturas independentes realizadas em quadruplicata). A) 6 horas de exposição ao BPA, B) 12 horas de exposição ao BPA, C) 24 horas de exposição ao BPA e D) 48 horas de exposição ao BPA. Ctrl = controle; DMSO = dimetilsulfóxido; KCI = cloreto de potássio. Dados expressos como "média ± EPM"; \*p<0,05 e \*\*\*\*p<0,0001 em relação ao Ctrl (ANOVA e comparação múltipla de Dunnett's).

#### 4.3. Determinação da Concentração de BPA Absorvido pelas Células de Cultura Primária Hipocampal

Na Figura 8A pode ser observado o cromatograma de uma solução padrão de 250 µM de BPA, e na Figura 8B o cromatograma do BPA em meio de cultura de células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal expostas a 250 µM de BPA pelo período de 9 horas.



**Figura 8 -** Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD monitorando 278 nm. **A.** Solução padrão de Bisfenol A na concentração de 250 µM. **B**. Meio de cultura de células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal expostas por 9 horas a 250 µM de Bisfenol A.

Para observar a taxa de absorção do BPA pelas células da cultura primária de hipocampo, a análise foi realizada utilizando duas concentrações diferentes de BPA (200 e 250  $\mu$ M) em três períodos de tempo (3, 6 e 9 horas) de exposição. Na Figura 9 é possível observar a porcentagem de BPA absorvido nos períodos de tempo descritos abaixo. Houve uma maior taxa de absorção de BPA pelas células no período de 6 horas de exposição para a concentração de 250  $\mu$ M, chegando em torno de 20% de absorção. Já para a concentração de 200  $\mu$ M a maior taxa de absorção se deu no período de 9 horas, chegando em torno de 18%. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e os tempos avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (p = 0,2727).



**Figura 9 -** Taxa de absorção do Bisfenol A por células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal expostas a 200 ou 250  $\mu$ M (5 culturas independentes) nos períodos de 3, 6 e 9 horas (*p* = 0,2727). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os horários e as concentrações pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

### 4.4. Avaliação da Atividade Apoptótica e Necrótica por Citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina-V e PI.

Foram contabilizados 10 mil eventos e as células apresentaram quatro populações celulares, sendo que a indicação dos quadrantes no gráfico do tipo Dotblot foram as seguintes: quadrante inferior esquerdo: células vivas; quadrante superior esquerdo: células em apoptose; quadrante inferior direito: células em necrose e quadrante superior direito: células em apoptose na fase tardia. O eixo das abcissas corresponde ao canal de fluorescência FL-1 (Anexina V) e o eixo das ordenadas ao canal de fluorescência FL-2 (PI).

Não houve aumento da população de células em processo de apoptose, necrose ou apoptose tardia para as células expostas às concentrações de 200 e 250 µM de BPA no período de 3 e 9 horas de exposição. Já para período de 6 horas de exposição, houve aumento da população de células em processo de apoptose

expostas à concentração de 250 µM, porém esse aumento não foi observado para as populações de células em processo de necrose e apoptose tardia (Figuras 10 e 11).



**Figura 10 –** Gráficos representativos adquiridos em citômetro de fluxo e analisados no programa FlowJo V.10 das populações celulares marcadas com Anexina-V (FL-1 – eixo X) e PI (FL-2 – eixo Y) de células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal (n=3 – 3 culturas independentes) tratadas com o BPA pelos períodos de 3, 6 e 9 horas de exposição



**Figura 11 –** Porcentagem da proporção de células vivas, em processo de apoptose, necrose e apoptose tardia para as células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal (n=3 – 3 culturas independentes) tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250  $\mu$ M) e nos diferentes períodos de exposição sendo A) 3 horas de exposição ao BPA, B) 6 horas de exposição ao BPA e C) 9 horas de exposição ao BPA. Dados expressos como "média ± EPM"; \**p*<0,05 e \*\**p*<0,01 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett's*).

#### 4.5. Avaliação da Concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular

A fluorescência do Fluo-4 AM (Fluo-4) foi quantificada após a adição das substâncias de interesse. Como pode ser observado pela Figura 12, nenhuma das concentrações de BPA (200 e 250 µM) promoveu o aumento do mesmo em relação ao controle.



**Figura 12 –** Porcentagem de aumento do cálcio intracelular em células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal (n=2 – 2 culturas independentes) tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250  $\mu$ M). Dados expressos como "média ± EPM"; \*\*\*\**p*<0,0001 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett's*).

#### 4.6. Avaliação da Expressão dos Marcadores Celulares (Caspase 8, 9 e 3) por Citometria de Fluxo

Foram contabilizando 10 mil eventos para a avaliação da caspases-8, caspase-9 e caspase-3.

Podemos observar na Figura 13B que houve um aumento significativo da expressão de caspase-8 ativa em células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal expostas a concentração de 250 µM de BPA pelo período de 6 horas.



**Figura 13 –** Histograma e gráfico de barras representando a média da intensidade de fluorescência da caspase-8 ativa em células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal (n=3 – 3 culturas independentes) tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250  $\mu$ M), sendo A) 3 horas de exposição, B) 6 horas de exposição e C) 9 horas de exposição. Dados expressos como "média  $\pm$  EPM"; \*\**p*<0,01 e \*\*\*\**p*<0,001 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett*'s).

A expressão da caspase-9 ativa também apresentou aumento significativo para a concentração de 250 µM de BPA pelo período de 6 horas (Figura 14E).



**Figura 14 –** Histograma e gráfico de barras representando a média da intensidade de fluorescência da caspase-9 ativa em células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal (n=3 – 3 culturas independentes) tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250  $\mu$ M), sendo D) 3 horas de exposição, E) 6 horas de exposição e F) 9 horas de exposição. Dados expressos como "média  $\pm$  EPM"; \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 e \*\*\**p*<0,001 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e comparação múltipla de Dunnett's).

Observa-se que houve um aumento significativo da expressão de caspase-3 ativa para a concentração 250 µM de BPA no período de exposição de 6 horas (Figura 15H), indicando que o período de 6 horas é um período crítico na avaliação destes marcadores de morte.



**Figura 15 –** Histograma e gráfico de barras representando a média da intensidade de fluorescência da caspase-3 ativa em células neuronais provenientes de cultura primária hipocampal (n=3 – 3 culturas independentes) tratadas com o BPA em suas diferentes concentrações (200 e 250  $\mu$ M), sendo G) 3 horas de exposição, H) 6 horas de exposição e I) 9 horas de exposição. Dados expressos como "média ± EPM"; \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett's*).

## 4.7. Análise das Proteínas Anti e Pró-apoptóticas (Bax, Bcl-2, Caspases 8, 9 e 3 por *Western Blotting*

Observamos nas Figuras 16, 17 e 18 que não houve aumento de Bax após incubação com BPA nas concentrações de 200 e 250 µM nos períodos de 3, 6 e 9 horas de exposição. Entretanto, foi observada diminuição de Bcl-2 para a concentração de 250 µM nos três períodos de exposição (3, 6 e 9 horas).

A razão entre as proteínas Bax e Bcl-2 (Figura 19) mostrou aumento da razão da proteína Bax em relação a proteína Bcl-2 para a concentração de 250 µM em todos os períodos de exposição (3, 6 e 9 horas).



**Figura 16** – *Western Blotting* das proteínas Bax (A) e Bcl-2 (B) em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250  $\mu$ M de BPA pelo período de 3 horas (n=4 – 4 culturas independentes). Dados expressos como "média ± EPM"; \**p*<0,05 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett*'s).



**Figura 17** - Western Blotting das proteínas Bax (C) Bax e Bcl-2 (D) em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250  $\mu$ M de BPA pelo período de 6 horas (n=4 – 4 culturas independentes). Dados expressos como "média ± EPM"; \**p*<0,05 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e comparação múltipla de Dunnett's).



**Figura 18** - Western Blotting das proteínas Bax (E) e Bcl-2 (F) em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250  $\mu$ M de BPA pelo período de 9 horas (n=4 – 4 culturas independentes). Dados expressos como "média ± EPM"; \**p*<0,05 e \*\**p*<0,01 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e comparação múltipla de Dunnett's).



**Figura 19** – Razão das proteínas Bax/Bcl-2 nos períodos de 3, 6 e 9 horas em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250  $\mu$ M de BPA (n=4 – 4 culturas independentes). Dados expressos como "média ± EPM"; \**p*<0,05 e \*\**p*<0,01 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett*'s).

As Figuras 20 a 22 apresentam géis representativos de *Western Blotting* das caspase -8, -9 e -3 em todos os períodos de exposição às concentrações de 200 e 250 µM de BPA.

Para o período de exposição de 3 horas é possível observar a presença tanto das pró-caspases 8 e 9, quanto de suas formas clivadas para todos os tratamentos utilizados. Houve clivagem tanto para as células que não foram expostas ao BPA (Controle e Controle + 0,1% DMSO) quanto para as células expostas ao controle positivo de morte (Glutamato 10 mM) e para as concentrações de BPA utilizadas (200 e 250 µM) (Figura 20). Porém, para o período de 3 horas não foi observada presença da caspase-3 em sua forma clivada para nenhuma das concentrações de BPA.



**Figura 20** – Géis representativos das caspase-8 e caspase-9 em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250  $\mu$ M de BPA pelo período de 3 horas (n=2 – 2 culturas independentes). 1 = Ctrl, 2 = Ctrl + 0,1% DMSO, 3 = Glutamato 10 mM, 4 = 200  $\mu$ M de BPA e 5 = 250  $\mu$ M de BPA.

Para os géis representativos das caspases 8, 9 e 3 no período de exposição de 6 horas (Figura 21), novamente foi observado a presença tanto das pró-caspases 8 e 9, quanto de suas formas clivadas tanto para as células não expostas ao BPA, quanto para as que foram expostas. É possível observar ainda no gel representativo da caspase-9 que a clivagem da mesma foi mais proeminente para as células que não foram expostas ao BPA.

Já para a caspase-3 a clivagem ocorreu somente para o controle positivo de morte (Glutamato 10 mM) e para as concentrações de BPA utilizadas (200 e 250 µM)





**Figura 21** - Géis representativos das caspases 8, 9 e 3 em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250  $\mu$ M de BPA pelo período de 6 horas (n=3 – 3 culturas independentes). 1 = Ctrl, 2 = Ctrl + 0,1% DMSO, 3 = Glutamato 10 mM, 4 = 200  $\mu$ M de BPA e 5 = 250  $\mu$ M de BPA.

Para o período de exposição de 9 horas, também foi observado nos géis representativos (Figura 22) a presença tanto das pró-caspases 8 e 9, quanto de suas formas clivadas, novamente houve clivagem tanto para as células não expostas ao BPA, quanto para as que foram expostas. A clivagem da caspase-9 no período de exposição de 9 horas se comportou de maneira semelhante à clivagem da mesma no período de 6 horas, sendo mais proeminente para as células que não foram expostas ao BPA.

A clivagem da caspase-3 ocorreu somente para o controle positivo de morte (Glutamato 10 mM) e para a concentração de 200 µM de BPA.





Caspase-3 clivada (17kDa)

 $\beta$ -actina (42kDa)

**Figura 22** – Géis representativos das caspases 8, 9 e 3 em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250  $\mu$ M de BPA pelo período de 9 horas (n=3 – 3 culturas independentes). 1 = Ctrl, 2 = Ctrl + 0,1% DMSO, 3 = Glutamato 10 mM, 4 = 200  $\mu$ M de BPA e 5 = 250  $\mu$ M de BPA.

### 4.8. Análise Proteica dos Receptores de Estrógeno ER- $\alpha$ e ER- $\beta$ por Western

#### Blotting

A Figura 23 mostra que a cultura primária hipocampal apresenta ambos os receptores de estrógeno,  $E\alpha e E\beta$ . Não foi observada alteração nos receptores ao expor as células hipocampais às diferentes concentrações de BPA (200 e 250  $\mu$ M) pelo período de 3 horas (Figura 23 A e B).

Porém, observamos que as células expostas ao BPA na concentração de 250 µM pelo período de 6 horas apresentaram um aumento estatisticamente significativo de ambos os receptores (Figura 23 C e D). Já na exposição de 9 horas verificou-se que o BPA promoveu um aumento do receptor de estrógeno E $\alpha$  na concentração de 250  $\mu$ M (Figura 23E), já para o receptor de estrógeno E $\beta$  este aumento foi observado para a concentração de 200  $\mu$ M de BPA (Figura 23F).





**Figura 23** - Análise dos receptores de estrógeno ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  em células neuronais provenientes de cultura primária de hipocampo expostas a 200 e 250 µM de BPA. A) ER- $\alpha$  – 3h, B) ER- $\beta$  – 3h, C) ER- $\alpha$  – 6 horas, D) ER- $\beta$  – 6 horas, E) ER- $\alpha$  – 9 horas e F) ER- $\beta$  – 9 horas (n=3 – 3 culturas independentes). Dados expressos como "média ± EPM"; \**p*<0,05 e \*\**p*<0,01 em relação ao Ctrl (*ANOVA* e *comparação múltipla de Dunnett's*).

5. Díscussão

#### 5. DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram que o BPA causa efeitos adversos à saúde em mamíferos, não-mamíferos e até em sistemas *in vitro*. Devido a sua alta prevalência no meio-ambiente, as concentrações de BPA mensuradas em diversas matrizes biológicas vem aumentando (CALAFAT et al., 2008; ROCHESTER, 2013). Um estudo realizado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em conjunto com o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) detectou concentrações de BPA em 92,6% das amostras de urina de mais de 2.500 participantes. Este mesmo estudo também encontrou BPA no soro de mulheres grávidas, leite materno, fluido amniótico e folicular, sangue do cordão umbilical, placenta e no fígado de fetos humanos (SCHÖNFELDER et al., 2002; IKEZUKI et al., 2002; KURUTO-NIWA et al., 2007; CALAFAT et al., 2008; NAHAR et al., 2013). Em função destes achados, a exposição diária ao BPA vem gerando cada vez mais preocupações em relação a variedade de doenças que esta substância pode causar.

Estudos indicam que a exposição ao BPA pode reduzir o sucesso de fertilização e a qualidade embrionária, além de falhas de implantação, redução da função sexual masculina, redução na qualidade do esperma, alterações nas concentrações de hormônios sexuais, alterações nas concentrações de hormônios da tireoide, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, alteração da função hepática, obesidade, albuminúria, estresse oxidativo, inflamação e alterações na expressão de marcadores epigenéticos. A exposição ao BPA durante a gestação pode resultar em aumento de aborto espontâneo, tempo de gestação anormal, baixo peso ao nascer, aumento de anormalidades na genitália masculina e obesidade infantil. Além disso, existem estudos que mostram que a exposição ao BPA durante o período pré-natal pode levar a alterações no comportamento e no neurodesenvolvimento dos fetos (ROCHESTER, 2013).

O BPA pode se acumular em diversos tecidos ao longo da vida, incluindo o encéfalo. Estudos experimentais e clínicos sugerem que o BPA pode ser neurotóxico, além de promover alterações cognitivas e comportamentais em animais e humanos (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; MASUO; ISHIDO, 2011; JUREWICZ; POLAŃSKA; HANKE, 2013; FENICHEL; CHEVALIER; BRUCKER-DAVIS, 2013).

A avaliação dos efeitos do BPA *in vitro* têm trazido informações importantes a respeito de sua ação. Hwang et al. (2013) observaram redução de 20% na atividade mitocondrial de células Raw264.7, uma linhagem de osteoclastos, essa redução foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24h de exposição ao BPA (12,5  $\mu$ M). A diminuição da atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio de MTT também foi observada em estudos com células HL-60 e INS-1 expostas a diferentes concentrações de BPA (125 a 500  $\mu$ M) e (0,0020 a 2  $\mu$ M) respectivamente (TERASAKA et al., 2005; LIN et al., 2013).

Em estudos com células neuronais, o BPA também se mostrou capaz de promover diminuição da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT. Em células de linhagem C17.2 (células progenitoras de neurônios) e cultura de oligodendrócitos expostos por 24h a diferentes concentrações de BPA (200 a 500 µM) houve uma diminuição considerável da atividade mitocondrial (40 a 80%) (KIM et al., 2007; TIWARI et al., 2014). Lee et al. (2008) também observaram diminuição de aproximadamente 80% da atividade mitocondrial após 24h de exposição para a concentração de 500 µM em células HT-22, uma linhagem de células hipocampais de camundongo.

Nossos resultados para o ensaio de MTT mostraram redução de atividade mitocondrial (aproximadamente 90% de redução) pelo BPA nas concentrações de 200 e 250 µM a partir de 12 horas de exposição. Entretanto, a concentração de 250 µM já apresentou este efeito a partir de 6 horas de exposição onde observamos uma redução de aproximadamente 40% da atividade mitocondrial.

Uma vez evidenciada a capacidade do BPA em diminuir a atividade mitocondrial levando a uma possível morte celular, nosso interesse foi caracterizar quais os mecanismos que levam a este processo. Mcconkey (1998) destacou algumas diferenças morfológicas que diferenciam os processos de necrose e apoptose. Um ponto de destaque é a integridade da membrana plasmática, a qual permanece íntegra na apoptose, mas não na necrose. Com o rompimento da membrana celular, diversos componentes citoplasmáticos são liberados para o meio, como a enzima LDH, no qual seu aumento pode ser um indicativo de necrose.

Uma vez que não observamos liberação de LDH para o meio de cultura para as concentrações de BPA avaliadas em nenhum dos períodos de incubação, nossos
resultados sugerem que não há rompimento da membrana celular, característica da morte por necrose. Assim, em função da diminuição da atividade mitocondrial observada, sem liberação de LDH, nossa hipótese foi que o BPA estaria causando neurotoxicidade por meio de apoptose. Para alcançarmos o objetivo de avaliar os mecanismos envolvidos nesse processo, optou-se por investigar os efeitos do BPA antes de 12 horas de exposição, sendo escolhidos os tempos de incubação de 3, 6 e 9 horas. Com a mudança nos horários de exposição esperava-se visualizar os eventos da cascata de apoptose em ordem cronológica.

Um importante passo foi determinar quanto de BPA é absorvido pelas células provenientes da cultura primária hipocampal e em qual dos horários estudados haveria maior absorção tanto para as concentrações de 200 µM quanto para a de 250 µM.

Sabe-se que o BPA é uma molécula lipofílica, rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e metabolizado no fígado e intestino, sendo excretada pela urina em sua grande maioria na forma de metabolitos inativos (MIKOŁAJEWSKA; STRAGIEROWICZ; GROMADZIŃSKA, 2015). Porém, os dados sobre a absorção do BPA, especialmente em células neuronais, são escassos.

Estudos realizados por Sun & Nakashima (2002) em amostras de microdiálise encefálica de ratos *Wistar*, analisadas por HPLC acoplado a uma coluna de fluorescência, apresentaram 0,3 ppb de BPA, comprovando que a molécula pode ultrapassar a BHE. Outro estudo realizado com encéfalos provenientes de autópsia de 11 pacientes do *Hospital of Antwerp*, na Bélgica, mostrou que cerca de 0.91 ng/g de BPA foi encontrado nas amostras analisadas. Nesse estudo, a quantificação do BPA foi realizada utilizando um cromatógrafo em fase gasosa combinado com um sistema de captura de elétrons negativos acoplado a um espectrômetro de massas (GEENS; NEELS; COVACI, 2012).

Nossos resultados mostraram que o BPA é capaz de penetrar nas células hipocampais, sendo sua porcentagem de absorção na concentração de 250 µM de aproximadamente 20% no período de 6 horas de exposição. Já para a concentração de 200 µM a maior taxa de absorção foi de aproximadamente 18% no período de 9 horas de exposição.

Comprovando que o BPA possui a capacidade de permear a membrana celular o próximo passo foi confirmar se o BPA provocava apoptose e não necrose, conforme nossa hipótese inicial. Sendo assim, as células foram submetidas ao ensaio de Anexina V e lodeto de Propídio (PI) por citometria de fluxo.

Nas fases iniciais da apoptose, ocorrem alterações na superfície da célula, uma dessas alterações que ocorre na membrana plasmática é a translocação de fosfatidilserina a partir do interior da membrana plasmática para a camada exterior, pela qual a fosfatidilserina fica exposta na superfície externa da célula (VERMES et al., 1995).

A Anexina V é uma proteína ligada a fosfolipídios dependente de Ca<sup>2+</sup> com elevada afinidade pela fosfatidilserina. Assim, esta proteína pode ser utilizada como uma sonda sensível para a exposição de fosfatidilserina sobre a membrana celular. Sua translocação para a superfície externa da célula não é única para a apoptose, mas também ocorre durante a necrose das células. A diferença entre estas duas formas de morte celular é que durante as fases iniciais de apoptose, a membrana celular permanece intacta, enquanto que ao momento em que ocorre a necrose, a membrana da célula perde a sua integridade e se torna permeável. Portanto, a medição da ligação de Anexina V na superfície celular, como indicativo de apoptose, tem de ser realizado em conjunto com um teste de exclusão utilizando um corante para estabelecer a integridade da membrana celular. Neste caso, foi utilizado o lodeto de Propídio (PI) que se liga ao DNA celular quando a membrana celular está comprometida (VERMES et al., 1995).

Os nossos resultados para Anexina-V/PI mostraram que para o período de exposição de 3 e 9 horas, não houve aumento da população de células em processo de apoptose, necrose ou apoptose tardia para as exposições nas concentrações de 200 e 250 µM de BPA. Já para a concentração de 250 µM de BPA exposta pelo período de 6 horas, houve aumento da população de células em processo de apoptose, corroborando os resultados já obtidos de MTT. Os dados da citometria de fluxo também estão de acordo com o ensaio do LDH, reforçando que o BPA não causa necrose nas concentrações e tempos estudados em cultura primária de hipocampo.

O processo de morte por apoptose possui, sabidamente, diversos fatores que podem inicia-lo, tais como: depleção de ATP, aumento na concentração de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular, aumento de EROS, entre outros (MACCONKEY, 1998). Sendo

assim, avaliamos a concentração de cálcio intracelular para verificar se este seria um possível mecanismo de início para o processo de morte celular por apoptose nas células hipocampais expostas ao BPA.

Verificamos que não houve aumento da concentração de cálcio intracelular para as células hipocampais expostas ao BPA, em ambas concentrações, sugerindo que o fator de início para o processo apoptótico possa ser outro, como danos no DNA, aumento de EROS e ativação da via das MAPK pela ativação das proteínas ERK e JNK (LEE et al., 2008).

Outra questão importante nos estudos relacionados a morte celular por apoptose é a investigação de qual via está associada ao processo, seja ela intrínseca, extrínseca ou ambas. Para isso, algumas das proteínas envolvidas nessas vias foram avaliadas, como: as caspases 8, 9 e 3 pelas técnicas de citometria de fluxo e *Western Blotting* e as proteínas Bax e Bcl-2 por *Western Blotting*.

Nossos resultados mostram que na avaliação das proteínas anti e próapoptóticas da via intrínseca Bax e Bcl-2, por meio do ensaio de *Western Blotting*, não houve aumento de Bax para as concentrações de 200 e 250 µM nos períodos de exposição de 3, 6 e 9 horas. No entanto, foi observada diminuição de Bcl-2 para a concentração de 250 µM nos três períodos de exposição. A razão entre as proteínas Bax e Bcl-2 permite melhor entendimento da sinalização celular, assim, observamos um aumento desta razão para a concentração de 250 µM de BPA em todos os períodos de exposição (3, 6 e 9 horas) quando comparado ao controle, indicando que o processo pró-apoptótico possa estar favorecido nestas condições.

Este favorecimento do processo pró-apoptótico foi observado em outros estudos que avaliaram as proteínas anti e pró-apoptóticas Bax e Bcl-2 em diferentes matrizes expostas ao BPA. Hwang et al. (2013) observaram aumento de Bax em relação a Bcl-2 em células Raw264.7 expostas ao BPA. Mais ainda, LIN et al. (2013) e WANG et al. (2010) também relataram aumento de Bax em relação a Bcl-2 em células INS-1 e em homogenato de testículos de camundongos tratados com BPA, respectivamente.

WANG et al. (2010) observaram ainda um aumento de citocromo c citosólico e caspase- 9 ativa, além do aumento das proteínas Fas e FasL e da caspase-8 e -3 indicando que o BPA promove indução da apoptose por ambas as vias. Sendo assim,

a avaliação das caspases 8, 9 e 3 foram de extrema importância para a melhor caracterização da via de apoptose nas células hipocampais expostas ao BPA.

Na investigação das caspases por *Western Blotting*, observamos que, apesar da constatação das clivagens da caspase-8 e caspase-9, estas se apresentaram de forma semelhante entre os tratamentos, sendo que em alguns casos é possível observar que as bandas referentes ao controle apresentaram maior intensidade do que as bandas referentes as células expostas ao BPA. Sendo assim, os resultados de *Western Blotting* não se mostraram conclusivos a respeito da ativação das vias extrínseca (caspase-8) e intrínseca (caspase-9). Em contrapartida, na avaliação da caspase-3, protease esta responsável pelo que chamamos de "ponto de não retorno" da apoptose, as concentrações de 200 e 250 µM de BPA promoveram a ativação da mesma no período de 6 horas de exposição, reforçando a hipótese de que o BPA pode induzir a morte de células neuronais por apoptose.

Ainda que a ativação da caspase-3 em células hipocampais provenientes da cultura primária expostas ao BPA tenha sido constatada por *Western Blotting*, ainda não estava claro por qual via o processo de apoptose estava ocorrendo. Sendo assim, avaliamos as mesmas caspases (8, 9 e 3) por citometria de fluxo.

Nossos resultados mostram que a concentração de 250 µM de BPA promoveu um aumento da caspase-8 e caspase-9 ativas no período de 6 horas de exposição. Além disso, foi observado aumento da caspase-3 ativa em células expostas à concentração de 250 µM pelo período de 6 horas de exposição, corroborando os dados obtidos de ativação da caspase-3 por *Western Blotting*.

Os resultados obtidos pelos ensaios de citometria de fluxo não só apoiaram a hipótese de que o BPA leva à morte celular por apoptose, ativando a caspase-3, mas também trouxe novos dados indicando que o BPA possivelmente induz o processo apoptótico tanto pela via intrínseca quanto a extrínseca.

Quando falamos em neurotoxicidade causada pelo BPA, sabe-se que são poucos os estudos que avaliaram tal fenômeno, a literatura é ainda mais escassa quando buscamos os mecanismos pelo qual tal agente pode levar a morte de células neuronais.

Estudos anteriores com diferentes tipos de células neuronais como células de linhagem HT-22, PC12, C17.2 e até algumas células provenientes de culturas primárias de oligodendrócitos, córtex e mesencéfalo, mostraram de maneira geral o

potencial neurotóxico do BPA. Alguns desses estudos mostraram esse potencial neurotóxico a partir de ensaios de avaliação da atividade mitocondrial, liberação da enzima LDH, diminuição de tamanho e proliferação celular das células expostas ao BPA. Outros estudos avaliaram a porcentagem de células em apoptose a partir da externalização da fosfatidilserina, aumento de EROS, avaliação da via MAPK e até avaliação de algumas caspases como a caspase-9 e 3. Porém estes estudos observaram tais efeitos em concentrações entre 300 a 500 µM de BPA, com exposições de 24h até 5 dias (KIM et al., 2007; LEE et al., 2007; LEE et al., 2008; LIU et al., 2013; TIWARI et al., 2014). O hipocampo é uma importante estrutura na avaliação de processos neurotóxicos, visto que está estrutura é responsável pela aprendizagem, memória, entre outros processos cognitivos. Sendo assim, modelos de estudos in vitro utilizando culturas primárias, onde as células são obtidas de organismos vivos, tal como o modelo utilizado em nosso trabalho, são fisiologicamente mais próximas a modelos *in vivo* (SILVA et al., 2006; KIM et al., 2011). Portanto, em contrapartida aos resultados já encontrados na literatura, nosso trabalho apresentou os efeitos neurotóxicos causados pelo BPA em uma concentração menor (250 µM), sendo que tais efeitos foram observados em maior evidência no período de 6 horas de exposição, período este também menor as exposições relatadas nos estudos acima citados.

A cultura primária de hipocampo é composta por células piramidais, principais neurônios excitatórios do hipocampo, cujos corpos celulares encontram-se no estrato piramidal. Também apresenta receptores *N-metil-D-aspartato* (NMDA), que são receptores ionotrópicos ativados pelo glutamato, cuja ativação está envolvida com mecanismos de aquisição de memória e aprendizado o que a caracteriza como um bom modelo para estudos de neurotoxicidade (ARACAVA et al., 1987; ARACAVA et al., 2005; LENDVAI; VIZI, 2008). Porém, não há referências a respeito da presença ou não de receptores de estrógeno ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , alvo do BPA. Observamos que esta cultura apresenta ambos os receptores de estrógeno E $\alpha$  e E $\beta$ . Interessante notar que a exposição do BPA causou alteração na concentração desses receptores. Houve aumento do ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  para as duas concentrações estudadas no período de 6 horas de exposição e para o período de exposição de 9 horas houve um amento do ER- $\alpha$  somente para a concentração de 250 µM e do ER- $\beta$  somente concentração de 200 µM.

56

Apesar de apresentar afinidade mais baixa que o estrógeno, o BPA pode se ligar a ambos os receptores de estrógeno (KIM et al., 2007). Porém as informações de como o BPA pode interferir na sinalização do estrógeno por meio dos receptores no sistema nervoso central ainda são muito conflitantes. LEE et al. (2007) em experimentos realizados com células PC12 sugeriram que o BPA em baixas concentrações (abaixo de 50 µM) pode promover um possível efeito neuroprotetor mediado pelos receptores de estrógeno, visto que ao utilizarem um antagonista dos ERs essa proteção foi parcialmente inibida. Porém, o mesmo grupo de pesquisadores acredita que a resposta neurotóxica observada com concentrações mais altas de BPA (300 e 500 µM), aparentemente, não está associada aos receptores de estrógeno. A partir destes dados, podemos sugerir que uma possível hipótese que explique este aumento de ambos os receptores nas células hipocampais seja a de que após a exposição ao BPA as células podem ter criado mecanismos adaptativos para reverter ou interromper o processo de morte celular.

6. Conclusão

# 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o BPA pode levar a morte das células neuronais hipocampais por apoptose, ativando ambas as vias intrínseca e extrínseca, sendo este processo mais evidente para a concentração de 250 µM no período de 6 horas de exposição.

Verificamos ainda que as células da cultura primária hipocampal absorvem cerca de 20% de BPA e também apresentam ambos os receptores de estrógeno ERα e ER-β. Ambos os receptores de estrógeno foram aumentados após expor as células hipocampais ao BPA, este aumento pode representar uma tentativa de interrupção ou reversão do processo de morte celular.

7.Referências Bíbliográficas

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; SAITO, H. Both oxidative stress-dependent and independent effects of amyloid ?? protein are detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. **Brain Research**, v. 830, n. 1, p. 146–154, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Bisfenol A. 2013. Disponível em <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 25/09/2013.

ACCONCIA, F.; PALLOTTINI, V.; MARINO, M. Molecular mechanisms of action of BPA. **Dose Response**, p. 1–9, 2015.

ACEVEDO, N. et al. Perinatally administered Bisphenol A as a potential mammary gland carcinogen in rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 9, p. 1040–1046, 2013.

ALBALAT, R. et al. Evolution of retinoid and steroid signaling: Vertebrate diversification from an amphioxus perspective. **Genome Biology and Evol tion**, v. 3, p. 985–1005, 2011.

ALONSO-MAGDALENA, P. et al. The estrogenic effect of Bisphenol A disrupts pancreatic  $\beta$ -cell function in vivo and induces insulin resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 1, p. 106–112, 2006.

ALONSO-MAGDALENA, P. et al. Bisphenol-A: A new diabetogenic factor? **Hormones**, v. 9, n. 2, p. 118–126, 2010.

ARACAVA, Y. et al. Nicotinic acetylcholine receptors in cultured neurons from the hippocampus and brain kern of the rat characterized bY single channel recording. **Banker**, v. 222, n. 1, p. 63–70, 1987.

ARACAVA, Y. et al. Memantine blocks α7\* nicotinic acetylcholine receptors More Potently Than N -Methyl- D -aspartate Receptors in Rat Hippocampal Neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 1195–1205, 2005.

Atkinson A, Roy D. In vivo DNA adduct formation by Bisphenol A. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 60-66, 1995.

BANKER, G. A.; COWAN, W. M. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. **Brain Research**, v. 126, n. 3, p. 397–425, 1977.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W. AND PARADISO, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2a. ed., Porto Alegre: **Artmed**, p. 547- 579, 2002.

BEN-JONATHAN, N.; STEINMETZ, R. Xenoestrogens: the emerging story of Bisphenol A. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 9, n. 3, p. 124–128, 1998.

BOATRIGHT, K. M. et al. A unified model for apical caspase activation. **Molecular Cell**, v. 11, n. 2, p. 529–541, 2003.

BONDESSON, M. et al. Estrogen receptor signaling during vertebrate development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 2, p. 142–151, 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, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

CAIN, K.; BRATTON, S. B.; COHEN, G. M. The Apaf-1 apoptosome: A large caspaseactivating complex. **Biochimie**, v. 84, n. 2-3, p. 203–214, 2002.

CALAFAT, A. M. et al. Exposure of the U.S. population to Bisphenol A and 4-tertiaryoctylphenol: 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 1, p. 39–44, 2008.

CAO, X.; CORRIVEAU, J.; POPOVIC, S. Levels of Bisphenol A in canned soft drink products in canadian markets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1307–1311, 2009.

COLIN, A.; BACH, C.; ROSIN, C. Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and Bisphenol contaminants in France? **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, n. 1, p. 86–99, 2014.

CORRALES, J. et al. Global assessment of Bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. **Dose Response**, v. 13, p. 1–29, 2015.

DEKANT, W.; VÖLKEL, W. Human exposure to Bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, n. 1, p. 114–134, 2008.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, 2009.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. **The EFSA Journal** 2010; 8 (9): 1829.

EHLERT, K. A.; BEUMER, C. W. E.; GROOT, M. C. E. Food additives & contaminants : Part A migration of Bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 7, p. 904–910, 2008.

EICK, G. N.; THORNTON, J. W. Molecular and cellular endocrinology evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 334, n. 1-2, p. 31–38, 2011.

FAN, Y. et al. Does preconception paternal exposure to a physiologically relevant level of bisphenol A alter spatial memory in an adult rat? **Hormones and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 598–604, 2013.

FARABOLLINI, F. et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 3, p. 409–414, 2002.

FENICHEL, P.; CHEVALIER, N.; BRUCKER-DAVIS, F. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. **Annales d'Endocrinologie**, v. 74, n. 3, p. 211–220, 2013.

FISCHER, U.; JÄNICKE, R. U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell death and differentiation**, v. 10, n. 1, p. 76–100, 2003.

FLINT, S. et al. Bisphenol A exposure , effects , and policy: A wildlife perspective. **Journal of Environmental Management**, v. 104, p. 19–34, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GARCIA, R. C. T. et al. Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicological Sciences**, v. 128, n. 1, p. 223–234, 2012.

GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, Ä.; DONCARLOS, L. L. Neuroprotection by estradiol. **Progress in Neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 29–60, 2001.

GEENS, T.; NEELS, H.; COVACI, A. Distribution of Bisphenol-A, triclosan and nnonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. **Chemosphere**, v. 87, n. 7, p. 796–802, 2012.

GOGOS, A. et al. A Role for estrogen in schizophrenia: Clinical and preclinical findings. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 16, 2015.

GROFF, T. Bisphenol A: invisible pollution. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 4, p. 524–529, 2010.

HENGARTNER, M. O.The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 685-687, 2000.

HIROI, H. et al. Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and (ER $\beta$ ). **Endocrine Journal**, v. 46, n. 6, p. 773–778, 1999.

HOEKSTRA, E. J.; SIMONEAU, C. Release of Bisphenol A from Polycarbonate — A Review Release of Bisphenol A from Polycarbonate — A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 386–402, 2011.

HUETTNER, J. E.; BAUGHMAN, R. W. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 6, p. 3044–3060, 1986.

HUFF, J. Carcinogenicity of Bisphenol-A in fischer rats and B6C3F1 mice. **Odontology / the Society of the Nippon Dental University**, v. 89, n. 1, p. 12–20, 2001.

HWANG, J. K. et al. Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. **Life Sciences**, v. 93, n. 9-11, p. 367–372, 2013.

IKEZUKI, Y. et al. Determination of Bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 11, p. 2839–2841, 2002.

IOUDINA, M.; UEMURA, E.; GREENLEE, H. W. Glucose insufficiency alters neuronal viability and increases susceptibility to glutamate toxicity. **Brain Research**, v. 1004, n. 1-2, p. 188–192, 2004.

ISHIDO, M. et al. Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 1, p. 69–76, 2004.

JAEG, J. P. et al. Characterization of new Bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4935–42, 2004.

JAHR, C. E.; STEVENS, C. F. Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. **Nature**, v. 325, n 6104, p 522-525, 1989.

JUREWICZ, J.; POLAŃSKA, K.; HANKE, W. Exposure to widespread environmental toxicants and children's cognitive development and behavioral problems. **International journal of occupational medicine and environmental health**, v. 26, n. 2, p. 185–204, 2013.

KAWAI, K. et al. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: The effects of fetal exposure to bisphenol A. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 2, p. 175–178, 2003.

KERI, R. A. et al. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 240–252, 2007.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KIM, C. et al. Distribution of Bisphenol A in the neuroendocrine organs of female rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 20, p. 41–50, 2004.

KIM, K. et al. Suppressive effects of Bisphenol A on the proliferation of neural progenitor cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 70, n. 15-16, p. 1288–1295, 2007.

KIM, M. E. et al. Exposure to bisphenol A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3383–3389, 2011.

KURUTO-NIWA, R. et al. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1160–1164, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 1, p. 44–54, 2010.

LEE, S. et al. Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB. **Journal of neuroscience research**, v. 86, n. 13, p. 2932–2942, 2008.

LEE, Y. M. et al. Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen. **Journal of veterinary science**, v. 8, p. 27–38, 2007.

LENDVAI, B.; VIZI, E. S. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 333–349, 2008.

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 & disease**, v. 4, p. e460, 2013.

LIU, R. et al. Bisphenol A inhibits proliferation and induces apoptosis in micromass cultures of rat embryonic midbrain cells through the JNK, CREB and p53 signaling pathways. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 52, p. 76–82, 2013.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581–93, 1997.

LOGANATHAN, S. N.; KANNAN, K. Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 61, n. 1, p. 68–73, 2011.

LOPES, A.A. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante das cápsulas do estrato seco padronizado e da afrormosina, isoflavanóide, obtidos de Amburana cearensis A C SMITH. 2010. 136 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LUO, G. et al. Pubertal exposure to Bisphenol A increases anxiety-like behavior and decreases acetylcholinesterase activity of hippocampus in adult male mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 177–180, 2013.

MARKEY, C. M. et al. Mammalian development in a changing environment: Exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. **Evolution and Development**, v. 5, n. 1, p. 67–75, 2003.

MASUO, Y.; ISHIDO, M. Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible involvement in brain development and neurodegeneration. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 14, n. 5-7, p. 346–69, 2011.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 991–1045, 1994.

MCCONKEY, D. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology letters**, v. 99, p. 157–168, 1998.

MELZER, D. et al. Urinary bisphenol a concentration and angiography-defined coronary artery stenosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012a.

MELZER, D. et al. Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. **Circulation**, v. 125, n. 12, p. 1482–1490, 2012b.

MERCEA, P. Physicochemical processes involved in migration of Bisphenol A from polycarbonate. **Jornal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 2, p. 579–593, 2009.

MICHAŁOWICZ, J. Bisphenol A - sources, toxicity and biotransformation. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 738–58, 2014.

MIKOŁAJEWSKA, K.; STRAGIEROWICZ, J.; GROMADZIŃSKA, J. Bisphenol A -Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 28, n. 2, p. 209–241, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal ofImmunologicalMethods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NAHAR, M. S. et al. Fetal Liver Bisphenol A concentrations and biotransformation gene expression reveal variable exposure and altered capacity for metabolism in humans. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 116–123, 2013.

NAIK, P.; VIJAYALAXMI, K. K. Cytogenetic evaluation for genotoxicity of Bisphenol-A in bone marrowcells of Swiss albino mice. **Mutation Research**, v. 676, p. 106–112, 2009.

OBERST, A. et al. Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16632–16642, 2010.

OSTERLUND MK; HURD YL. Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders. **Prog Neurobiol.**, v. 64, p. 251–267, 2001.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 1, p. 26–35, 2003.

POZZO-MILLER, L. D.; INOUE, T.; MURPHY, D. D. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca<sup>2+</sup> transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. **Journal of Neurophysiology**, v. 81, n. 3, p. 1404–1411, 1999.

REZG, R. et al. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environment international**, v. 64, p. 83–90, 2014.

RICHTER, C. A. et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 199–224, 2007.

ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: a review of the literature. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 42, p. 132–155, 2013.

RUBIN, B. S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 127, n. 1-2, p. 27–34, out. 2011.

RUDEL, R. A. et al. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. **Journal of the Air & Waste Management Association ISSN:**, v. 51, p. 499–513, 2011.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, 2004.

SAFA, A. R. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 176–184, 2012.

SALVESEN, G.S.; RIEDL, S.J. Caspase mechanisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 615, p. 13–23, 2008.

SCHÖNFELDER, G. et al. Parent Bisphenol A accumulation in the human maternalfetal-placental unit. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 11, p. 703–707, 2002.

SHI, Y.; ZHENG, W.; ROCK, K. L. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14590–14595, 2000.

SHORE, G. C.; NGUYEN, M. Bcl-2 Proteins and apoptosis: Choose your partner. **Cell**, v. 135, n. 6, p. 1004–1006, 2008.

SILVA, R. F. M. et al. Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 163, n. 1, p. 1–9, 2006.

SOTO, A. M. et al. Does cancer start in the womb? Altered mammary gland development and predisposition to breast cancer due to in utero exposure to endocrine disruptors. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 18, n. 2, p. 199–208, 2013.

SPENCER, S. L.; SORGER, P. K. Measuring and modeling apoptosis in single cells. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 926–939, 2011.

STRASSER, A.; CONNOR, L. O.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annual Review** of **Biochemistry**, v. 69, p. 217–245, 2000.

SUN, Y.; NAKASHIMA, M. Determination of Bisphenol A in rat brain by microdialysis and column switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, v. 16, n. 5, p. 319–326, 2002.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis : controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 231–241, 2008.

TERASAKA, H. et al. Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of Bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells. **Anticancer research**, v. 25, n. 3B, p. 2241–2248, 2005.

THOMAS, G.M. AND HUGANIR, R.L. MAPK cascade signaling and synaptic plasticity. **Nature Neuroscience Review**, v.5, p.173-183, 2004.

TIMMER, J. C.; SALVESEN, G. S. Caspase substrates. **Cell death and differentiation**, v. 14, p. 66–72, 2007.

TIWARI, S. K. et al. Bisphenol-A impairs myelination potential during development in the hippocampus of the rat brain. **Molecular neurobiology**, v. 51, n. 3, p. 1395–1416, 2014.

VANDEN BERGHE, T. et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 6, p. 922–930, 2010.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled

Annexin V. Journal of Immunological Methods, v. 184, n. 95, p. 39–51, 1995.

VÖLKEL, W. et al. Metabolism and kinetics of Bisphenol A in humans at low doses following oral administration. **Chemical research in toxicology**, v. 15, n. 10, p. 1281–7, out. 2002.

WALTON, M. R.; DRAGUNOW, M. Is CREB a key to neuronal survival? **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 2, p. 48–53, 2000.

WANG, Q. et al. Mitochondrial signaling pathway is also involved in Bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. **Toxicology Letters**, v. 199, n. 2, p. 129–135, 2010.

WELSHONS, W. V; NAGEL, S. C.; VOM SAAL, F. S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of Bisphenol A at levels of human exposure. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 56–69, 2006.

WETHERILL, Y. B. et al. In vitro molecular mechanisms of Bisphenol A action. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 178–198, 2007.

WILSON, M. E.; WESTBERRY, J. M. Regulation of oestrogen receptor gene expression: New insights and novel mechanisms neuroendocrinology. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 238–242, 2009.

WILSON, N. K. et al. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol , bisphenol-A , and nonylphenol at home. **Environmental Research**, v. 103, n. 1, p. 9–20, 2007.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980. Cell death: The significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v. 68, p. 251–306, 1980.

YOON, K. et al. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. **Journal of toxicology and environmental health. Part B**, v. 17, n. 3, p. 127–74, jan. 2014.

YOSHIHARA, S. et al. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 50–9, mar. 2004.

ZALKO, D. et al. Biotransformations of Bisphenol A in a mammalian model: Answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 3, p. 309–319, 31 out. 2003.





## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 81.2014-P473

# CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, que o Projeto Pesquisa "Avaliação da CERTIFICA de neurotoxicidade do bisfenol-A em cultura primária de hipocampo" (Protocolo CEUA/FCF/473), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) Mariana Aguilera Alencar da Silva, sob orientação do(a) Profa. Dra. Tania Marcourakis, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 04 de julho de 2014. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo relatório final.

São Paulo, 13 de agosto de 2014.

M Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br





aculdade de Medicina Veterinária e Zootecni

Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliaç o da neurotoxicidade do Bisfenol-A em cultura prim ria de hipocampo.", protocolado sob o CEUA nº 3999110614, sob a responsabilidade de **Tania Marcourakis** *e equipe; Mariana Aguilera Alencar da Silva; Prof*<sup>a</sup>. *Dr*<sup>a</sup>. *Helenice de Souza Spinosa* - que envolve a produç o, manutenç o e/ou utilizaç o de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - est de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentaç o Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comiss o de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterin ria e Zootecnia da Universidade de S o Paulo (CEUA/FMVZ) na reuni o de 15/10/2014.

We certify that the proposal "Evaluation of bisphenol-A neurotoxicity in primary hippocampus culture.", utilizing 81 Heterogenics rats (15 males and 66 females), protocol number CEUA 3999110614, under the responsibility of **Tania Marcourakis** and team; Mariana Aguilera Alencar da Silva; Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenice de Souza Spinosa - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of S o Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/15/2014.

#### Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vig ncia da Proposta: de 11/2014 a 12/2015 Área: An lises Clínicas E Toxicológicas

| Proced ncia: | Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ I | USP  |        |        |   |      |    |
|--------------|---|------|--------|--------|---|------|----|
| Espécie:     | Ratos heterog nicos se                          | 2XO: | F meas | idade: | а | N:   | 66 |
| Linhagem:    | Rattus rattus (Wistar)                          |      |        | Peso:  | а | <br> |    |
| Proced ncia: | Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ I | USP  |        |        |   |      |    |
| Espécie:     | Ratos heterog nicos se                          | 2X0: | Machos | idade: | а | N:   | 15 |
| Linhagem:    | Rattus rattus (Wistar)                          |      |        | Peso:  | а |      |    |

Resumo: O Bisfenol A (BPA) é um mon mero usado na fabricaç o de pl sticos de policarbonato e resinas epóxi, os quais s o utilizados em muitos produtos de consumo (LOGANATHAN, 2011). Uma das principais fontes de exposiç o ao BPA é por meio dos alimentos e bebidas embalados e enlatados, visto que pequenas quantidades do BPA podem potencialmente migrar para os alimentos e consequentemente serem ingeridas. Porém, devido ao aumento da utilizaç o de produtos base de BPA, a possibilidade de contaminaç o vem crescendo cada vez mais, e outras fontes de exposiç o como gua, ar e o solo também vem chamando a atenç o de pesquisadores (LEE et al; 2008; EFSA, 2010). A toxicologia do BPA vem sendo extensivmente investigada por grupos industriais, governamentais e acad micos. Estudos de toxicidade reprodutiva e outros ensaios biológicos s o realizados em animais de pequeno e grande porte (EFSA, 2010). Dados toxicocinéticos indicam que o BPA é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal e que o BPA-glucuronídeo é a maior via de biotransformaç o do composto em humanos e roedores. Diferenças significativas na disposiç o do BPA-glucuronídeo t m sido reportadas em humanos e roedores, sendo que tais diferenças devem-se s vias de eliminaç o a partir do figado. Em humanos, 80% do que é ingerido é excretado na urina em aproximadamente 5 horas, sendo que em roedores ocorre circulac o entero-hep tica, o que leva a uma eliminac o mais lenta do BPA no organismo (EFSA, 2010). A molécula do BPA possui características estruturais semelhantes aos compostos estrog nicos naturais fazendo com que se liguem a receptores de estrógeno presentes em nosso organismo, conferindo-lhe assim a característica de disruptor endócrino (TEEGUARDEN e DRURY, 2013). A exposiç o pré-natal ao BPA pode levar ao desenvolvimento de problemas no sistema reprodutor, aumenta o risco do surgimento de c ncer de mama e de próstata, diabetes, problemas cardiacos, no desenvolvimento do sistema nervoso central, entre outros (HIROI et al, 1999; NEGISHI et al, 2003; EFSA, 2010). O BPA tem sido relatado n o só pela alteraç o na atividade estrog nica, mas também por induzir a apoptose. Alguns estudos indicam que o BPA induz a apoptose em diversos tipos de células como, por exemplo, células ósseas, cancerígenas, germinativas, bem como células neuronais do mesencéfalo e do hipocampo. O BPA possui efeitos nocivos potentes sobre as células neuronais que levam a induc o de apoptose, tais como, alteraç o das proteínas guinases ativadas por mitógenos (MAPK), geraç o de espécies reativas de oxig nio (EROS) e ativaç o da caspase 3 (NEGISHI et al, 2003; LEE et al, 2008). Porém, estudos ainda s o necess rios para compreender melhor os efeitos toxicológicos causados por este composto.

Local do experimento:

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universit ria: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 S o Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676/0904 / fax: 55 (11) 3032-2224 Hor rio de atendimento: 24 a 64 das 8h as 17h : e-mail: ceuavet@usp.br CFLIA N 3090110614







Comissão de Ética no Uso de Animais

S o Paulo, 31 de julho de 2016

anne

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni Presidente da Comiss o de Ética no Uso de Animais de S o Paulo

Roseli da Costa Gomes Secretaria Executiva da Comiss o de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterin ria e Zootecnia da Universidade Faculdade de Medicina Veterin ria e Zootecnia da Universidade de S o Paulo





### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Secretaria de Pós-Graduação

#### Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

 Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

 Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: <u>pgfarma@usp.br</u>, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitària - CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 - e-mail: pgfarma@usp.br

Anexo 4

#### 04/08/2016

#### Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



| a141 - 8854202/1 - Mariana Aquilera Alencar da Silva   |   |  |  |  |  |
|--|---|--|--|--|--|
| Email:<br>Data de Nascimento:<br>Cédula de Identidade:<br>Local de Nascimento:<br>Nacionalidade:<br>Graduação: | mariana_aguilera@usp.br<br>27/10/1988<br>RG - 32.512.773-6 - SP<br>Estado de São Paulo<br>Brasileira<br>Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo -<br>Brasil - 2010 |  |  |  |  |
| Curso:<br>Programa:<br>Data de Matrícula:<br>Início da Contagem de Prazo:<br>Data Limite para o Depósito:      | Mestrado<br>Toxicologia e Análises Toxicológicas<br>04/12/2013<br>04/12/2013<br>03/10/2016  |  |  |  |  |
| Orientador:  | Prof(a). Dr(a). Tania Marcourakis - 04/12/2013 até o presente. Email:<br>tmarcour@usp.br  |  |  |  |  |
| Proficiência em Línguas:   | Inglês, Aprovado em 04/12/2013  |  |  |  |  |
| Prorrogação(ões):  | 120 dias<br>Período de 04/06/2016 até 02/10/2016  |  |  |  |  |
| Data de Aprovação no Exame de<br>Qualificação:   | Aprovado em 02/03/2015  |  |  |  |  |
| Data do Depósito do Trabalho:<br>Título do Trabalho:   |   |  |  |  |  |
| Data Máxima para Aprovação da<br>Banca:  |   |  |  |  |  |
| Data de Aprovação da Banca:  |   |  |  |  |  |
| Data Máxima para Defesa:<br>Data da Defesa:<br>Resultado da Defesa:  |   |  |  |  |  |
| Histórico de Ocorrências:  | Primeira Matrícula em 04/12/2013<br>Prorrogação em 20/04/2016   |  |  |  |  |

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013). Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016 Impresso em: 04/08/2016 08:29:45

牙anus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

1/2

#### 04/08/2016

#### 9141 - 8854202/1 - Mariana Aguilera Alencar da Silva

| Sigla            | Nome da Disciplina  | Início     | Término    | Carga<br>Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação                        |
|------------------|---|------------|------------|------------------|-------|-------|-------|------|---------------------------------|
| FBC5803-<br>3/3  | Sistemas de Garantia da Qualidade em<br>Laboratórios de Ensaio                                  | 11/03/2014 | 24/03/2014 | 30               | 0     | -     | -     | N    | Pré-<br>matrícula<br>indeferida |
| FBC5802-<br>3/4  | Tópicos Avançados em Toxicologia I  | 11/03/2014 | 23/06/2014 | 15               | 1     | 100   | Α     | Ν    | Concluída                       |
| BMB5795-<br>4/3  | Neurociência Básica (Instituto de Ciências<br>Biomédicas - Universidade de São Paulo)           | 24/04/2014 | 03/07/2014 | 120              | 8     | 100   | Α     | Ν    | Concluída                       |
| FBC5803-<br>3/4  | Sistemas de Garantia da Qualidade em<br>Laboratórios de Ensaio                                  | 05/08/2014 | 18/08/2014 | 30               | 0     | -     | -     | Ν    | Turma<br>cancelada              |
| FBC5818-<br>1/2  | Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e<br>sua Relação com Doenças<br>Neurodegenerativas   | 29/09/2014 | 02/11/2014 | 45               | 3     | 90    | A     | N    | Concluída                       |
| BMF5862-<br>4/1  | Ciclo Celular e Apoptose (Instituto de Ciências<br>Biomédicas - Universidade de São Paulo)      | 03/11/2014 | 23/11/2014 | 90               | 6     | 80    | Α     | Ν    | Concluída                       |
| BMB5718-<br>10/2 | Progressos em Neurociência (Instituto de<br>Ciências Biomédicas - Universidade de São<br>Paulo) | 09/03/2015 | 29/06/2015 | 75               | 5     | 100   | A     | N    | Concluída                       |
| FBC5803-<br>3/5  | Sistemas de Garantia da Qualidade em<br>Laboratórios de Ensaio                                  | 24/03/2015 | 06/04/2015 | 30               | 2     | 100   | Α     | Ν    | Concluída                       |

|              | Créditos mí                | nimos exigidos                 | Créditos obtidos |
|--------------|----------------------------|--------------------------------|------------------|
|              | Para exame de qualificação | o Para depósito da dissertação | )                |
| Disciplinas: | 10                         | 25                             | 25               |
| Estágios:    |                            |                                |                  |
| Total:       | 10                         | 25                             | 25               |

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

### Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T -Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016 Impresso em: 04/08/2016 08:29:45

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

#### 9141 - 8854202/1 - Mariana Aguilera Alencar da Silva

| Comissão julgadora da dissertação de mestrado: |                   |           |            |  |  |
|--|-------------------|-----------|------------|--|--|
| NUSP   | Nome              | Vínculo   | Função     |  |  |
| 1754705  | Tania Marcourakis | FCF - USP | Presidente |  |  |

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016 Impresso em: 04/08/2016 08:29:45