

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
MESTRADO EM ZOOLOGIA

RAPHAELA SOARES FONSECA

**EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES E LARVAS DE *ZEBRAFISH* A COMPOSTOS BISFENÓLICOS
PARA ELUCIDAÇÃO DE MECANISMOS NEUROTOXICOLÓGICOS**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br

EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH A COMPOSTOS BISFENÓLICOS PARA ELUCIDAÇÃO
DE MECANISMOS NEUROTOXICOLÓGICOS

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Biociências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Zoologia.

Orientador(a): Dr^a Monica Ryff Moreira Roca Vianna

Porto Alegre

2018

RESUMO

O crescimento das fontes de poluentes ambientais afeta diretamente o ecossistema e a saúde humana, principalmente devido à perda da qualidade do solo e da água. Entre estes agentes tóxicos, estão incluídos os disruptores endócrinos, os quais podem acarretar diversas mudanças em vias bioquímicas e alterações fisiológicas em organismos. Estudos com diferentes formas de bisfenóis, compostos presentes em diversos produtos de consumo humano e inclusive no ambiente devido à contaminação por efluentes industriais, já apresentaram efeitos extremamente nocivos na regulação da expressão de genes relacionados ao sistema neural e endócrino durante o desenvolvimento, além de alterações comportamentais severas. O *zebrafish*, *Danio rerio*, é um excelente organismo modelo para estudar neurotoxicidade, uma vez que possui vantagens em relação a aspectos específicos do seu desenvolvimento e um custo reduzido de manutenção quando comparado a outros vertebrados modelos. Este projeto propôs o estudo dos efeitos do bisfenol A (BPA), seus derivados clorados e substitutivos (BPS e BPF), sobre parâmetros de embriotoxicidade e comportamento, buscando também caracterizar os mecanismos celulares e moleculares dos potenciais efeitos observados avaliando morte celular e níveis de proteínas e expressão de genes alvos em embriões e larvas de *zebrafish*. Para tanto, após a exposição dos embriões e larvas a diferentes concentrações de BPA e seus derivados, foram realizadas análises morfológicas e sobrevivência dos embriões; ensaios comportamentais de locomoção e avaliação cognitiva das larvas. Ao realizar a curva de concentração dos diferentes compostos bisfenólicos, não foi observada diferença significativa na sobrevivência, teratogênese e eclosão dos animais, porém, ao analisar o comportamento exploratório dos animais tratados com BPA e BPF foi detectado um aumento significativo nos parâmetros exploratórios das larvas. Ao compararmos o comportamento aversivo do BPA com o controle tratado com o veículo DMSO, não existiu diferença estatística entre os grupos, enquanto no BPS ocorreu uma melhora na resposta de escape das larvas. Adicionalmente, serão realizadas análises comportamentais e de atividade locomotora em animais adultos previamente tratados com os compostos estudados durante o desenvolvimento inicial. Desta forma, espera-se contribuir para o conhecimento atual dos mecanismos de neurotoxicidade relacionados à disrupção endócrina causada por contaminantes da família dos bisfenóis.

Palavras-chave: Bisfenol. Disrupção endócrina. Neurotoxicidade

ABSTRACT

The increase of environmental pollutants sources directly affects the ecosystem and human health, mainly due to loss of soil and water quality. Among these toxic agents are included endocrine disruptors, which can cause changes in biochemical pathways and physiological changes in organisms. Studies with different forms of bisphenols, compounds present in many products of human consumption and the environment, had already demonstrated extremely adverse effects on behavior and gene expression of targets related to neural and endocrine systems during development. The zebrafish, *Danio rerio*, is an excellent model organism for studying neurotoxicity, due to its advantages with respect to specific aspects of their development and a low maintenance cost when compared to other vertebrate model organisms. This work proposes the investigation of the effects of bisphenol A (BPA), its chlorinated derivatives and its substitutes (BPS and BPF), toxicological and behavioral parameters combined with characterization of its potential underlying cellular and molecular mechanisms such as cell death and proteins and gene expression in the nervous and endocrine systems. After the embryo and larvae were exposed to different concentrations of BPA and its derivatives, morphological analyzes and embryo survival were carried out, as well as behavioral tests of locomotion and cognitive evaluation of the larvae. In the concentration curve of the different bisphenolic compounds, no significant difference was observed in the survival, teratogenesis and hatching of the animals, however, a significant increase was detected in the exploratory parameters of the BPA and BPF groups. When comparing the aversive behavior of the BPA with the DMSO, there was no statistical difference between the groups, whereas in the BPS an improvement in the escape response of the larvae occurred. Additionally, behavioral and locomotor activity analyzes will be performed in adult animals previously treated with the compounds studied during the initial development. In this way, it is expected to contribute to the current knowledge of neurotoxicity mechanisms related to endocrine disruption caused by contaminants of the bisphenol family.

Key words: Bisphenol. Endocrine Disruption. Neurotoxicity

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO GERAL	5
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 <i>Zebrafish</i>	5
1.2 Estudos toxicológicos em <i>zebrafish</i>	6
1.3 Sistema endócrino de <i>zebrafish</i>	7
1.4 Sistema nervoso de <i>zebrafish</i>	8
1.5 Compostos bisfenólicos	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos Específicos	13
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 1	12
RESUMO	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAIS E MÉTODOS	16
Animais	16
Comitê de Ética	16
Tratamentos	17
Comportamento locomotor	17
Comportamento aversivo	17
Análise estatística	18
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	19
REFERÊNCIAS	21
Figura 1	25
Figura 2	26
Figura 3	27
Figura 4	28
Figura 5	29
Figura 6	30
CAPÍTULO 2	31
CONSIDERAÇÕES GERAIS	32

APRESENTAÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Zebrafish*

Diferentes animais modelos vêm sendo utilizados na pesquisa científica como uma alternativa ao uso de espécies de mamíferos como roedores. O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um pequeno teleosteo da família Cyprinidae originário da Índia e com distribuição geográfica no sul e sudeste da Ásia. Foi descrito primeiramente por Francis Hamilton em 1822 e proposto como modelo em 1983 pelo biólogo molecular George Streisinger, principalmente em estudos com genética e desenvolvimento embrionário.^{[1][2]} Com a notória importância do uso do *zebrafish* como organismo experimental nas pesquisas científicas, este teleosteo vem sendo amplamente explorado em diversas áreas como em estudos de neurofisiologia e biomedicina, incluindo aplicações na indústria farmacêutica.

Fertilização e desenvolvimento exclusivamente externos, alta taxa de fecundidade, desenvolvimento rápido (eclosão em até 72 horas pós-fertilização) e ovos relativamente grandes, com aproximadamente 0,7 milímetros de diâmetro, são algumas das características que tornam o *zebrafish* um animal modelo particularmente maleável para abordagens genéticas e moleculares comparado a outros vertebrados.^[3] Ainda, a rápida organogênese, a qual ocorre durante 36 horas pós-fertilização (hpf), o desenvolvimento completo dos precursores dos principais órgãos, e a transparência no início do desenvolvimento, permitem a utilização de técnicas em tempo real menos invasivas nos animais sem intervenções como cirurgia ou exames *post-mortem*. Em métodos de microscopia óptica e transgenia, por exemplo, é possível analisar fenótipos de doenças através de construtos genéticos que expressam proteínas fluorescentes em células, tecidos e/ou órgãos específicos; deste modo, a localização de peptídeos *in vivo* em animais modelos é um método crucial e eficiente para estudar a função de genes, principalmente aqueles relacionados a doenças.^[4]

Além de todas as possibilidades nas pesquisas genéticas e moleculares, o *zebrafish* também é considerado um modelo complementar para acelerar o processo de descobrimento de novas drogas. Para tanto, a busca de possíveis alvos terapêuticos pode ser realizada por meio do *screening* baseado na análise do fenótipo, e assim são identificadas substâncias tais como pequenas moléculas, peptídeos ou RNAi que causem mudanças desejáveis em vias de interesse.^{[3][5]} Similarmente, este método é utilizado para a avaliação toxicológicas de químicos, cujos efeitos adversos potenciais em vias biológicas são analisados tanto na saúde humana como em possíveis quadros patológicos em animais expostos a estes compostos.

1.2 Estudos toxicológicos em *zebrafish*

Assim como pode ocorrer a transferência transplacentária de químicos em mamíferos, peixes em seu estágio inicial de vida também podem ter transferência de compostos por via tecido maternal ou por via de absorção na água através do córion.^{[6][7]} Esta característica é uma das vantagens do uso do *zebrafish* como modelo toxicológico para estudos de monitoramento eco-ambiental e avaliação de poluentes. Isto posto, para analisar a toxicidade de um químico é necessário identificar o valor-limite de toxicidade do composto e a relação entre as características de exposição e o espectro de efeitos tóxicos, esclarecer os mecanismos e vias subjacentes à toxicidade, e determinar a dinâmica de toxicidade do químico.^[8] Sendo possível avaliar todos estes pontos em *zebrafish*, o modelo não só é utilizado em estudos de biologia do desenvolvimento, genética e biologia molecular, mas também no *screening* toxicológico durante o desenvolvimento *in vivo*.

Ainda, o *zebrafish* possui alta sensibilidade na detecção de ambientes contaminados, como a presença de químicos tóxicos, e serve como um eficiente sistema de custo reduzido para clarificar mecanismos toxicológicos, especialmente com a utilização de tecnologias transgênicas nessa área. Deste modo, o pequeno tamanho dos embriões minimiza o volume de custos e desperdícios para estudos de drogas e tóxicos, uma vez que o espaço de armazenamento necessário para os animais é reduzido, além da transparência e fertilização externa permitirem a classificação de efeitos teratogênicos e embriotóxicos. Estas vantagens, além da alta taxa de fecundidade do modelo, estabeleceram em diversos países ensaios de citotoxicidade padronizados utilizando embriões de *zebrafish* para testar o tratamento de águas residuais, e assim substituindo a utilização de outros peixes para tal finalidade.^{[9][10][11]}

Além do estudo detalhado de químicos únicos, existe a necessidade de realizar *screenings* em larga-escala de diversos compostos. Uma pesquisa recente realizada por Truong et al.^[12] testaram 1060 químicos de fase 1 (pesticidas em maioria) e 2 (produtos industriais e de consumo humano) em embriões de *zebrafish*, foi realizada avaliação da mortalidade dos animais, acompanhamento de possíveis alterações morfológicas como distorção na notocorda, compilação e comparação dos dados neurotoxicológicos com outros estudos já existentes; entre os químicos avaliados, 487 induziram efeitos adversos à exposição. Este exemplo demonstra um dos benefícios na utilização do *zebrafish* sobre outros animais como roedores por exemplo, os quais fornecem dados confiáveis e que extrapolam efeitos tóxicos para humanos, porém são mais caros e difíceis de se lidar no quesito manutenção e cuidados. Como *zebrafish* é uma espécie que vem sendo utilizado em laboratórios há um tempo, técnicas de reprodução e condições de criação já foram bem estabelecidas.^[6] Pequenos embriões permitem que tamanhos amostrais razoáveis sejam testados juntos utilizando placas de

cultivo celular ou placas de Petri fornecendo várias replicatas experimentais em um curto período de tempo.

Também, o *zebrafish* tem papel de bioindicador, sendo um modelo ideal para monitoramento ambiental de químicos disruptores endócrinos (EDCs), metais pesados e poluentes orgânicos, os quais podem causar diversos riscos para a saúde humana e animal, como alterações no padrão de expressão gênica, morfofisiologia e comportamento. Por exemplo, em um estudo no qual peixes foram expostos à concentrações ambientais baixas de mercúrio tanto de forma dietética como em tratamento na água, foi observada a diminuição na taxa respiratória mitocondrial nos músculos, enquanto no cérebro não foram observadas alterações semelhantes.^{[8][13]} Ainda, outros poluentes utilizados na pesquisa para estudos dos efeitos dos mesmos em modelos são os EDCs, sendo as substâncias exógenas mais comuns os difenil éteres polibromados, dioxina, BPA, e seus derivados; em sua maior parte possuem estrutura semelhante a de hormônios, causando alterações no sistema endócrino, assim como nas funções fisiológicas do organismo.^[14]

1.3 Sistema endócrino de *zebrafish*

Apesar de peixes formarem um grupo de vertebrados heterogêneo com diferenças anatômicas e fisiológicas de mamíferos, o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide está presente em *zebrafish* e é através desse que o sistema endócrino é controlado primariamente, pela coordenação da síntese, transporte, metabolismo e secreção de hormônio. Durante o desenvolvimento de vertebrados, a camada interna das três camadas germinativas (endoderme) forma o trato digestivo com seus apêndices e derivados: fígado, pâncreas e tireoide, sendo esta formada de células foliculares, compostas de tirócitos derivados da endoderme, e células-C.^[15] A unidade funcional da tireoide em teleósteos é o folículo, o qual é preenchido com coloides e fracamente disperso ao longo da linha média ventral do mesênquima faringeal, não formando uma estrutura glandular compacta com tecido conjuntivo como em outros vertebrados. Em *zebrafish* adulto, a tireoide é formada de folículos individuais, os quais encontram-se entre o primeiro arco branquial e o bulbo arterial.^[16]

Durante o desenvolvimento do *zebrafish*, o primeiro folículo é formado aproximadamente em 60 hpf, quando o embrião eclode do córion.^[17] Estudos indicam que os mecanismos moleculares presentes no desenvolvimento da tireoide em *zebrafish* são análogos ao da tireoide humana. Outras pesquisas, que analisam a expressão de diversos genes no decorrer do crescimento de larvas, mostrou que a glândula tireoide neste teleósteo se distende de forma polarizada, produzindo hormônios nas células foliculares através do período larval. Em 26 hpf, fatores de transcrição chaves já são expressos antes da formação da faringe, definindo a região na qual o primórdio estará localizado.^{[18][19]}

Ainda, a tireóide é responsável pela produção dos hormônios T3 e T4, sendo que esta síntese inclui vários passos iniciando pela captação de iodeto e iodação de resíduos de tirosina específicos da tiroglobulina no lúmen folicular. Assim, para formar as iodotironinas (T3 e T4) é necessário o acoplamento de tirosinas, desta forma a tiroglobulina é internalizada nas células foliculares para sofrer digestão enzimática por proteases, liberando T3 e T4 para a corrente sanguínea. Os hormônios tireoideos (THs) agem pela ligação à receptores nucleares específicos e desempenham papéis importantes na embriogênese e desenvolvimento de larvas.^{[15][18]} Desse modo, o *zebrafish* é um ótimo modelo para estudos toxicológicos de EDCs envolvidos com a tireoide, uma vez que o desenvolvimento da glândula é bem caracterizado no teleósteo e os principais genes e vias moleculares envolvidos na ontogênese da tireoide são bem conservados.^[19]

Para a maioria dos THs agirem em locais específicos é necessário a ligação a transportadores (TRs). Entre estes, pode-se citar a transtirretina (TTR), também conhecida como pré-albumina, a qual possui importante papel no transporte de T4 e retinol (vitamina A). Ainda, esta proteína homotetramérica está incluída na superfamília das peptídeos, as quais possuem resíduos muito conservados entre diversos organismos. É encontrada em diversas espécies de vertebrados e é sintetizada principalmente no fígado e no plexo coroide cerebral, sendo liberada no sangue e fluido cerebrospinal, respectivamente.^[20] Comparando a sequência de aminoácidos da TTR de *zebrafish* e humanos, observou-se similaridade de 46,36%, sendo que dos 151 resíduos de aminoácidos em humanos, 70 estão presentes em TTR de *zebrafish* (Figura 1). A proteína também se liga à cerca de 15-20% dos THs circulantes e é responsável por grande parte da entrega imediata de T4 e T3; também é a principal proteína de ligação à hormônios no fluido cerebrospinal por haver uma grande síntese nas células epiteliais do plexo coroide, representando cerca de 25% do conteúdo total de proteínas. Além disso, já foi comprovado que TTR interage não só com hormônios, mas também com proteínas como a β -Amiloide (A β), a qual tem sido foco de pesquisas toxicológicas por ser um marcador para a Doença de Alzheimer. Porém, seu papel fisiológico ainda não é bem entendido, apesar de existirem estudos que sugerem o papel dessa proteína na modulação da atividade sináptica e sobrevivência neuronal.^{[21][22][23]}

1.4 Sistema nervoso de *zebrafish*

Dos três folhetos embrionários, é a partir de uma região especializada da ectoderme, a neuroectoderme ou placa neural, que surge o sistema nervoso central (SNC) de vertebrados. Em embriões de *zebrafish* com 24 hpf já é possível visualizar o tubo neural formado, que assim como em outros vertebrados é altamente polarizado no eixo dorsoventral^[24]. Além de tudo, este teleósteo possui grande sensibilidade, sendo capaz de absorver produtos químicos adicionados à água e

1.5 Compostos bisfenólicos

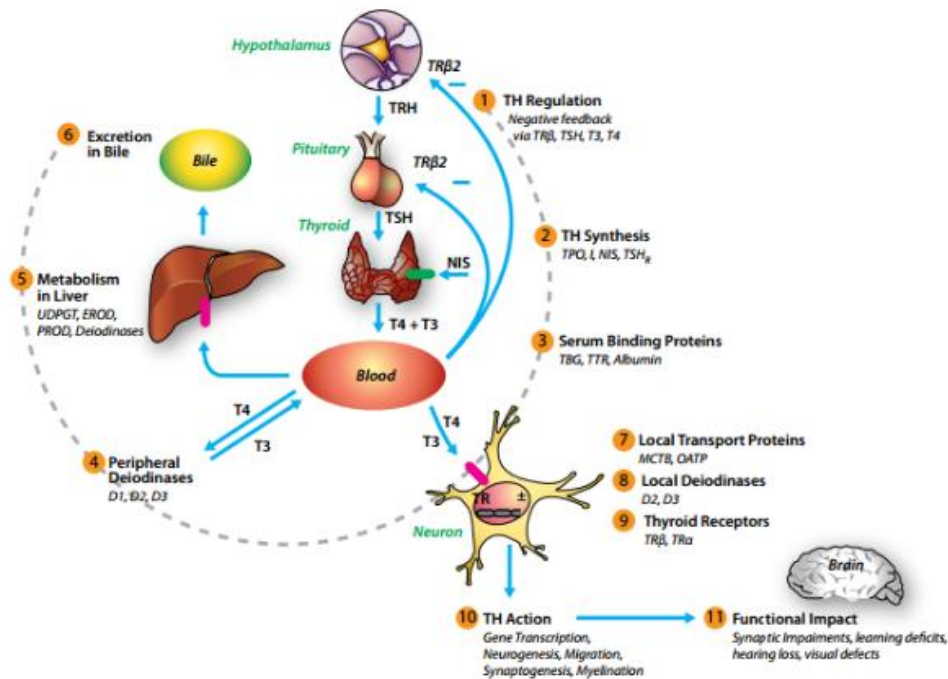
Os bisfenóis são substâncias com duas funções hidroxifenil caracterizadas por seus efeitos de disrupção endócrina, inteferindo com funções hormonais, como secreção, síntese, ligação, transporte, ou eliminação de hormônios responsáveis pela manutenção da homeostase, desenvolvimento, reprodução e comportamento (Figura 2).^{[15][16]} Estes problemas de saúde primariamente foram relatados em animais domésticos e silvestres por uma relativamente alta exposição à organocloreto, compreendendo o diclorodifeniltricloroetano (DDT), e seus metabólitos, bifenilos policlorados (PCBs), e dioxinas; enquanto os bisfenóis, monômeros constituintes de policarbonatos e resinas epóxi, sendo estes bem conhecidos por serem encontrados em itens industrializados como recipientes de plástico e no revestimento de alimentos enlatados, logo, tendo contato direto com a comida a ser ingerida.^{[17][18]} Assim, devido a efeitos severos observados na exposição à baixas concentrações no início do desenvolvimento, mamadeiras contendo BPA - a forma mais sintetizada do grupo dos bisfenóis - fabricadas ou importadas no Brasil foram proibidas pela Anvisa em 2011, bem como em outros países.^[19]

Os disruptores endócrinos com atividade estrogênica, como o BPA, são caracterizados pela alteração de funções do sistema endócrino interferindo na síntese, ligação e/ou metabolismo de estrógenos naturais.^[20] Apesar de ser proibido na fabricação de mamadeiras, o BPA continua a ser amplamente utilizado em recipientes de comida e bebida, tintas, revestimento de tubulação de água potável, adesivos, selantes dentários e produtos de papel para uso doméstico. Estimativas da produção de BPA no mundo em 2002 atingiram 2,8 milhões de toneladas, sendo que mais de 453 toneladas são liberadas no ambiente todo ano.^[21] Apesar do conhecimento de efeitos tóxicos e ecotoxicológicos (Tabela 1) do BPA, e de sua ação disruptora endócrina estrogênica, ainda não são conhecidos todos os seus mecanismos de ação, nem caracterizados os efeitos deletérios sobre alvos específicos que não necessariamente induzam mortalidade dos animais mas que podem interferir indiretamente com dinâmicas que comprometam sua sobrevivência (Tabela 2). Na visão desta situação é necessário aumentar o conhecimento acerca deste composto, visto que diversos sistemas relacionados ao sistema endócrino, assim como o próprio, são afetados devido às propriedades estrogênicas do BPA alterando a funcionalidade de hormônios e seus receptores. Portanto, análogos deste químico foram produzidos como compostos alternativos ao BPA, entre eles o bisfenol S (BPS) e o bisfenol F (BPF).^[22]

O BPS é um composto organossulfano com dois grupos funcionais fenol ligados à um grupo sulfonil. É utilizado para uma variedade de aplicações industriais: produtos de limpeza, solvente de galvanização, produção de polímeros sulfona, componente de resina fenólica e desenvolvedor de

papeis sensíveis ao calor, incluindo itens comercializados como “papel livre de BPA”.^{[23][24]} De maneira similar, o BPF também é utilizado na indústria manufatureira de plástico e resinas epóxi, além de

Figura 2. Vias afetadas por disruptores endócrinos, entre estas, rotas importantes associadas ao sistema nervoso como o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, e assim prejudicando a síntese, regulação e ação dos hormônios tireóides pela ligação a seus receptores e transportadores causando impactos funcionais no cérebro.



Fonte: Gilbert et al., 2011, adaptada para EDC report, 2013.

também sofrer epoxidação, porém é aplicado principalmente em produtos que necessitam de maior espessura e durabilidade, uma vez que o composto possui alta resistência química. Exemplos do uso das resinas é na síntese de tintas e na indústria de revestimentos, como tanques, pisos industriais, pontes, estradas, adesivos estruturais, coberturas de convés, entre diversos outros.^[25] Em estudos, os dois compostos apresentaram concentrações equivalentes ao do BPA em amostras de urina humana, e em pesquisas com *zebrafish*, tanto BPF como BPS tiveram atividade estrogênica sobre o gene da aromatase B no sistema nervoso de larvas.^{[26][27]}

Por consequência da grande quantidade de produtos fabricados utilizando BPA, o composto é continuamente liberado no meio aquático por meio de efluentes industriais, municipais e agrícolas. A quantificação de níveis de BPA já foi relatada em diversos meios aquáticos como água potável originada de estações de tratamento de água, água de superfície, garrafas de água e água de torneira doméstica.^[28] Com a necessidade constante de geração de água potável, aumenta a necessidade do uso da água de superfície para esta produção. Entre os métodos de purificação da água própria para

consumo humano, está a cloração, a qual consiste de adição de cloro (Cl₂) na água. Assim, ocorre a formação espontânea de diferentes derivados clorados do BPA (mono-, di-, tri- ou tetra-cloro-bisfenol A), os quais podem ser tão tóxicos quanto o BPA por ter grande capacidade de ligação à receptores estrogênicos.^[29]

O estudo de Yamauchi et al. demonstrou que transtirretina - uma proteína tetramérica responsável pelo transporte de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) – tem maior afinidade por derivados clorados do BPA do que o próprio BPA.^[30] Em outra pesquisa, embriões de *zebrafish* expostos ao BPA apresentaram distúrbios no padrão dorso-ventral, desenvolvimento de músculos somáticos e

Tabela 1 – Revisão bibliográfica de estudos de detecção ou obtenção amostral de BPA e seus derivados clorados no ambiente.

BPA e seus derivados clorados	Matriz	Concentração	Referência	Conclusões
BPA, 3-CIBPA; 3,5-Cl2BPA; 3,3-Cl2BPA; Cl3BPA; Cl4BPA	Efluente final	(µg/L) BPA (8-370); CIBPA (<0,2-2,0); 3,3-Cl2BPA (<0,2-0,5); 3,5-Cl2BPA (<0,2-1,0); Cl3BPA (0,9-1,2); Cl4BPA (1,3-1,4)	Fukazawa et al. (2001)	O BPA e o 3-CIBPA degradaram mais rápido que os outros derivados
BPA, CIBPA; 3,5-Cl2BPA; 3,3-Cl2BPA; Cl3BPA; Cl4BPA	Água não-tratada sintética	(µg/L) BPA (0,2-370); CIBPA (<0,2-2,0); 3,3-Cl2BPA (<0,2-0,5); 3,5-Cl2BPA (<0,2-1,0); Cl3BPA (0,9-1,2); Cl4BPA (1,3-1,4)	Fukazawa et al. (2002)	3,5-Cl2BPA e 3,3-Cl2BPA tiveram atividade agonista (estrogênica) mais potente
BPA	Água de rio	(ng/L) BPA (8,6-168,3)	Moreira et al. (2011)	Valores tóxicos (MAC) 60-480 ng/L
BPA	Água de rio	(µg/L) BPA (5,64-295,25)	Beraldo (2012 - dissertação)	O valor de BPA encontrado foi maior que o valor permitido para substâncias orgânicas de acordo com o CONAMA
BPA	Água de rio	(ng/L) BPA (5-77)	Filho (2012 - dissertação)	Fontes próximas à descartes de esgotos tem maiores concentrações de BPA

desenvolvimento cerebral em diferentes estágios de crescimento.^[31] Ainda, com o aumento de doenças neurocomportamentais, existem evidências de uma forte correlação entre o acúmulo de BPA e desordens no desenvolvimento do sistema nervoso.^[32] Logo, faz-se necessário o estudo dos

efeitos deste composto e seus derivados clorados sobre transportadores hormonais, como a transtirretina, e como essa interação afeta diferentes vias no organismo.

2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo mensurar os potenciais efeitos tóxicos e alterações comportamentais induzidos pela exposição durante o desenvolvimento inicial ao BPA e seus substitutivos BPS e BPF em embriões e larvas de *zebrafish* e animais adultos.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos embriotóxicos nos embriões e larvas de *zebrafish* expostos ao BPA e substitutivos BPS e BPF através da análise de Kaplan -Meier;
- Avaliar os efeitos teratogênicos através da análise morfológica nos embriões e larvas de *zebrafish* expostos ao BPA e substitutivos BPS e BPF;
- Analisar comportamento de nado e exploração de um novo ambiente de larvas de 7 dias pós-fertilização (dpf) previamente expostas ao BPA e substitutivos BPS e BPF;
- Analisar o comportamento aversivo das larvas de 7 dpf previamente expostas ao BPA e substitutivos BPS e BPF;

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso da Faculdade de Biociências e no Centro de Modelos Biológicos Experimentais da PUCRS, os quais possuem a estrutura para criação e manutenção de *zebrafish* e os equipamentos necessários para a execução da pesquisa. Ainda, este projeto foi submetido para avaliação e aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais da universidade (CEUA-PUCRS) e teve duração de dois anos.

Tabela 2 – Revisão bibliográfica de estudos com modelos animais utilizando BPA, seus substitutivos BPF e BPS, e derivados clorados.

BPA, substitutivos e seus derivados clorados	Modelo	Concentração	Referência	Efeitos
BPA; 3-ClBPA; 3,3'-Cl2BPA; 3,3,5'-Cl3BPA; 3,3',5,5'-Cl4BPA	Medaka (tratamento na água)	($\mu\text{g/L}$) BPA (100-1000); 3-ClBPA (100-500); 3,3'-Cl2BPA (100-1000); 3,3,5'-Cl3BPA (200 e 500); 3,3',5,5'-Cl4BPA (1000)	Tabata et al. (2004)	Os potenciais estrogênicos de BPA e seus derivados clorados estavam na ordem de 3,3'-diClBPA > BPA \geq 3-ClBPA > 3,3',5-triClBPA.
BPF	<i>Zebrafish</i> embriões e larvas (tratamento na água)	($\mu\text{g/L}$) BPF (0,2-200)	Huang et al. (2016)	Exposição à 20 e 200 $\mu\text{g/L}$ causa regulação negativa do gene <i>ttr</i>
BPA; BPS	<i>Zebrafish</i> embriões e larvas (tratamento na água)	($\mu\text{g/L}$) BPA (0,00015-0,0228) (μM) BPA (0,0068-1) ($\mu\text{g/L}$) BPS (0,00015) (μM) BPS (0,0068)	Kinch et al. (2014)	Autor escolhe a dose + baixa, pq 1 μM é quase equivalente à dose encontrada no tecido placentário; tanto BPA como BPS alteraram a formação do centro neuroendócrino
BPA; BPS; BPF	<i>Zebrafish</i> embriões e larvas (tratamento na água)	($\mu\text{g/L}$) BPA (0,00228-0,228) (μM) BPA (0,1-10) ($\mu\text{g/L}$) BPF e BPS (0,0228) (μM) BPF e BPS (1)	Cano-Nicolau et al. (2016)	BPA, BPS e BPF exibem atividade estrogênica no gene da aromatase na concentração de 1 μM
BPA	<i>Zebrafish</i> adulto (tratamento na água)	($\mu\text{g/L}$) BPA (0,00228-0,0228) (μM) BPA (0,1 e 1)	Weber et al. (2015)	Os animais tratados com a dose 0,1 μM tiveram diferença significativa na porcentagem de tempo gasto na frente do espelho comparado à 0 ou 1 μM
BPA; CLBPA; 2,2'-CL2BPA; 2,6-CL2BPA; CL3BPA	Colostro (humano)	(ng/mL) BPA (1,47); 2,2'-CL2BPA (1,62); 2,6-CL2BPA (1,40);	Migeot et al. (2013)	As concentrações de CLxBPA é similar a de BPA no colostro (o CL2BPA é o mais abundante entre os CLxBPA)

Os animais utilizados no experimento estavam no estágio embrionário e larval e foram obtidos através do cruzamento de matrizes da espécie *Danio rerio* criadas no laboratório, sendo estas constituídas de peixes adultos da linhagem selvagem AB com mais de sete meses de vida. As matrizes foram mantidas em um número de 5 animais por litro de água do aquário em um sistema de manutenção com filtragem em série automatizado e monitoramento de pH, condutividade e temperatura controladas (Zebtec, Tecniplast, Itália). Os aquários receberam água de osmose reversa reconstituída com concentrações controladas de nitratos, nitritos, cloro e amônia; também tiveram o pH (7,0 a 7,5) e temperatura ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) monitorados, assim como o ciclo claro/escuro (14/10 horas); e uma dieta balanceada com ração flocada e artêmia salina três vezes ao dia.^[46] A separação das matrizes adultas para o acasalamento foi realizada previamente no período escuro e foi feita conforme Westerfield^[46], em um aquário de encaixe com uma divisória transparente para a separação de machos e fêmeas (2/1). Às oito horas da manhã (início do período claro), a barreira foi retirada para os animais acasalarem. Os óvulos fecundados foram coletados do aquário e tratados em placas de 96 poços (1 embrião por poço) até 3 hpf.

Os animais foram divididos em grupos conforme a substância à qual foram expostos e respectivos grupos controle com os veículos para preparação destes agentes. Para os tratamentos foram realizadas curvas de concentrações para decidir a concentração mais efetiva de cada substância estudada de acordo com informações obtidas na literatura (Tabela 1 e 2) e nas Fichas de Dados de Segurança de Material (MSDS) dos respectivos compostos. O composto BPA (Sigma-Aldrich, 239658) foi testado nas concentrações de 0,0001, 0,55 e 1000,0 $\mu\text{g/L}$; o substitutivo BPS (Sigma-Aldrich, 103039) nas concentrações 0,0001, 0,55 e 1000,0 $\mu\text{g/L}$; o substitutivo BPF (Sigma-Aldrich, 51453) nas concentrações de 0,1, 10,0 e 1000,0 $\mu\text{g/L}$; o composto tetrabifenol A (Sigma-Aldrich, 73081) e o derivativo clorados propostos inicialmente no projeto não puderam ser testados por questões financeiras. Após os tratamentos, os embriões foram armazenados em uma estufa (BOD), onde tiveram condições de luminosidade e temperatura controlados e seus meios de exposição renovados diariamente até os 7 dpf. Os animais foram condicionados conforme já descrito acima para as matrizes adultas, para serem utilizados em testes comportamentais. Ao término dos experimentos, as larvas foram crioeutanasiadas de acordo com as diretrizes do Institutional Animal Care and Use Committee^[47], enquanto os animais adultos, ainda em desenvolvimento, serão eutanasiados por resfriamento rápido seguido de decapitação como indicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.^[48]

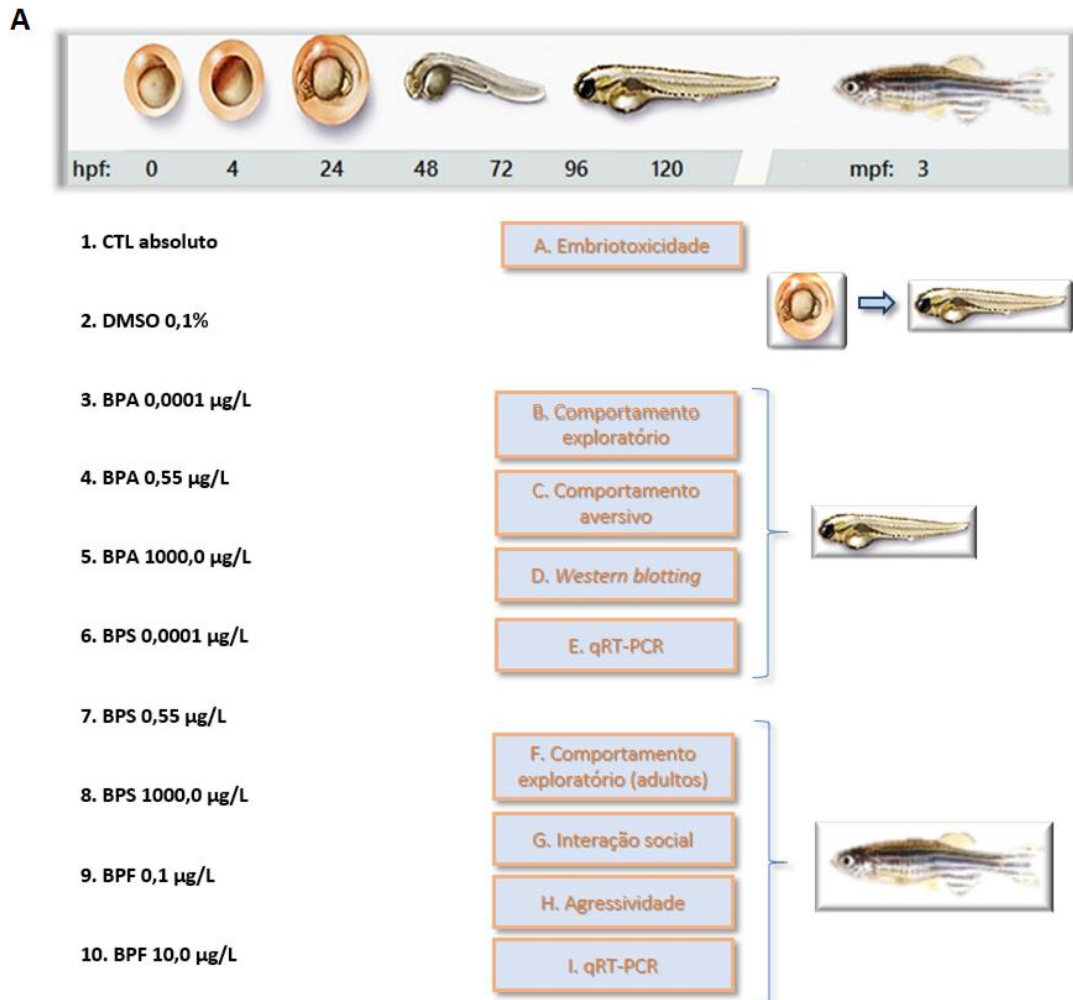
Na literatura se prevê um acréscimo de mais 20% de animais, tendo em vista a ocorrência de perdas de animais por motivos e causas não ligadas ao experimento.^[49] Como neste projeto estudamos animais nas fases embrionárias e larvais, nas quais as perdas são aumentadas, e animais crescerão também até a fase adulta, é previsto um aumento da mortalidade entre os 11 e 16 dpf em

zebrafish por questões de vulnerabilidade neste período de crescimento, assim foi acrescentado 40% a mais ao invés de 20%.^[50]

Para cada tratamento e grupos controles, foi previsto a necessidade de 40 embriões (Figura 3B); todos os animais tiveram a embriotoxicidade monitorada diariamente até os 7 dpf, como indicado na linha do tempo e esquema apresentados na figura 3A. A capacidade locomotora e aversiva foi avaliada aos 7 dpf, não sendo utilizados os mesmos animais já utilizados para análises embriotóxicas. A detecção de morte celular proposta inicialmente não foi realizada, uma vez que o kit disposto no laboratório não estava dentro do prazo de validade. Os animais utilizados para os comportamentos locomotores e de aversão foram eutanasiados e armazenados em freezer -80°C para análises protéicas e de expressão gênica.

Os embriões e larvas tratados e grupos controle estão sendo criados até os 4 meses pós-fertilização (mpf) expostos somente à água do sistema, para análises comportamentais, protéicas e de expressão gênica, uma vez que os animais com 3 mpf não estão com tamanho e peso suficiente para os ensaios que serão realizados.

Figura 3 - Delineamento experimental apresentando os grupos experimentais e os ensaios realizados.

**B**

1A*	40 x 3 = 120	2A*	40 x 3 = 120	3A*	40 x 3 = 120	4A*	40 x 3 = 120	5A*	40 x 3 = 120
1B*	20 x 3 = 60	2B*	20 x 3 = 60	3B*	20 x 3 = 60	4B*	20 x 3 = 60	5B*	20 x 3 = 60
1C*	10 x 3 = 30	2C*	10 x 3 = 30	3C*	10 x 3 = 30	4C*	10 x 3 = 30	5C*	10 x 3 = 30
1D	20 x 3 = 60	2D	20 x 3 = 60	3D	20 x 3 = 60	4D	20 x 3 = 60	5D	20 x 3 = 60
1E	20 x 3 = 60	2E	20 x 3 = 60	3E	20 x 3 = 60	4E	20 x 3 = 60	5E	20 x 3 = 60
1F*	5 x 3 = 15	2F*	5 x 3 = 15	3F*	5 x 3 = 15	4F*	5 x 3 = 15	5F*	5 x 3 = 15
1G*	5 x 3 = 15	2G*	5 x 3 = 15	3G*	5 x 3 = 15	4G*	5 x 3 = 15	5G*	5 x 3 = 15
1H*	5 x 3 = 15	2H*	5 x 3 = 15	3H*	5 x 3 = 15	4H*	5 x 3 = 15	5H*	5 x 3 = 15
1I	3 x 3 = 9	2I	3 x 3 = 9	3I	3 x 3 = 9	4I	3 x 3 = 9	5I	3 x 3 = 9
6A*	40 x 3 = 120	7A*	40 x 3 = 120	8A*	40 x 3 = 120	9A*	40 x 3 = 120	10A*	40 x 3 = 120
6B*	20 x 3 = 60	7B*	20 x 3 = 60	8B*	20 x 3 = 60	9B*	20 x 3 = 60	10B*	20 x 3 = 60
6C*	10 x 3 = 30	7C*	10 x 3 = 30	8C*	10 x 3 = 30	9C*	10 x 3 = 30	10C*	10 x 3 = 30
6D	20 x 3 = 60	7D	20 x 3 = 60	8D	20 x 3 = 60	9D	20 x 3 = 60	10D	20 x 3 = 60
6E	20 x 3 = 60	7E	20 x 3 = 60	8E	20 x 3 = 60	9E	20 x 3 = 60	10E	20 x 3 = 60
6F*	5 x 3 = 15	7F*	5 x 3 = 15	8F*	5 x 3 = 15	9F*	5 x 3 = 15	10F*	5 x 3 = 15
6G*	5 x 3 = 15	7G*	5 x 3 = 15	8G*	5 x 3 = 15	9G*	5 x 3 = 15	10G*	5 x 3 = 15
6H*	5 x 3 = 15	7H*	5 x 3 = 15	8H*	5 x 3 = 15	9H*	5 x 3 = 15	10H*	5 x 3 = 15
6I	3 x 3 = 9	7I	3 x 3 = 9	8I	3 x 3 = 9	9I	3 x 3 = 9	10I	3 x 3 = 9

N total	2250
40%	900
N total + 40%	3.215

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*. 2008;83(1):13-34.
2. Arunachalam M, Raja M, Vijayakumar C, Malaiammal P, Mayden RL. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*. 2013;10(1):1-14.
3. Lieschke, GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007;8(5):353-367.
4. Inoue D, Wittbrodt J. One for all—a highly efficient and versatile method for fluorescent immunostaining in fish embryos. *PLoS One*. 2011;6(5):e19713
5. MacRae CA, Peterson, RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(10):721-731.
6. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*. 2005;86(1):6-19.
7. Jacobson JL, Fein GG, Jacobson SW, Schwartz PM, Dowler JK. The transfer of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs) across the human placenta and into maternal milk. *Am J Public Health*. 1984;74(4):378–379.
8. Sipes NS, Padilla S, Knudsen TB. Zebrafish—As an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Research C Embryo Today*. 2011;93(3): 256-267.
9. Taylor KL, Grant NJ, Temperley ND, Patton EE. Small molecule screening in zebrafish: an in vivo approach to identifying new chemical tools and drug leads. *J Cell Commun Signal*. 2010;8(1):11.
10. Yang L, et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol*. 2009;28(2):245-253.
11. Dai Y, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ Toxicol Chem*. 2014;33(1):11-17.
12. Truong L, Reif DM, St Mary L, Geier MC, Truong HD, Tanguay RL. Multidimensional in vivo hazard assessment using zebrafish. *Toxicol Sci*. 2013;kft235.
13. Kavlock RJ, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ Health Persp*. 1996;104(Suppl 4):715.
14. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Enviro Toxicol Phar*. 2015;40(1):241-258.
15. Porazzi P, Calebiro D, Benato F, Tiso N, Persani L. Thyroid gland development and function in the zebrafish model. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;312(1):14-23.
16. Wendl T et al. Pax2. 1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish. *Development*. 2002;129(15):3751-60.
17. Elsalini OA, von Gartzten J, Cramer M, Rohr KB. Zebrafish *hhx*, *nk2. 1a*, and *pax2. 1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. *Dev Biol*. 2003;263(1):67-80.
18. Essner JJ, Breuer JJ, Essner RD, Fahrenkrug SC, Hackett PB. The zebrafish thyroid hormone receptor alpha 1 is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. *Differentiation*. 1997;62:107–117
19. Alt B, Reibe S, Feitosa NM, Elsalini OA, Wendl T, Rohr KB. Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish. *Dev Dynam*. 2006;235(7):1872-1883.
20. Vieira M, Saraiva MJ. Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomol Concepts*. 2014;5(1):45-54.
21. Li X, et al. Mechanisms of transthyretin inhibition of β -amyloid aggregation in vitro. *J Neurosci*. 2013;33(50):19423-19433.
22. Link CD. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9368–9372.
23. Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid β peptides. *J Physiol*. 2006;575(1):5-10.

24. Blader P, Strähle U. Zebrafish developmental genetics and central nervous system development. *Hum Mol Genet.* 2000;9(6):945-951.
25. Sager JJ, Bai Q, Burton EA. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain Struct Funct.* 2010;214:285–302.
26. Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004;3:63–74.
27. Park E, Lee Y, Kim Y, Lee CJ. Cholinergic modulation of neural activity in the telencephalon of the zebrafish. *Neurosci Lett.* 2008;439:79–83.
28. Gore AC, Crews D, Doan LL, La Merrill M, Patisaul H, Zota A. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs)—a guide for public interest organizations and policy makers. *Endocrine Society reports and white papers.* 2014:1-76.
29. Qiu W, Zhao Y, Yang M, Farajzadeh M, Pan C, Wayne NL. Actions of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine System During Early Development in Zebrafish. *Endocrinology.* 2015;en-2015.
30. Bailin PD, Byrne M, Lewis S, Liroff R. Public awareness drives market for safer alternatives: bisphenol A market analysis report. *Investor Environmental Health Network.* 2008:1-37.
31. Estados Unidos. Plano de ação (2010). Bisphenol A Action Plan. US Environmental Protection Agency. 29 de março de 2010.
32. Beserra MR, de Araújo Schiavini J, Rodrigues WC, Pereira CDSS. O Bisfenol A: sua utilização e a atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde humana. *R Eletr TECCEN.* 2012;5(1):37-46.
33. Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. (2009). Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit.* 2009;15(6):RA137-RA145.
34. Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller RT. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals, 2012. *Toxicol Lett.* 211;S3.
35. Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environ Health Persp (Online).* 2015;123(7):643.
36. Clark E. Sulfolane and sulfones. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Nova York: John Wiley & Sons. 2012
37. Liao C, Liu F, Kannan K. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environ Sci Technol.* 2012;46:6515–6522.
38. Fiege H, et al. Phenol derivatives. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2000:643–647.
39. Liao C, et al. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol.* 2012;46:6860–6866.
40. Huang GM, Tian XF, Fang XD, Ji FJ. Waterborne exposure to bisphenol F causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae. *Chemosphere.* 2016;147:188-194.
41. Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage.* 2012;104:19-34.
42. Yamamoto T, Yasuhara A. Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere.* 2002;46(8):1215-1223.
43. Yamauchi K, Ishihara A, Fukazawa H, Terao Y. Competitive interactions of chlorinated phenol compounds with 3, 3', 5-triiodothyronine binding to transthyretin: detection of possible thyroid-disrupting chemicals in environmental waste water. *Toxicol Appl Pharm.* 2003;187(2):110-117.
44. William KF, Yeung BH, Wan HT, Wong CK. Early embryogenesis in zebrafish is affected by bisphenol A exposure. *Biol Open.* 2013;BIO20134283.

45. Visser SN et al. Trends in the parent-report of health care provider-diagnosed and medicated attention-deficit/hyperactivity disorder: United States, 2003-2011. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014;53:34–46.
46. Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 5th Edition. Eugene: University of Oregon Press; 2007.
47. IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee. Guidelines for euthanasia of zebrafish, 2013. Disponível em: < <http://www.iacuc.ucsf.edu>>. Acesso em: 15 de maio de 2016.
48. CONCEA – Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/D%C3%A9bora/Downloads/DIRETRIZES%20DA%20PR%C3%81TICA%20DE%20EUTAN%C3%A9SIA%20DO%20CONCEA.pdf> Acesso em: 15 de maio de 2016
49. Ali S, van Mil HG, Richardson MK. Large scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PLoS One*. 2011;6(6).
50. Wilson, C. Aspects of larval rearing. *ILAR J*. 2012;53(2):169-178.

CAPÍTULO 1

Artigo científico: “Compostos bisfenólicos induzem comportamento de hiperatividade ou diminuição de atividade locomotora no desenvolvimento de *zebrafish*” destaca os seguintes pontos:

- Nenhuma alteração na sobrevivência e teratogênese dos embriões e larvas foram detectadas;
- Exposição aos substitutivos BPA, BPS e BPF sugerem mudanças comportamentais, como hiperatividade ou diminuição da atividade locomotora.
- A resposta de escape dos animais não foi afetada significativamente, indicando que possivelmente os compostos bisfenólicos não possui efeitos robustos na cognição das larvas de *zebrafish*.

Compostos bisfenólicos induzem comportamento de hiperatividade ou diminuição de atividade locomotora no desenvolvimento de *zebrafish*

Fonseca RS¹, Vianna MR¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso

Autor correspondente:

Monica Ryff Moreira Roca Vianna

e-mail: monica.vianna@pucrs.br

Avenida Ipiranga, nº 6681, Pd.12, Bloco D, sala 301, Porto Alegre – RS, Brasil.

RESUMO

O bisfenol A (BPA) é uma substância amplamente associada a alterações hormonais que acarretam em mudanças no desenvolvimento específico ao sexo, comportamentos relacionados à ansiedade e aumento da incidência de câncer de mama e próstata. Seus análogos, bisfenol S (BPS) e bisfenol F (BPF), os quais estão sendo utilizados de forma recorrente como substitutivos do BPA, já apresentaram efeitos estrogênicos comparáveis a este, sugerindo a necessidade de se especular o quão seguro são os produtos rotulados “BPA free”. Diferentes estudos avaliaram os efeitos dos bifenois em comportamento de larvas de *zebrafish*, porém não foram esclarecidos os parâmetros de locomoção avaliados, assim como não foi analisada a resposta cognitiva dos animais. Aqui mostramos que os compostos bisfenólicos não causam alteração na sobrevivência, eclosão e morfologia das larvas de 7 dias pós-fertilização (dpf); mas afetam a locomoção de forma significativa e uma alteração na resposta cognitiva dos animais tratados com 10,0 µg/L BPF. Desse modo, é necessário a busca de alternativas para o BPA que sejam testadas de forma correta e com dados suficientes para a convicção na venda de produtos seguros para o consumo humano.

Palavras-chave: Bisfenol. Neurotoxicidade. Locomoção

INTRODUÇÃO

O bisfenol A é um dos disruptores endócrinos mais utilizados na fabricação industrial global [1]. Esta substância é encontrada em policarbonatos e resinas epóxi, os quais são usados na produção de plástico e revestimento de materiais, respectivamente. Logo, o BPA está presente em produtos de consumo diário, como potes, garrafas de plástico, enlatados, tintas, papéis térmicos e diversos outros. Em alguns países, o uso desta substância já foi proibida em mamadeiras e produtos infantis, uma vez que foi comprovado os riscos no início do desenvolvimento [1][2]. Ainda, com a constante produção de resíduos em larga escala, esta substância é liberada em efluentes industriais, municipais e agrícolas, e assim, afetando não só a população humana como ecossistemas inteiros.

Uma das medidas de regulação na circulação do BPA no mercado foi a utilização de compostos alternativos, como o BPS e o BPF [3]. Assim, empresas que aderiram às substâncias análogas colocaram no rótulo de seus produtos “BPA-free” para os consumidores sentirem maior segurança na compra de produtos de plástico; porém, estes compostos não foram testados de forma adequada e de acordo com vários estudos recentes, parecem possuir atividade estrogênica similares ou tão potentes quanto ao do BPA [3][4].

Estudos recentes *in vivo* com *Daphnia magna* detectaram toxicidade aguda do BPS e BPF neste modelo, assim como atividade estrogênica por ligação à receptores; resultados similares também foram encontrados em pesquisas com ratos [5][6]. Neste mesmo modelo, foi observada uma possível correlação na exposição ao BPS e alterações em variáveis cardiovasculares e prejuízos nas funções hematológicas, os quais também foram associados ao composto por causar danos oxidativos [7][8]. Ainda, baixos níveis de BPS e BPF, apresentaram potencial imunotóxico por interrupção na resposta imune de peixes de modo similar a este mesmo organismo quando exposto ao BPA à longo e curto prazo [9][10][11]. Também, não só a sinalização estrogênica, mas a de hormônios tireóideos é afetada pelos compostos análogos, tanto em pesquisas *in vitro* como *in vivo* [12].

Tendo em vista a gama de sistemas e organismos que os compostos bisfenólicos afetam, é necessário um melhor entendimento das possíveis vias que podem ser alteradas, assim como as diferentes fases do desenvolvimento nas quais estas substâncias agem. Diferentes modelos são eficientes para estudar os mecanismos dos disruptores endócrinos, porém o *zebrafish* vem sendo utilizado de forma mais frequente como uma plataforma complementar, visto que, permite avaliações ecotoxicológicas eficazes, assim como a utilização de técnicas inovadoras para estudos *in vivo*, devido ao seu baixo custo e transparência no início do desenvolvimento [13][14]. Adicionalmente, ortólogos para todas as proteínas neuroendócrinas de mamíferos já foram

encontradas em *zebrafish*, o que o torna útil como modelo para estudos de doenças envolvidas na dinâmica dos eixos hipotálamo-pituitária [15][16].

No âmbito de elucidar os parâmetros toxicológicos e comportamentais alterados pela exposição ao BPA, BPS e BPF no início do desenvolvimento e prováveis consequências em fases mais tardias, nós introduzimos estes compostos no meio de embriões de *zebrafish* para avaliação teratogênica, de comportamento exploratório e aversivo e quantificação de expressão gênica e proteínas relacionadas; posteriormente, avaliamos estes mesmos parâmetros na fase adulta do peixe.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Zebrafish adultos da linhagem selvagem AB foram mantidos em uma densidade de 1,5 peixes por litro em um sistema de filtragem em série automatizado (Tecniplast), com um ciclo claro-escuro de 14:10 horas [17]. Os animais foram alimentados três vezes por dia com ração moída e paramécio no início do desenvolvimento e ração flocada e artêmia salina na fase adulta, tendo as condições de temperatura, pH e condutividade da água constantemente monitorados. Os embriões foram obtidos através do cruzamento de matrizes com mais de sete meses de vida; para tanto, os casais foram separados em compartimentos com uma barreira transparente em aquários de reprodução (Tecniplast), as quais foram retiradas na manhã seguinte uma hora após o início do ciclo claro. Os ovos foram coletados e transferidos para placas de 96 poços (embriotoxicidade) ou placas de Petri (comportamento) e mantidos em uma estufa com condições de temperatura e ciclo claro-escuro controlados. A embriotoxicidade dos animais foi observada e registrada diariamente através de estereomicroscópio (Nikon) e pela avaliação de *endpoints* utilizando critérios de letalidade para determinação da taxa de mortalidade, os quais foram: coagulação dos embriões e ausência de circulação sanguínea [18].

Comitê de Ética

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da faculdade (CEUA-PUCRS, número: 7613/17), seguindo a legislação brasileira (nº 11.794/08) e as recomendações do *Canadian Council on Animal Care* [19].

Tratamentos

Os animais foram tratados diariamente no período de 0-3 horas pós-fertilização (hpf) até os 7 dpf com o veículo dimetil sulfóxido (DMSO) 0,1% em água do sistema ou com os compostos bisfenólicos BPA, BPS e BPF (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 0,0001, 0,55 e 1000,0 µg/L; 0,0001, 0,55 e 1000,0 µg/L; e 0,1, 10,0 e 1000,0 µg/L; respectivamente diluídos em veículo. Estas concentrações foram escolhidas de acordo com trabalhos anteriores utilizando animais modelos ou amostras ambientais de meio aquático [20][21][22]. Adicionalmente, um controle absoluto exposto somente à água do sistema (água de osmose reversa equilibrada com sais) foi utilizado apenas para monitorar a qualidade da água, totalizando assim 11 grupos experimentais. Após os tratamentos, os embriões foram armazenados em uma estufa (BOD), onde tiveram condições de luminosidade e temperatura controlados e seus meios de exposição renovados diariamente até os 7 dpf. No término deste período, as larvas foram colocadas em aquários de vidro com água do sistema para crescimento até a fase adulta (4 meses pós-fertilização) e realização de experimentos comportamentais e análises moleculares neste período.

Comportamento locomotor

As larvas de 7 dpf (N=20 em triplicatas) foram colocadas individualmente em placas de 24 poços preenchidas com 3 mL de água do sistema para análise da atividade locomotora em um período de 5 minutos com 1 minuto de aclimação antes do início da filmagem. Os vídeos foram gravados utilizando uma *webcam* digital HD (Logitech) para análise automatizada (Ethovision). Os parâmetros utilizados para avaliação de hiperatividade foram distância percorrida, velocidade média e tempo móvel.

Comportamento aversivo

Após a performance locomotora, as larvas foram mantidas em placas de 6 poços (5 larvas por poço, N=10 em triplicatas), as quais foram colocadas sobre um monitor LCD para avaliação cognitiva através de resposta à um estímulo visual (bola vermelha com efeito móvel) filmado durante um período de 5 minutos com aclimação dos animais de 2 minutos. Este protocolo adaptado de Pelkowski [23] consiste de uma bola vermelha que movimentava-se em um sentido esquerda-direita, direita- esquerda na metade superior do poço (área com estímulo), a qual as larvas tendem a evitar por nadar para a parte inferior do poço sem o estímulo. A porcentagem de larvas na parte sem estímulo durante as sessões de 5 minutos foi parâmetro para avaliação cognitiva dos animais.

Análise estatística

O método estatístico utilizado para a análise da taxa de sobrevivência foi a Curva de Kaplan-Meier. Enquanto que os dados quantitativos dos demais experimentos foram avaliados através de ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

RESULTADOS

Inicialmente, foi realizada uma curva de concentração para escolha da mais adequada a ser utilizada nos experimentos moleculares. Para tanto, os embriões e larvas foram monitorados diariamente até os 7 dpf para realização de análises embriotóxicas, as quais consistiam na avaliação da sobrevivência e teratogênese dos animais. Taxas de sobrevivência e eclosão foram avaliadas através da estimativa de Kaplan-Meier e o teste de Log-rank (Mantel-Cox, $N=48$) foi utilizado para encontrar diferença estatística ao comparar os grupos. Ao ser aplicado o teste nenhuma das concentrações estudadas apresentaram resultados significativos ao serem comparadas com o controle (BPA: $p=0,5825$; BPS: $p=0,5281$; BPF: $p=0,1495$), sendo que todos os grupos permaneceram com sobrevivência acima de 70% (Figura 1), incluindo as concentrações mais altas do BPA (87,5%), BPS (87,5%) e BPF (85,4%). Do mesmo modo, a taxa de eclosão dos compostos bisfenólicos também possuíram proporções equivalentes ao DMSO (BPA: $p=0,5080$; BPS: $p=0,4892$; BPF: $0,2294$), com todos os animais destacando-se do córion com 72 hpf (Figura 2).

Os parâmetros morfológicos analisados nas larvas de 7 dpf ($N=48$) não apresentaram alterações teratogênicas (Figura 3 e Figura 4): as medidas de comprimento corporal (BPA: $p=0,7252$ $F_{(3, 156)}=0,4392$; BPS: $p=0,4913$ $F_{(3, 146)}=0,8081$; BPF: $p=0,1336$ $F_{(3, 157)}=1,889$), área dos olhos (BPA: $p=0,3271$ $F_{(3, 156)}=1,159$; BPS: $p=0,7371$ $F_{(3, 145)}=0,4226$; BPF: $p=0,0545$ $F_{(3, 156)}=2,595$), largura interocular (BPA: $p=0,2758$ $F_{(3, 156)}=1,302$; BPS: $p=0,7339$ $F_{(3, 145)}=0,4270$; BPF: $p=0,2034$ $F_{(3, 156)}=1,552$) e comprimento da cabeça (BPA: $p=0,9819$ $F_{(3, 155)}=0,05732$; BPS: $p=0,9371$ $F_{(3, 143)}=0,1380$; BPF: $p=0,5750$ $F_{(3, 156)}=0,6646$) permaneceram praticamente constantes entre todos os grupos.

Foram realizados testes exploratórios e aversivo em larvas de 7 dpf, considerando que o BPA é um disruptor que causa comportamentos de hiperatividade e sintomas relacionados à ansiedade^{[17][1]}, os quais estão ocorrendo em períodos cada vez mais precoces do desenvolvimento, além de possíveis déficits cognitivos^[18]. A análise da locomoção, realizada através de ANOVA de uma via, apresentou aumento significativo dos parâmetros avaliados nas concentrações intermediárias dos grupos tratados com BPA e BPS com relação ao controle e as concentrações mais baixas (Figura 5), incluindo

distância percorrida (BPA: $p=0,0016$ $F_{(3, 236)}=5,250$; BPF: $p=0,0003$ $F_{(3, 221)}=6,599$), velocidade (BPA: $p=0,0011$ $F_{(3, 236)}=5,511$; BPF: $p=0,0005$ $F_{(3, 221)}=6,145$) e tempo móvel (BPA: $p=0,0001$, $F_{(3, 236)}=9,948$; BPF: $p=0,2455$ $F_{(3, 221)}=1,394$). No tempo móvel, a concentração mais alta do BPA também teve um pequeno aumento de mobilidade com relação ao controle, assim como para a maior concentração do BPF no parâmetro de distância percorrida; entretanto, nos animais tratados com BPF não ocorreu nenhuma diferença estatística no tempo móvel. Ainda, os tratamentos com as menores concentrações de BPF apresentaram uma diferença sutil, porém significativa, na distância percorrida. De forma contraditória, as larvas tratadas com as concentrações mais altas de BPS possuíram uma diminuição significativa nos parâmetros de distância percorrida ($p=0,0002$ $F_{(3, 236)}=6,675$) e velocidade ($p=0,0002$ $F_{(3, 236)}=6,671$) com relação à concentração intermediária e mais baixa. Adicionalmente, essa diferença também abrangiu os animais expostos ao DMSO nas medidas de tempo móvel ($p<0,0001$ $F_{(3, 236)}=7,411$).

Ao contrário de outros dados^[18], quando a resposta de escape a um estímulo aversivo foi avaliada, não foi observado efeito significativo comparado ao controle nos animais tratados com BPA (ANOVA de uma via; $p=0,0626$ $F_{(3, 116)}=2,505$) e BPF ($p=0,0773$ $F_{(3, 84)}=2,359$), porém, o último apresentou diferença na concentração intermediária com relação à mais baixa (Figura 6). Imprevistamente, ao compararmos os grupos tratados com BPS ($p=0,0268$ $F_{(3,116)}=3,176$), a concentração menor teve aumento da resposta de escape contrastando com o DMSO.

DISCUSSÃO

Os compostos bisfenólicos são caracterizados por seus efeitos múltiplos no organismo, como hiperatividade e alterações em comportamento ansiolítico e cognitivo, além de sua toxicidade ser associada à diversas doenças [1][2]. Os substitutivos do BPA, um disruptor amplamente utilizado na indústria, tão pouco parecem ser seguros, uma vez que estudos comprovaram seus efeitos adversos na produção e secreção de testosterona, alterações estrogênicas e na tireóide e mudanças comportamentais, em alguns modelos *in vivo* e *in vitro* [3][12][20].

Os dados avaliando efeitos embriotóxicos retomam as pesquisas realizadas por Chen et al. [21], os quais não observaram alterações significativas na sobrevivência e malformações dos embriões em larvas expostas às baixas concentrações do BPA. Outros estudos porém, apresentaram aumento da mortalidade, assim como na incidência de animais com caudas curvadas em larvas expostas às concentrações altas (10 e 20 μM), além de aumento na taxa de eclosão das larvas em 48 hpf [5][22][25][26]. De forma similar, Ji et al. [4] constatou que BPS também causou alterações morfológicas e na eclosão das larvas em concentrações intermediárias e altas, o que não corrobora

com todos os nossos dados, os quais não verificaram diferença significativa nos parâmetros morfológicos. Com relação ao substitutivo BPF, os resultados que encontramos correspondem parcialmente com os encontrados por Huang et al. [27], visto que neste estudo não foi observada alterações na sobrevivência, embora em concentrações altas (200 µg/L) foram observadas teratogêneses, o que não constatamos mesmo em concentrações mais elevadas (1000 µg/L). Assim, é possível que os dados associados à eclosão em outras pesquisas possam ser em alguns casos inconsistentes devido à diferenças nas metodologias empregadas, uma vez que não é recomendada a utilização de placas de Petri para estudos de toxicidade devido a força mecânica que pode ser aplicada nos animais durante a troca do meio, que por consequência, ocasiona no adiantamento da eclosão. Já nos experimentos com alterações morfológicas e nas taxas de sobrevivência é desafiador comparar os resultados obtidos em outros artigos, dado que, alguns parâmetros como controle da qualidade da água e troca diária do tratamento variam entre laboratórios.

Os resultados comportamentais locomotores, sugerem que as larvas expostas ao BPA e BPF apresentaram perfil semelhante à hiperatividade ou ansiedade e, de forma similar à outros experimentos utilizando desreguladores endócrinos, foi detectada uma curva dose-resposta não-monotônica, na qual as concentrações mais elevadas não acompanham a magnitude dos efeitos observados [28]. Assim como demonstrando neste estudo, Saili et al. [29] detectaram que larvas expostas à baixas concentrações de BPA (0,001 µM E 0,1 µM) causam aumento significativo na atividade locomotora das larvas de *zebrafish*, enquanto concentrações mais elevadas não apresentam o mesmo efeito. Kinch et al. [30] também obteve resultados semelhantes ao medir a locomoção dos grupos tratados com BPA e BPS, porém não esclareceu os parâmetros utilizados, assim como, na representação ilustrativa do caminho percorrido pelo animal, o grupo controle praticamente não se locomoveu, o que pode estar relacionado às placas de 96 poços possuírem espaço reduzido para locomoção dos animais, afetando assim os efeitos comportamentais. De modo conflitante, os dados aqui estudados apresentaram uma diminuição da atividade locomotora das larvas expostas às concentrações mais altas de BPS. Estudos com ratos observaram tanto efeitos relacionados à ansiedade, quanto depressivos, na prole após exposição maternal à BPA e BPF [31], os autores sugerem que o comportamento depressivo pode estar associado à alterações na expressão de genes relacionados ao sistema serotonina-dopamina já constatadas em outras pesquisas, as quais incluem também o BPS [32]. Assim, é possível afirmar que compostos bisfenólicos podem alterar comportamentos relacionados à ansiedade e depressão através de mecanismos de ação ainda não bem elucidados.

Diversos trabalhos com mamíferos apresentaram dados de efeitos de déficits cognitivos após exposição à bisfenóis [33][34][35]. Nossos estudos são os primeiros à realizar avaliação de cognição por meio de estimulação aversiva em larvas de *zebrafish*; com isso, ao avaliarmos a resposta de

escape dos animais os resultados obtidos foram difíceis de interpretar, uma vez que, aparentemente as larvas não responderam ao estímulo aversivo, como nos casos do BPA ou BPS, e quando apresentaram diferença estatística não foi com relação ao grupo controle, e sim com a concentração inferior. É possível que o comportamento utilizado para avaliar a resposta cognitiva do *zebrafish* em estágio inicial não seja robusto o suficiente para observar efeitos similares ao encontrados em mamíferos.

REFERÊNCIAS

- [1] B. S. Rubin, "Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 127, no. 1–2, pp. 27–34, 2011.
- [2] L. N. Vandenberg, I. Chahoud, J. J. Heindel, V. Padmanabhan, F. J. R. Paumgarten, and G. Schoenfelder, "Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A," *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 8, pp. 1055–1070, 2010.
- [3] S. Eladak *et al.*, "A new chapter in the bisphenol a story: Bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound," *Fertil. Steril.*, vol. 103, no. 1, pp. 11–21, 2015.
- [4] J. R. Rochester and A. L. Bolden, "Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes," *Environ. Health Perspect.*, vol. 123, no. 7, pp. 643–650, 2015.
- [5] M. Y. Chen, M. Ike, and M. Fujita, "Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of Chen, M. Y., Ike, M., & Fujita, M. (2002). Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*, 17(1), 80–86.
<http://doi.org/10.1002/tox.10035bisp>," *Environ. Toxicol.*, vol. 17, no. 1, pp. 80–86, 2002.
- [6] K. Yamasaki, S. Noda, N. Imatanaka, and Y. Yakabe, "Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity," *Toxicol. Lett.*, vol. 146, no. 2, pp. 111–120, 2004.
- [7] S. Pal, K. Sarkar, P. P. Nath, M. Mondal, A. Khatun, and G. Paul, "Bisphenol S impairs blood functions and induces cardiovascular risks in rats," *Toxicol. Reports*, vol. 4, no. June, pp. 560–565, 2017.
- [8] D. Tiwari and G. Vanage, "Bisphenol A Induces Oxidative Stress in Bone Marrow Cells, Lymphocytes, and Reproductive Organs of Holtzman Rats," *Int. J. Toxicol.*, vol. 36, no. 2, pp. 142–152, 2017.
- [9] W. Qiu *et al.*, "Immunotoxicity of bisphenol S and F are similar to that of bisphenol A during

- zebrafish early development," *Chemosphere*, vol. 194, pp. 1–8, 2018.
- [10] W. Qiu *et al.*, "Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 130, pp. 93–102, 2016.
- [11] W. Qiu *et al.*, "The potential immune modulatory effect of chronic bisphenol A exposure on gene regulation in male medaka (*Oryzias latipes*) liver," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 130, pp. 146–154, 2016.
- [12] Y.-F. Zhang *et al.*, "Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo," *Environ. Pollut.*, pp. 1–8, 2017.
- [13] D. A. Gorelick and M. E. Halpern, "Visualization of estrogen receptor transcriptional activation in zebrafish," *Endocrinology*, vol. 152, no. 7, pp. 2690–2703, 2011.
- [14] D. A. Gorelick, L. R. Iwanowicz, A. L. Hung, V. S. Blazer, and M. E. Halpern, "Transgenic zebrafish reveal tissue-specific differences in estrogen signaling in response to environmental water samples," *Env. Heal. Perspect*, vol. 122, no. 4, pp. 356–362, 2014.
- [15] H. Löhr and M. Hammerschmidt, "Zebrafish in Endocrine Systems: Recent Advances and Implications for Human Disease," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 183–211, 2011.
- [16] H. Segner, "Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 149, no. 2, pp. 187–195, 2009.
- [17] M. Westerfield, "The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition," *Univ. Oregon Press. Eugene*, 2007.
- [18] H. Hollert, S. Keiter, N. König, M. Rudolf, M. Ulrich, and T. Braunbeck, "A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos," *J. Soils Sediments*, vol. 3, no. 3, pp. 197–207, 2003.
- [19] Canadian Council on Animal Care, "Canadian Council on Animal Care guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing," *Can. Counc. Anim. Care*, pp. 1–94, 2005.
- [20] M. Moreira, S. Aquino, M. Coutrim, J. Silva, and R. Afonso, "Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS)," *Environ. Technol.*, vol. 32, no. 12, pp. 1409–1417, 2011.
- [21] A. Tabata *et al.*, "The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)," *Water Sci. Technol.*, vol. 50, no. 5, pp. 125–132, 2004.

- [22] J. Cano-Nicolau, C. Vaillant, E. Pellegrini, T. D. Charlier, O. Kah, and P. Coumailleau, "Estrogenic effects of several BPA analogs in the developing zebrafish brain," *Front. Neurosci.*, vol. 10, no. MAR, pp. 1–14, 2016.
- [23] S. D. Pelkowski, M. Kapoor, H. A. Richendrfer, X. Wang, R. M. Colwill, and R. Creton, "A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in zebrafish larvae," *Behav. Brain Res.*, vol. 223, no. 1, pp. 135–144, 2011.
- [24] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, p. 45e–45, 2001.
- [25] W. Qiu, Y. Zhao, M. Yang, M. Farajzadeh, C. Pan, and N. L. Wayne, "Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish," *Endocrinology*, vol. 157, no. 2, pp. 636–647, 2016.
- [26] J. H. Kang, D. Aasi, and Y. Katayama, "Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 37, no. 7, pp. 607–625, 2007.
- [27] G. min Huang, X. feng Tian, X. dong Fang, and F. jian Ji, "Waterborne exposure to bisphenol F causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae," *Chemosphere*, vol. 147, pp. 188–194, 2016.
- [28] L. N. Vandenberg, "Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: Bisphenol a as a case study," *Dose-Response*, vol. 12, no. 2, pp. 259–276, 2014.
- [29] K. S. Saili *et al.*, "Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish," vol. 291, pp. 83–92, 2013.
- [30] C. D. Kinch, K. Ibhazehiebo, J.-H. Jeong, H. R. Habibi, and D. M. Kurrasch, "Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 5, pp. 1475–1480, 2015.
- [31] N. Ohtani *et al.*, "Adverse effects of maternal exposure to bisphenol F on the anxiety- and depression-like behavior of offspring," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 79, no. 2, pp. 432–439, 2017.
- [32] B. Castro, P. Sánchez, J. M. Torres, and E. Ortega, "Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5 α -reductase expression and dopamine-serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats," *Environ. Res.*, vol. 142, pp. 281–287, 2015.
- [33] F. Perera *et al.*, "Bisphenol A exposure and symptoms of anxiety and depression among inner city children at 10–12 years of age," *Environ. Res.*, vol. 151, pp. 195–202, 2016.
- [34] R. E. Bowman, V. Luine, S. Diaz Weinstein, H. Khandaker, S. DeWolf, and M. Frankfurt, "Bisphenol-A exposure during adolescence leads to enduring alterations in cognition and

- dendritic spine density in adult male and female rats," *Horm. Behav.*, vol. 69, pp. 89–97, 2015.
- [35] J. D. Elsworth, J. D. Jentsch, S. M. Groman, R. H. Roth, E. D. Redmond, and C. Leranth, "Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys," *J. Comp. Neurol.*, vol. 523, no. 8, pp. 1248–1257, 2015.

Figura 1. Os embriões e as larvas não apresentaram diferença estatística na sobrevivência. Comparação da sobrevivência entre os grupos durante os 7 dpf não apresentou nenhuma diferença significativa dos compostos bisfenólicos e DMSO (Log-Rank (Mantel-Cox), BPA: $p=0,5825$; BPS: $p=0,5281$; BPF: $p=0,1495$; $N=48$).

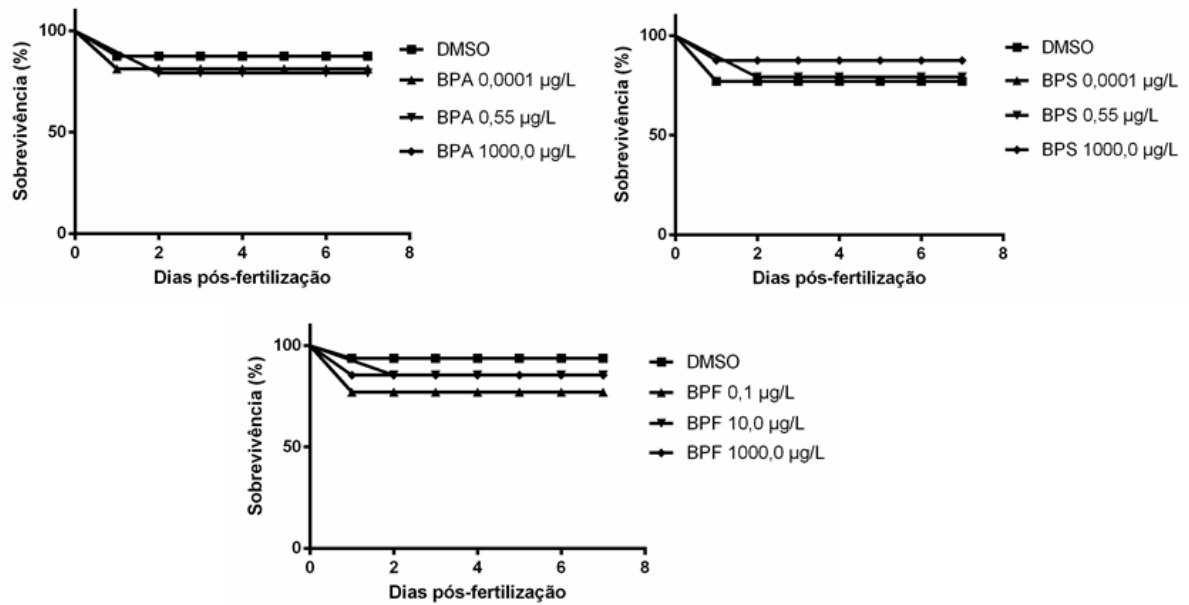


Figura 2. Os animais não tiveram as taxas de eclosão alteradas. Ao serem comparados os grupos entre si não foi observada diferença significativa entre os mesmos (Log-Rank (Mantel-Cox), BPA: $p=0,5080$; BPS: $p=0,4892$; BPF: $p=0,2294$; $N=48$).

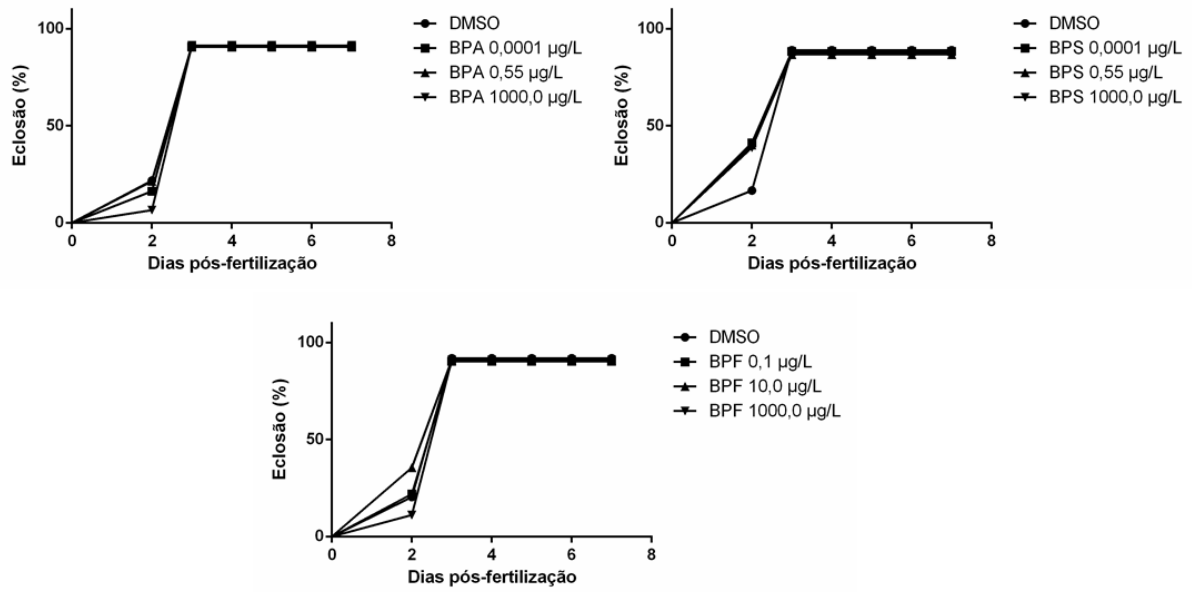


Figura 3. Morfologia não foi alterada nos animais de 7 dpf. ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey demonstrou que o parâmetro de comprimento corporal não foi afetado significativamente (BPA: $p=0,7252$ $F_{(3, 156)}=0,4392$; BPS: $p=0,4913$ $F_{(3, 146)}=0,8081$; BPF: $p=0,1336$ $F_{(3, 157)}=1,889$) pelos compostos bisfenólicos nas larvas de *zebrafish*. Abaixo dos gráficos, imagem da larva de 7 dpf com o delineamento (linha azul) do comprimento corporal. Valores representam média e desvio padrão (SD) (N=16 em triplicatas).

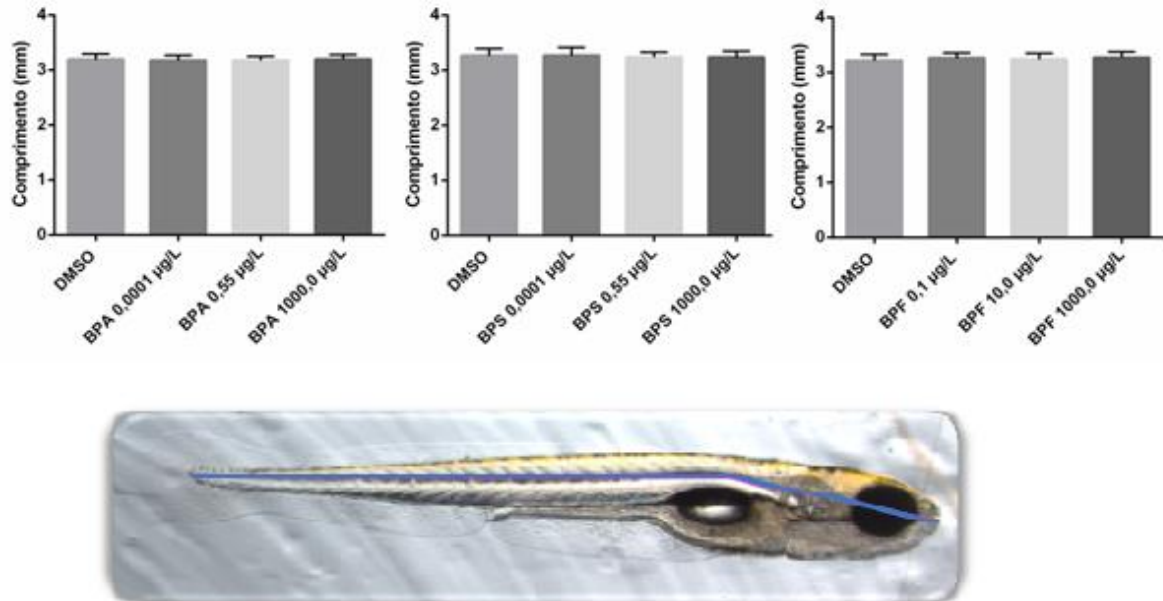


Figura 4. Efeitos fenotípicos não foram observados nas larvas de 7 dpf. ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Tukey não detectou significância estatística nos parâmetros (A) área dos olhos (BPA: $p=0,3271$ $F_{(3, 156)}=1,159$; BPS: $p=0,7371$ $F_{(3, 145)}=0,4226$; BPF: $p=0,0545$ $F_{(3, 156)}=2,595$), (B) largura interocular (BPA: $p=0,2758$ $F_{(3, 156)}=1,302$; BPS: $p=0,7339$ $F_{(3, 145)}=0,4270$; BPF: $p=0,2034$ $F_{(3, 156)}=1,552$) e (C) comprimento da cabeça (BPA: $p=0,9819$ $F_{(3, 155)}=0,05732$; BPS: $p=0,9371$ $F_{(3, 143)}=0,1380$; BPF: $p=0,5750$ $F_{(3, 156)}=0,6646$) nos animais expostos aos

compostos bisfenólicos. Abaixo dos gráficos, imagem de larvas de 7 dpf com o delineamento (linha azul) dos parâmetros avaliados. Valores representam média e SD (N=16 em triplicatas).

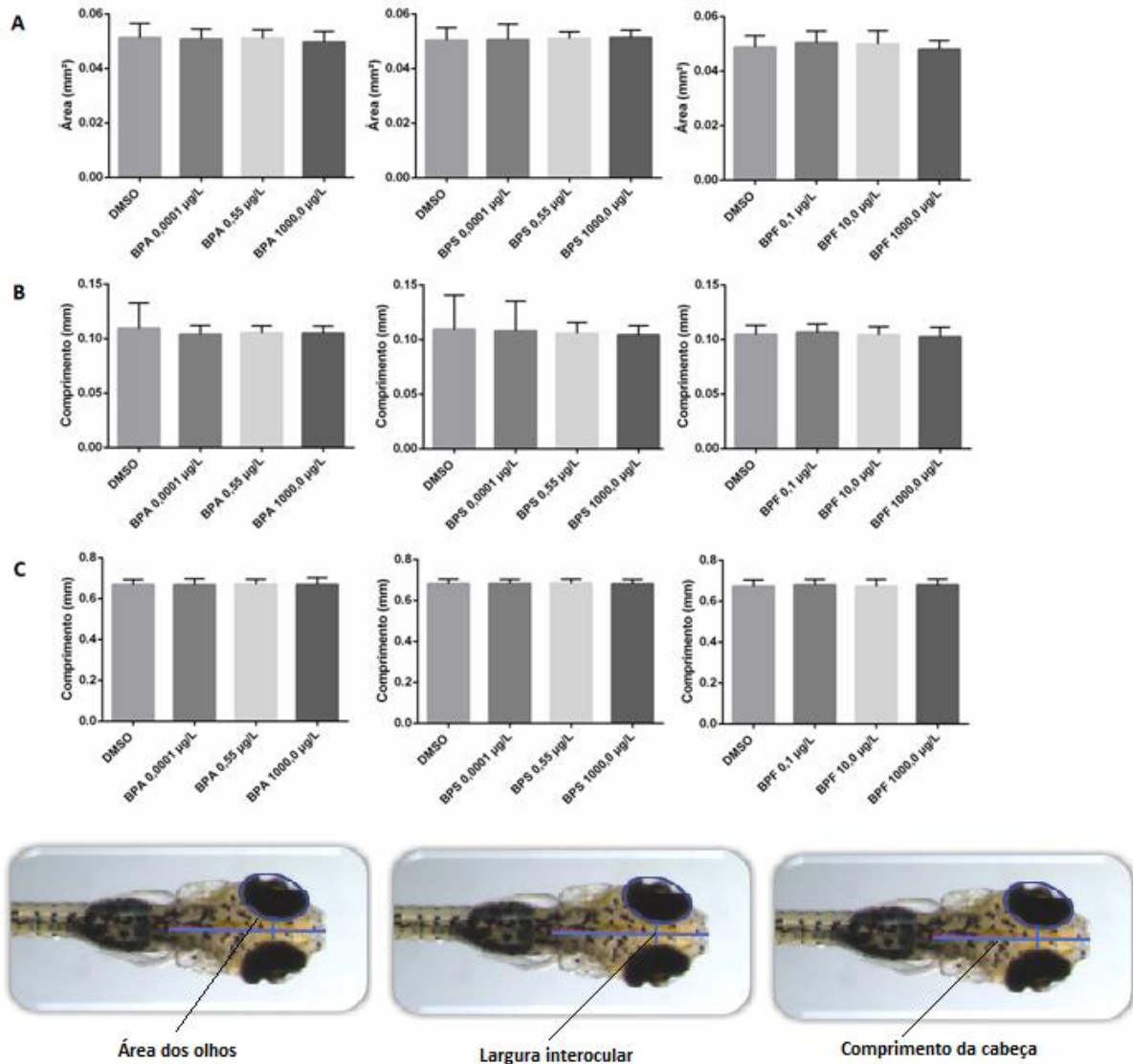


Figura 5. Exposição aos compostos bisfenólicos alteraram a atividade locomotora das larvas de 7 dpf. ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey demonstrou um efeito significativo na (A) distância percorrida (BPA: $p=0,0016$ $F_{(3, 236)}=5,250$; BPS: $p=0,0002$ $F_{(3, 236)}=6,675$; BPF: $p=0,0003$ $F_{(3, 221)}=6,599$), (B) velocidade (BPA: $p=0,0011$ $F_{(3,236)}=5,511$; BPS: $p=0,0002$ $F_{(3, 236)}=6,671$; BPF: $p=0,0005$ $F_{(3, 221)}=6,145$) e (C) tempo móvel (BPA: $p=0<0001$, $F_{(3, 236)}=9,948$; BPS: $p<0,0001$ $F_{(3, 236)}=7,411$; BPF: $p=0,2455$ $F_{(3, 221)}=1,394$) das larvas. Os animais expostos ao BPA e BPF apresentaram aumento significativo na atividade locomotora nas concentrações intermediárias se comparado ao veículo, enquanto a concentração mais alta do BPS causou diminuição da locomoção nestes mesmos parâmetros avaliados. Valores representam média e SD (N=20 em triplicatas). A quantidade de letras ou * indicam o valor de p : * $p<0,05$, ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$. *, a e b, simbolizam a comparação com DMSO, concentrações mas baixas e concentração intermediárias, respectivamente.

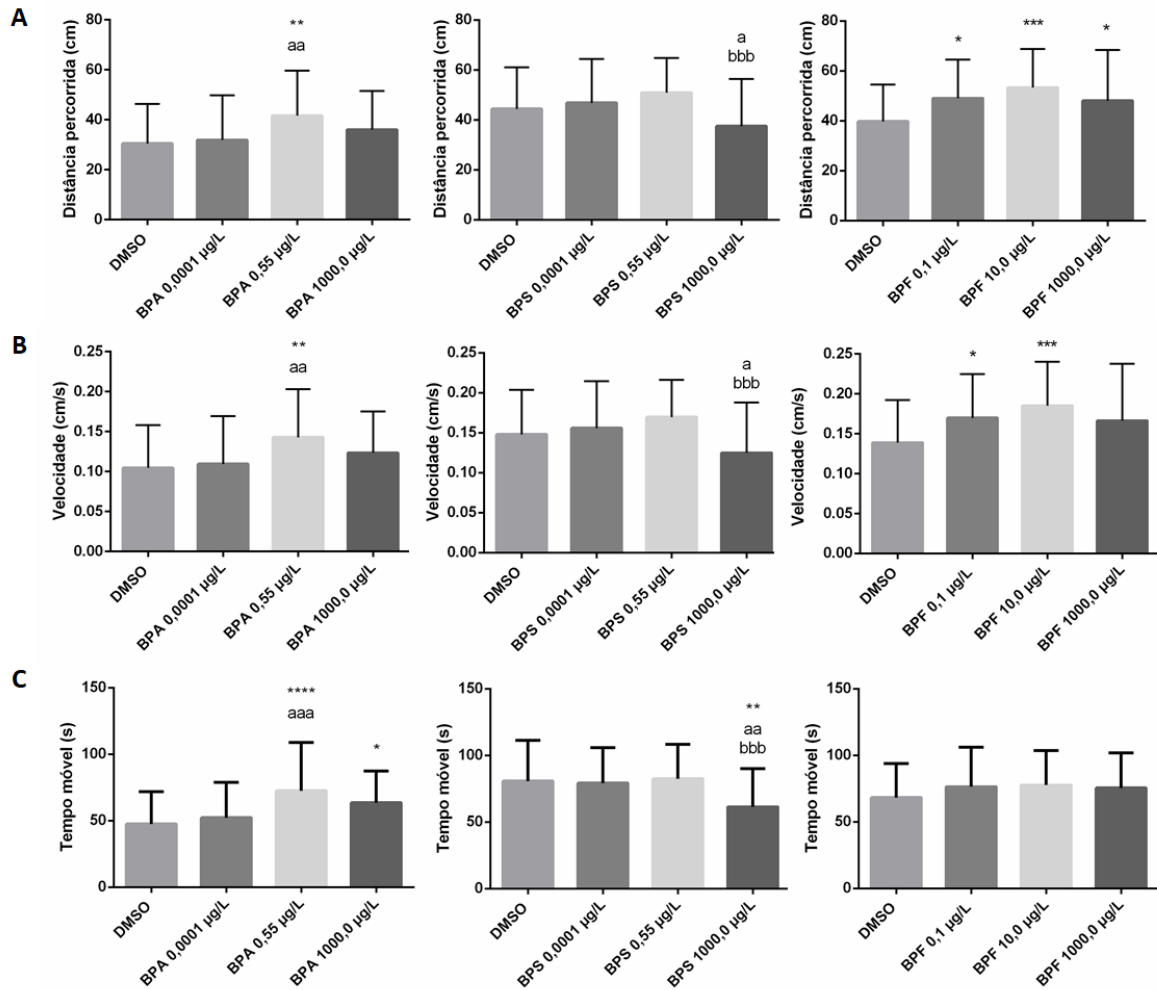
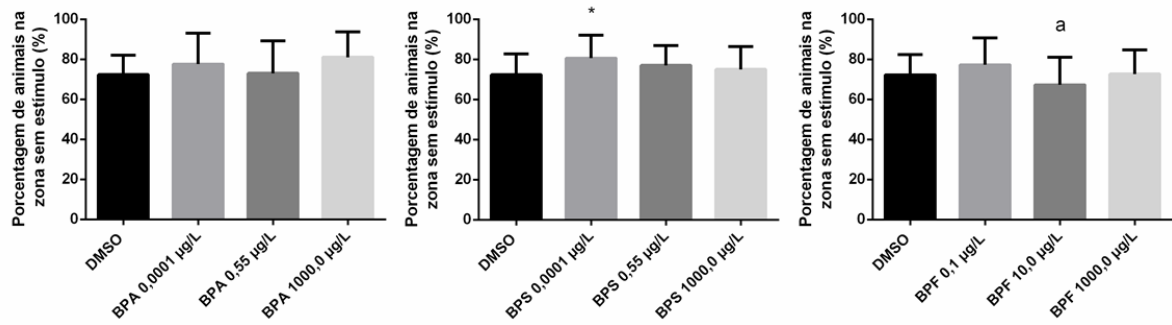


Figura 6. Efeitos cognitivos não foram robustos nos grupos tratados com compostos bisfenólicos. A porcentagem de animais na área sem estímulo não foi alterada nos grupos tratados com BPA ($p=0,0626$ $F_{(3, 116)}=2,505$) ao utilizarmos ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey para análise estatística. As larvas expostas ao BPS e BPF apresentaram diferença significativa, porém não foram associadas a prejuízo cognitivo ($p=0,0268$ $F_{(3,116)}=3,176$) ou comparado ao DMSO ($p=0,0773$ $F_{(3, 84)}=2,359$), respectivamente. Valores representam média e SD (N=10 em triplicatas). A quantidade de letras ou * indicam o valor de p: * $p<0,05$, ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$. *, a e b, simbolizam a comparação com DMSO, concentrações mas baixas e concentrações intermediárias, respectivamente.



CAPÍTULO 2

Considerações gerais acerca do projeto de pesquisa, incluindo uma visão ampla dos resultados obtidos nos experimentos e contradições destes com outros dados analisados por outros autores sobre os parâmetros aqui estudados.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o presente trabalho, é possível constatar os efeitos do bisfenol A, S e F no comportamento locomotor de embriões e larvas de *zebrafish*, além de permitir a verificação da embriotoxicidade dos mesmos, os quais não condizem com alguns dos resultados encontrados em outros trabalhos utilizando peixes como modelo, fazendo com que a confiabilidade dos dados, o desenho experimental ou técnicas laboratoriais sejam questionadas. Assim, neste estudo concluiu-se, com relação aos efeitos embriotóxicos dos compostos estudados, que o BPA, BPS e BPF, tanto em concentrações baixas, intermediárias ou altas, não acarretam em alterações nas taxas de sobrevivência, eclosão ou teratogênese durante o desenvolvimento de embriões e larvas de *zebrafish*.

As alterações locomotoras observadas nos animais refletiram possíveis efeitos neurotóxicos dos compostos bisfenólicos em comportamentos hiperativos ou relacionados à ansiedade, e até mesmo depressivos. Os resultados observados aqui, tão bem como os citados acima, foram conflitantes quando comparados com outros estudos também realizados em *zebrafish*, o que provavelmente pode estar relacionado à falhas técnicas, de forma similar às avaliações embriotóxicas. Entretanto, é viável que diversas rotas de ação ainda não bem elucidadas possam estar afetando os animais individualmente, através de parâmetros que talvez não sejam controlados experimentalmente até então.

Com relação ao comportamento aversivo, os resultados foram contraditórios com algumas pesquisas e concordantes com outras. Porém, respostas cognitivas durante a fase larval de *zebrafish* nem sempre são robustas, podendo em alguns casos serem limitadas, dado que o repertório comportamental neste período do desenvolvimento não é muito diverso se comparado com adultos, por exemplo. Logo, os dados descritos aqui associados à resposta cognitiva podem ser considerados desafiadores para interpretação.

Ainda, os resultados averiguados neste trabalho serão complementados com dados provenientes de experimentos comportamentais e moleculares realizados com animais adultos, os quais já estão em crescimento, para verificar possíveis efeitos dos compostos estudados em fases posteriores do desenvolvimento. As larvas utilizadas nos testes embriotóxicos e comportamentais tiveram seus encéfalos dissecados para realização de *Western blotting* e qPCR-RT, o que permitirão a quantificação das proteínas TTR, vitelogenina, p53 e capase-3 e os genes da vitelogenina, aromatase B, TTR, p53, bax e appb, para elucidação de possíveis mecanismos de disrupção endócrina e neurotoxicidade durante o desenvolvimento embrionário e larval propostos inicialmente no projeto.