

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Determinação *in vitro* da toxicidade oral aguda do Bisfenol A pelo  
ensaio de vermelho neutro**

**Heloísa de Matos Trinca**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Bacharela e Licenciada em Ciências  
Biológicas

**Piracicaba - SP  
2020**

**Heloísa de Matos Trinca**

**Determinação *in vitro* da toxicidade oral aguda do Bisfenol A pelo ensaio de vermelho neutro**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **TSAI SIU MUI**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

**Piracicaba - SP  
2020**





## AGRADECIMENTOS

À professora Tsai Siu Mui, pela confiança em mim depositada e a orientação deste trabalho.

À Mônica Yonashiro Marcelino, por toda a dedicação, paciência, coorientação, horas de trabalho e amizade.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA/USP e toda a equipe.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão do fomento que possibilitou a dedicação a esse estudo.

Aos meus pais e meu irmão, por todo o incentivo, apoio, confiança e amor.

Aos meus amigos, pelos momentos leves e descontraídos e todo o apoio necessário.

Às minhas parceiras de graduação e amigas que fiz para a vida, Eloísa, Isabelle e Lâina. Vocês são os melhores presentes que a ESALQ me proporcionou!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Cultura de células .....	10
1.2 Métodos alternativos ao uso de animais.....	11
1.3 Método OCDE TG 129.....	12
1.4 Bisfenol A.....	13
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
2.1 Cultura celular.....	16
2.2 Teste de detecção de Mycoplasma .....	16
2.3 Teste de solubilidade do Bisfenol A.....	18
2.4 Teste de Vermelho Neutro.....	19
2.4.1 Range Finder.....	19
2.4.2 Teste Principal.....	20
2.5 Cálculo do IC50 e LD50.....	21
3 RESULTADOS .....	23
3.1 Cultura celular.....	23
3.2 Detecção de Mycoplasma.....	24
3.3 Solubilidade do Bisfenol A .....	24
3.4 Ensaio de Vermelho Neutro.....	25
3.4.1 Range Finder.....	25
3.4.2 Teste Principal.....	26
4 DISCUSSÃO .....	29
5 CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS .....	32

## RESUMO

### **Determinação *in vitro* da toxicidade oral aguda do Bisfenol A pelo ensaio de vermelho neutro**

O cultivo celular é um método alternativo ao uso de animais amplamente utilizado a fim de se estudar os mecanismos e respostas celulares *in vitro*, correlacionando e fornecendo dados preliminares para experimentos *in vivo*. O teste de citotoxicidade pelo ensaio de vermelho neutro tem por finalidade estimar a dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica *in vivo*, sendo validado por agências internacionais como a OCDE em seu protocolo intitulado “Documento guia para testes de citotoxicidade para estimar doses iniciais de toxicidade sistêmica aguda oral”. Dessa forma, este estudo baseou-se neste protocolo da OCDE para investigar a citotoxicidade do bisfenol A, um composto sintético vastamente utilizado na indústria de polímeros e reconhecido como um desregulador endócrino, com muitos efeitos adversos à saúde humana relacionado a sua exposição. Foi cultivada a linhagem celular 3T3 – Swiss albino em meio DMEM High Glucose sem phenol red suplementado com 10% de soro fetal bovino. A cultura celular foi exposta ao bisfenol A por 48h e posteriormente corada com vermelho neutro, medindo a absorbância em espectrofotômetro. O valor encontrado para o IC<sub>50</sub> do bisfenol A em cultura celular foi 9 µg/mL, sendo possível predizer a dose letal mediana (LD<sub>50</sub>) para experimentos *in vivo* como 2025mg/kg.

Palavras-chave: Citotoxicidade, desregulador endócrino, IC<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>

## ABSTRACT

### **In vitro determination of acute oral toxicity of Bisphenol A by neutral red uptake assay**

Widely used to study *in vitro* cellular mechanisms and responses, cell culture is an alternative method to animals testing, correlating and providing preliminary data for *in vivo* experiments. The purpose of the cytotoxicity test by the neutral red uptake assay is to estimate the initial dose for *in vivo* systemic acute oral toxicity test, being validated by international agencies such as the OECD in its protocol entitled "Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests". Thus, this study was based on this OECD protocol to investigate the cytotoxicity of bisphenol A, a synthetic compound largely used in the polymer industry and recognized as an endocrine disruptor, with many adverse effects on human health related to its exposure. The 3T3 - Swiss albino cell line was cultured in DMEM High Glucose medium without phenol red, supplemented with 10% fetal bovine serum. The cell culture was exposed to bisphenol A for 48 hours and then stained with neutral red dye, and measured the absorbance in a spectrophotometer. The value found for the IC<sub>50</sub> of bisphenol A in cell culture was 9 µg/mL, predicting the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) for *in vivo* experiments as 2025 mg/kg.

Keywords: Cytotoxicity, endocrine disruptor, IC<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama para determinação da solubilidade da substância teste .....	18
Figura 2 - Configuração da placa de 96 poços .....	21
Figura 3 - Monocamada de células 3T3 – Swiss albino após 72h de expansão .....	23
Figura 4 - Gel de agarose após eletroforese para detecção de Mycoplasma .....	24
Figura 5 - Gráfico do IC <sub>50</sub> do teste Range Finder .....	25
Figura 6 - Citotoxicidade do Bisfenol A e SDS pelo ensaio de vermelho neutro .....	26
Figura 7 - Cultura celular controle (sem BPA) corada com vermelho neutro após 48h em meio de cultura.....	27
Figura 8 - Cultura celular corada com vermelho neutro após 48h de exposição ao BPA .....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações do Bisfenol A utilizadas no teste principal.....	26
Tabela 2 - Valores da média do IC50 .....	27

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA	Bisfenol A
CN	Controle negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Controle positivo
CV	Controle do veículo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
IC50	Metade da concentração inibitória máxima
LD50	Dose letal mediana
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PBS	Phosphate Buffered Saline
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
VN	Vermelho Neutro

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Cultura de células

A cultura de células é um método bem estabelecido e uma ferramenta indispensável na investigação e pesquisa básica e aplicada em biologia celular e molecular, fisiologia, biotecnologia e medicina. O cultivo celular é amplamente utilizado a fim de se estudar os mecanismos e respostas celulares que ocorrem *in vivo*, assim como o mapeamento e compreensão dos mecanismos biofísicos e biomoleculares e, em função de sua grande utilidade e sua forma relativamente simples de cultivo, baixo custo e altamente produtiva, o cultivo de células se tornou um importante aliado de estudos básicos e clínicos na área de medicina, desenvolvimento de medicamentos e estudos de toxicidade. (AOKI *et al.*, 2016; DUVAL *et al.*, 2017; YAO; ASAYAMA, 2017).

O método permite controlar o ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica e a concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e as condições fisiológicas, como presença de hormônios e fatores de crescimento, que podem ser mantidas relativamente constantes, embora haja discrepância entre a cinética celular *in vitro* e *in vivo*, devido a restrições na reprodutibilidade de um microambiente artificial idêntico ao ambiente fisiológico natural. (AOKI *et al.*, 2016; DUVAL *et al.*, 2017; FRESHNEY, 2005; YAO; ASAYAMA, 2017).

Para a metodologia ideal é necessário utilizar parâmetros que garantam o controle de qualidade das culturas e dos ensaios, assim como as boas práticas de cultura celular e boas práticas de laboratório (PAMIES *et al.*, 2018). A escolha do meio de cultura que será utilizado para cada linhagem se deve ao fato de que cada tipo celular requer elementos nutricionais diferentes e esses serão fornecidos através do meio de cultura e suplementos. Além disso, o meio deve fornecer as condições ideais de pH e osmolaridade para que, juntamente com o ambiente físico que permite a aderência celular, etapa essencial para o estabelecimento de uma cultura em monocamada, esta possa se fixar e desenvolver, garantindo um bom nível de confluência e conseqüentemente maiores chances de sucesso (BAUST *et al.*, 2017).

Assim, a fim de se garantir a padronização, robustez e a reprodutibilidade dos testes *in vitro*, protocolos e documentos de boas práticas de culturas celulares e métodos *in vitro* foram estabelecidos ao longo do tempo e, a nível internacional, o

documento da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OCDE, intitulado de “Guidance Document on Good *In vitro* Method Practices” tem caráter orientativo e protocolos rigorosos descrevendo cada etapa, visando o desenvolvimento de métodos de teste, a padronização, a confiabilidade, a validação e aceitação internacional, para que possam ser utilizados como documentos regulatórios (ESKES *et al.*, 2017).

## 1.2. Métodos alternativos ao uso de animais

Em 1959 foi apresentado o princípio dos 3R's no livro “The Principles of Humane Experimental Technique”, de William Russel e Rex Burch, que abordou sobre a ética do uso de animais em pesquisas. Neste livro, três capítulos foram destinados à explicação e exemplificação de cada um dos 3R's, sendo eles: substituição (Replacement), redução (Reduction) e refinamento (Refinement). De maneira simplificada, este princípio significa uma redução no número de animais empregados em procedimentos experimentais na pesquisa científica, aprimoramento dos métodos já existentes para a diminuição do sofrimento ao mínimo possível e busca por métodos alternativos que substituam sempre que possível os ensaios *in vivo* com mamíferos e a garantia do bem-estar animal (HARTUNG, 2011; BURM *et al.*, 2014; AVEY *et al.*, 2015; ESTEVES-PEDRO *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2019).

Buscando a padronização de métodos com o propósito de seguir os 3R's, a OCDE, uma organização internacional atuante há quase 60 anos no estabelecimento de normas internacionais, tem como uma de suas diretrizes os métodos alternativos ao uso de mamíferos. As Diretrizes da OCDE são aceitas internacionalmente como métodos padrão para testes de segurança, como o Teste de Produtos Químicos, que é uma ferramenta exclusiva para avaliar os efeitos potenciais de produtos químicos na saúde humana e no meio ambiente.

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação do uso de animais na pesquisa e educação e pela definição das diretrizes éticas, monitoramento e avaliação de técnicas alternativas que substituam o uso de animais é o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, que foi instituído com a aprovação da Lei Arouca, em 2008.

Por sua vez, o Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM - Brazilian Center for Validation of Alternative Methods) é responsável por validar métodos alternativos ao uso de animais na experimentação e na educação no

Brasil que, ao receber uma demanda, analisará e encaminhará a solicitação ao Conselho Diretor da RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais) que identificará quais laboratórios poderão participar e executar o processo de validação (FIOCRUZ). De acordo com a resolução normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014, art. 5º, inciso III, da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, são reconhecidos atualmente, 17 métodos alternativos para o uso de animais pelo CONCEA.

A partir do princípio dos 3R's, vários métodos alternativos ao uso de animais foram surgindo e, entre eles, os modelos de cultivo celular para testes *in vitro*, utilizado para correlacionar e fornecer dados preliminares para experimentos *in vivo*. Além da redução e substituição de animais experimentais, ensaios *in vitro* são experimentos com condições controladas, normalmente mais rápidos, com menor custo e apresentam menor variabilidade entre replicas, já que podem ser reproduzidos mais facilmente (ESTEVEZ-PEDRO et al., 2018; KIM et al., 2019)

Recentemente têm se expandido o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos para ensaios de toxicidade, como substituições dos testes de irritabilidade dérmica e de toxicidade sistêmica aguda pelo ensaio de vermelho neutro. Assim, a necessidade de animais experimentais é reduzida e os testes são melhores delineados para seu uso, substituindo experimentos antiéticos ou que possam causar sofrimento, dor e mal-estar aos animais (KIM et al., 2019).

### 1.3. Método OCDE TG 129

O documento **“Guia para testes de citotoxicidade para estimar doses iniciais de toxicidade sistêmica aguda oral”** é um ensaio *in vitro* que tem por finalidade estimar a dose inicial para teste de toxicidade aguda oral *in vivo*, por meio da avaliação de citotoxicidade pelo corante supravital vermelho neutro (VN). Esse composto é um corante catiônico fraco que penetra membranas celulares e se concentra no interior dos lisossomos, onde um gradiente de prótons garante um pH mais ácido, permitindo a ligação do corante com grupos fosfato e aniônicos da matriz lisossomal (ATES et al., 2017).

Esse procedimento é baseado na capacidade da célula em absorver e incorporar o VN em seus lisossomos. Os compostos tóxicos podem alterar a membrana celular e do lisossomo, causando mudanças adversas, o que pode inibir o crescimento celular ou levá-la a morte, reduzindo a quantidade de corante VN que é

retido pela cultura. Assim, esse teste expressa a toxicidade celular como uma redução dependente da concentração do vermelho neutro após a exposição das mesmas à substância teste, pois quanto menor for a concentração do corante, maior é a quantidade de células inviáveis e mortas, ou seja, afetadas pelo composto teste.

Esse método é recomendado para consideração de rotina antes do uso de ratos para estudos de toxicidade aguda por agências reguladoras e de saúde pública dos EUA (ICCVAM, 2006). Assim, o teste do VN preconiza a não utilização de animais experimentais para estabelecer as doses iniciais de toxicidade aguda oral e pode reduzir o número de animais requeridos para futuros testes em até 50% (ICCVAM, 2006).

#### 1.4. Bisfenol A

O bisfenol A (4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano ou 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano), (CAS 80-05-7) é um composto sintético muito utilizado na indústria, principalmente na produção de polímeros (policarbonato, resinas epóxi, polisulfonas e outros) como garrafas plásticas, garrações retornáveis de água, revestimentos de comidas e bebidas enlatadas, mamadeiras e equipamentos esportivos, uma vez que apresenta alta transparência e resistências térmica e mecânica (ANVISA).

O BPA é um composto análogo ao estrógeno, com estrutura química muito semelhante ao 17- $\beta$ -estradiol e devido a isso acredita-se que esta substância manifesta efeitos de desregulador endócrino, interagindo com vários receptores, tais como o receptor de estrogênio e androgênio, podendo modificar respostas celulares, e assim causar efeitos adversos (WELSHONS et al. 2006; VANDENBERG et al., 2007; CAVALIERI & ROGAN, 2010; MA et al. 2019). Além disso, possíveis efeitos na saúde humana foram relacionados com a exposição ao bisfenol A, tais como maiores taxas de obesidade em mulheres, síndrome do ovário policístico, implicações na fertilidade, influências no sistema imunológico e influências no desenvolvimento, diferenciação e função do sistema nervoso central (VANDENBERG *et al.* 2007; WETHERILL *et al.* 2007; MA *et al.* 2019). O bisfenol A é ingerido pelo consumo de produtos citados anteriormente e é relacionado com potenciais efeitos carcinogênicos, podendo ocasionar câncer de mama, de ovário, útero, câncer de próstata, testículo, entre outros (WETHERILL *et al.*, 2007; PTAK *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2019).

Em alguns países como Dinamarca, Canadá e Estados Unidos da América o emprego do bisfenol A foi proibido. A importação e fabricação de produtos infantis que

contenham bisfenol A, como mamadeiras, foram proibidas inclusive no Brasil (ANVISA). Contudo, esta substância ainda continua sendo amplamente utilizada.

Estudos de biomonitoramento feitos pelo The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) entre 2003 e 2004 e conduzido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) avaliaram 2517 amostras de urina da população dos Estados Unidos da América acima de 6 anos, mostrando que 93% delas continham níveis detectáveis de bisfenol A. Os valores nos níveis de bisfenol A duplicaram desde o estudo feito entre 1988 e 1994 pela mesma instituição. Os novos dados mostraram que a substância estava presente em pessoas do mundo todo e sendo encontrado além da urina, no leite materno, soro de mulheres grávidas, sangue do cordão umbilical e outros, indicando uma maior exposição dos humanos ao bisfenol A (WELSHONS *et al.*, 2006; CALAFAT *et al.*, 2007; SHELBY, 2008; MA *et al.*, 2019).

De acordo com Welshons *et al.* (2006), a preocupação com a exposição ao bisfenol A se dá por três fatores: “1) identificação de mecanismos moleculares mediadores de efeitos em tecidos humanos e animais a doses muito baixas, 2) efeitos *in vivo* em animais experimentais causados por doses baixas dentro da faixa de exposição humana e 3) exposição humana generalizada a níveis de bisfenol A que causam efeitos adversos em animais”. Todos os fatores são baseados nas informações de que mesmo em doses muito baixas, o bisfenol A é capaz de estimular respostas celulares adversas.

Em seu estudo, Kim *et al.* (2018) demonstraram que concentrações submicromolar do BPA podem promover proliferação celular em hepatócitos, que estão associados com danos ao DNA. Essa proliferação celular induzida por baixas doses de BPA pode indicar um risco potencial para o desenvolvimento de câncer no fígado. Filippis *et al.* (2018) mostrou que doses baixas, mas ambientalmente relevantes de BPA podem afetar a sensibilidade à insulina do tecido adiposo devido ao desenvolvimento de um estado inflamatório crônico de baixo grau, diminuindo a taxa de captação de glicose e sugerindo que o BPA pode contribuir para o desenvolvimento da diabetes e obesidade.

Efeitos no ambiente relacionados ao BPA também foram demonstrados. Cano-Nicolau *et al.* (2016) utilizaram em seu estudo o peixe-zebra, um organismo modelo e muito estudado, a fim de analisar os potenciais estrogênicos de alguns tipos de bisfenóis, incluindo o bisfenol A. Foi demonstrado no estudo que o BPA ativa significativamente a expressão do gene *cyp10a1b* (aromatase B), um gene específico

do cérebro e considerado um dos mais sensíveis para estrogênio em peixes. Essa atividade estrogênica pode desencadear um desenvolvimento embriológico anormal do peixe-zebra, mais especificamente do sistema nervoso, afetando todo o desenvolvimento. Portanto, a exposição ao BPA também pode causar efeitos nocivos em organismos aquáticos, sendo um preocupante poluente desse ecossistema (REDDY *et al.*, 2018). Em outros estudos, doses significativas de BPA no ambiente causaram inibição da maturação do oócito do peixe-zebra por meio de uma via de sinalização de estrogênio não-genômica, sugerindo que o bisfenol A também pode agir sob mecanismos epigenéticos, através de modificações nas histonas e alterações na metilação do DNA (FITZGERALD *et al.*, 2015; BAMBINO; CHU, 2017; REDDY *et al.*, 2018).

Em relação ao efeito do bisfenol A em plantas, Jiao *et al.* (2014) observaram que a exposição de mudas de soja a baixa dosagem de BPA (1,5mg/L) promoveu a biossíntese de clorofila através do aumento da atividade de enzimas-chave. Já em dosagem alta (17,3mg/L e 50mg/L), as mudas de soja expostas ao bisfenol A apresentaram redução significativa da biossíntese de clorofila, por meio da diminuição da atividade de enzimas-chave. Da mesma forma, Kim *et al.* (2018) avaliaram a toxicidade do BPA no solo de feijão mungu, observando que concentrações mais altas afetaram a quantidade de clorofila e a capacidade fotossintética, inibindo o crescimento do caule e o desenvolvimento da raiz por consequência, assim como uma influência no tamanho da abertura estomática da planta.

Doses elevadas do bisfenol A podem ter efeitos adversos no organismo, porém, este estudo busca identificar doses iniciais de toxicidade oral aguda a partir de experimentos *in vitro*, seguindo o protocolo de segurança preconizado por agências internacionais e aceitas pela legislação do Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e CONCEA. Apesar de existirem resultados na literatura sobre a toxicidade do bisfenol A, não há informações sobre ensaios realizados seguindo as normas da OCDE.

Sendo assim, o objetivo desse estudo será de padronizar no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (BIOCEMOL) – CENA/USP, o protocolo número 129 da Agência Internacional OCDE, intitulado “Documento guia para testes de citotoxicidade para estimar doses iniciais de toxicidade sistêmica aguda oral”, sendo a substância teste o bisfenol A.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, da Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. Neste estudo não foi utilizado nenhum animal ou gerado quaisquer resíduos químicos com impacto ao ambiente, não sendo necessário um parecer da Comissão de Ética para sua realização.

## 2.1. Cultura celular

A linhagem celular utilizada neste estudo foi a 3T3 – Swiss albino (ATCC® CCL-92™), as quais foram adquiridas e cedidas pelo Professor Rondinelli Donizetti Herculano, do Laboratório de Bioengenharia e Biomateriais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara (SP). As células foram cultivadas seguindo metodologia preconizada pelo banco de células da ATCC (American Type Culture Collection) conjuntamente com o direcionamento do protocolo N°129 da OCDE. Os viais criopreservados contendo  $1 \times 10^6$  células/mL foram descongelados em banho-maria a 37°C. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 1.200 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1mL de meio de cultura DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium - GIBCO, 11995-065) sem phenol red, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, F7524). Foram plaqueadas  $4 \times 10^5$  células/mL em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> com 10mL do mesmo meio de cultura descrito e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com troca de meio de cultura e observações ao microscópio invertido a cada 72 horas.

Após atingirem confluência de aproximadamente 80% (72 horas), a passagem das células foi conduzida utilizando-se TrypLE™ Express (GIBCO, 12604-021) durante 5 minutos a 37°C. Subsequentemente, estas foram centrifugadas a 1.200 RPM por 5 minutos para remoção do TrypLE™ Express e contadas em câmara de Neubauer para o teste de viabilidade com azul de tripan 0,4%. Esse corante é utilizado para estimar a proporção de células viáveis e não viáveis em uma população, já que ele reage e colore de azul as células que estejam com a membrana danificada, ou seja, inviáveis. Assim, facilita a visualização das células e sua morfologia e distingue-as entre vivas e mortas.

Após a verificação da viabilidade, as células foram subcultivadas ou então criopreservadas em nitrogênio líquido em solução de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e soro fetal bovino, na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL.

## 2.2. Teste de detecção de *Mycoplasma*

*Mycoplasma* é um gênero de bactérias de fácil proliferação em cultura celular. Por conta disso, a sua contaminação causa grandes danos ao experimento e análises, podendo causar variações adversas nas células e induzir a falsos resultados. Assim, sempre deve ser realizado o teste de *Mycoplasma* anteriormente ao início do experimento para garantia de segurança e esterilidade.

A detecção da bactéria *Mycoplasma* (classe Mollicutes) foi realizada utilizando-se do kit Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit (Sigma-Aldrich, MP0025) com a cultura celular já estabilizada em meio DMEM High Glucose sem phenol red, suplementado com 10% de soro fetal bovino, cultivadas na ausência de antibióticos e antimicóticos por pelo menos 2 passagens. Esse teste emprega a reação em cadeia da polimerase (PCR) como o método de maior sensibilidade na detecção de contaminação por *Mycoplasma* e *Acholeplasma* em culturas celulares.

Para o método de PCR, as amostras do sobrenadante do cultivo celular foram aliqüotadas anteriormente ao processo de tripsinização das células e posteriormente transferido 100µL para um microtubo de centrifugação estéril. As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e rapidamente centrifugadas (5 segundos). Adicionou-se 2µL das amostras do sobrenadante no microtubo contendo o Mastermix. Para o preparo do MasterMix adicionou-se, para cada amostra, 13,8µL de água deionizada (DNA free), 2,5µL de solução tampão de PCR 10x (reaction buffer), 2,5µL de primer/mix de nucleotídeos, 2,5µL de controle interno, 1,5µL de cloreto de magnésio 50 mM (Invitrogen™ - Número de Catálogo: 10966-020) e 0,2µL de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen - Número de Catálogo: 10966-020). Além das amostras do sobrenadante, o mix da reação também foi utilizado para o controle negativo e controle positivo.

As amostras foram levadas para reação no Termociclador, o qual o programa do ciclo térmico compreendeu:

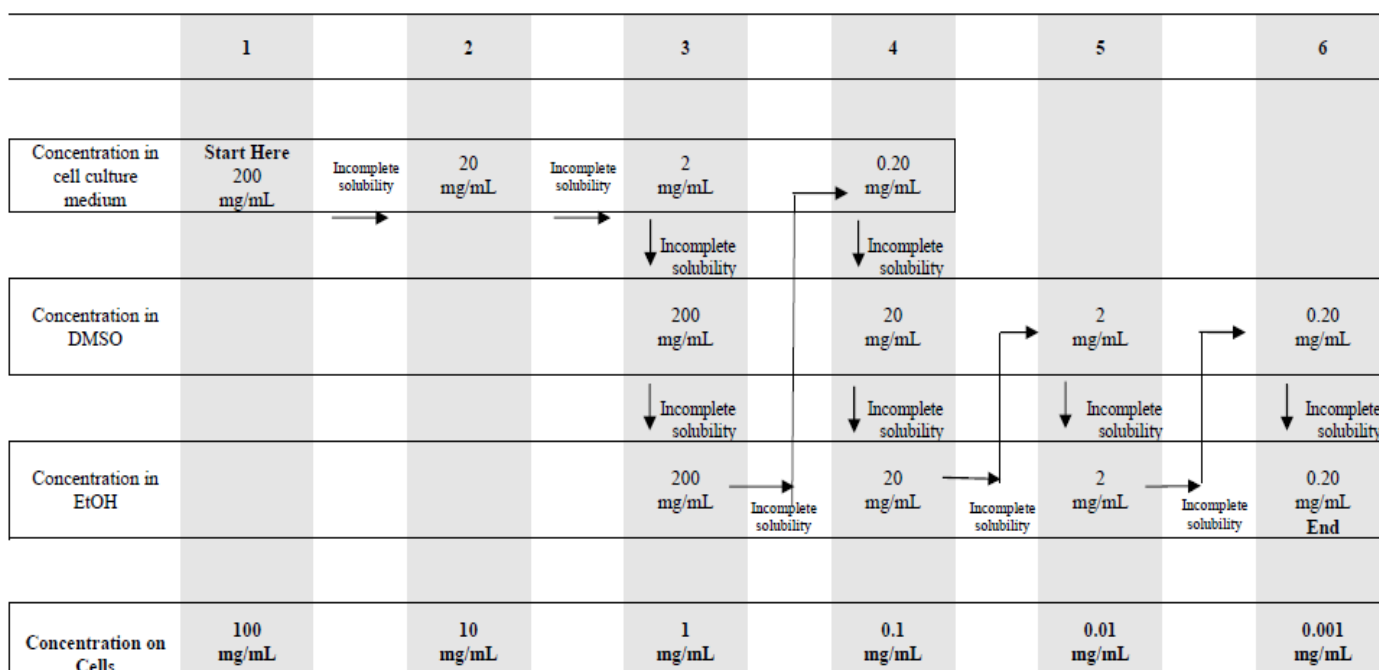
1 ciclo	94°C por 2 minutos
39 ciclos	94°C por 30 segundos
	55°C por 1 minuto
	72°C por 30 segundos
Resfriamento	4 - 8°C

Após a reação, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose. Para o preparo do gel, utilizou-se 1,5% de agarose ultrapura, tampão TAE (Tris, Ácido Acético e EDTA) e gel red (3 µL para cada 100 mL gel). O gel contendo 2,5 µL das amostras provenientes da reação de PCR misturadas com azul de bromofenol por lane foi colocado em câmara de eletroforese a 80V por 50 minutos.

### 2.3. Teste de solubilidade do Bisfenol A

O protocolo N°129 da OCDE apresenta em seu ANEXO 5 um protocolo para determinação da solubilidade da substância teste (figura 1). Esse protocolo identifica o solvente que oferece a maior concentração solúvel da substância teste nos testes de citotoxicidade. Os solventes em ordem de preferência, são: meio de cultura, dimetilsulfóxido (DMSO) e Etanol (EtOH). A determinação do solvente a ser utilizado foi baseada em observação visual, utilizando um microscópio e a melhor escolha do solvente é aquela em que a substância é límpida e não apresenta cristais e/ou precipitados.

**Figura 1: Diagrama para determinação da solubilidade da substância teste**



Anexo 5 contido no protocolo N°129 da OCDE em que demonstra o diagrama de determinação da solubilidade da substância teste em meio de cultura, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol (EtOH).

Fonte: Protocolo OCDE n.129, Anexo 5 p.45.

A substância escolhida para ser testada neste ensaio foi o Bisfenol A – BPA ≥ 99% (4,4 isopropilidionodifenol - Supelco® - Número de Catálogo: 239658).

O protocolo de solubilidade foi rigorosamente seguido a cada etapa, como demonstrado no diagrama acima. Procedimentos de homogeneização descritos no protocolo também foram realizados, como homogeneização da solução no vortex por 1 a 2 minutos e aquecimento no banho-maria a 37°C por 5 a 60 minutos. A verificação de sinais de turbidez e/ou precipitados na solução foi realizado em cada etapa, até alcançar a completa solubilidade do composto no solvente apropriado.

## **2.4. Teste de vermelho neutro**

### **2.4.1. Range Finder**

O range finder é um teste de citotoxicidade que foi utilizado para determinar as doses iniciais para o teste principal. A substância teste (BPA) foi diluída em oito concentrações diferentes, abrangendo uma maior faixa de concentração.

A maior concentração da substância teste aplicada às células no range finder foi de 1/200 da maior concentração encontrada no teste de solubilidade para a substância solúvel em DMSO. Além disso, a concentração final do solvente não ultrapassou 0,5% (v/v).

Assim, foi utilizada a solução estoque de BPA 20mg/mL, a primeira concentração testada foi 0,1mg/mL. Portanto, a solução estoque foi diluída na proporção de 1:10 por duas vezes, resultando em uma concentração de 0,2 mg/mL. A partir desta solução, sete diluições seriadas na proporção de 1:10 foram feitas para a aplicação na placa, uma concentração em cada coluna (C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>), como mostra a figura 2. Foram aplicados 50µL das soluções na placa de 96 poços, onde 50µL do meio de cultura já estava presente, para diluir pela metade e resultando nas seguintes concentrações: C<sub>1</sub>: 100 µg/mL; C<sub>2</sub>: 10µg/mL; C<sub>3</sub>: 1µg/mL; C<sub>4</sub>: 0,1µg/mL; C<sub>5</sub>: 0,01µg/mL; C<sub>6</sub>: 0,001µg/mL; C<sub>7</sub>: 0,0001µg/mL e C<sub>8</sub>: 0,00001µg/mL.

Para o range finder, a placa de 96 poços foi montada da seguinte forma (Figura 2): nos poços C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub> havia oito diferentes concentrações com seis repetições de cada do BPA. Além disso, esta placa contou também com o controle de veículo (CV), que consistiu em meio de cultura acrescido do solvente na mesma concentração que foi utilizado para diluir a substância teste.

Para o teste do vermelho neutro, as células foram subcultivadas por, no mínimo, duas passagens e então plaqueadas em uma placa de 96 poços (Figura 2) numa densidade de  $3 \times 10^3$  células/mL contendo 100µL meio de cultura DMEM High

Glucose sem phenol red e suplementado com 10% de SFB, incubada a 37°C por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e adicionado 100µL do meio que contém a substância teste – Bisfenol A - com oito concentrações diferentes. Após 48 horas de incubação, cada poço da placa foi examinado no microscópio invertido para identificar qualquer alteração morfológica ou de crescimento das células. As placas foram invertidas para remover os meios contendo o BPA e lavadas com 250 µL de PBS. Foi adicionado 250µL da solução que continha 25µg/mL do corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, N2889) em meio de cultura com 5% SFB, em todos os poços da placa e incubado a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Após o período de incubação, a solução foi retirada invertendo as placas e novamente lavadas com PBS. Adicionou-se 100µL de solução de dessorção do vermelho neutro (50 partes de etanol, 49 partes de água e uma parte de ácido acético glacial, preparada no momento da utilização) e as placas foram colocadas em agitador de 30 a 40 minutos, protegendo-as da luz. Por fim, foi medida em espectrofotômetro a absorbância de todos os poços a 540nm.

O cálculo do IC<sub>50</sub> das concentrações utilizadas no range finder foram a base das concentrações utilizadas no teste principal.

#### **2.4.2. Teste principal**

O teste principal utilizou a concentração mais próxima do IC<sub>50</sub> observada no range finder como ponto médio e, a partir disso, sete novas concentrações foram feitas com um fator de diluição menor, para determinar o valor final do IC<sub>50</sub>. O fator de diluição usado para o teste principal foi 1,47.

Para o teste principal, além de uma placa contendo a substância teste, também é feito uma placa controle positivo, a qual utilizou-se o dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de C1: 100µg/mL; C2: 68,1µg/mL; C3: 46,4µg/mL; C4: 31,6µg/mL; C5: 21,5µg/mL; C6: 14,7µg/mL; C7: 10µg/mL e C8: 6,8µg/mL, solubilizado em meio de cultura, também utilizando o fator de diluição 1,47.

Para o teste principal, duas placas de 96 poços foram utilizadas simultaneamente da seguinte forma: em uma estavam contidas oito diferentes concentrações (C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>) com seis repetições de cada do controle positivo (SDS) para se obter uma curva padrão completa de dose-resposta. Em outra placa, o gabarito foi o mesmo visualizado na figura 2 e no range finder, sendo C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub> as amostras com BPA, também preparadas em oito concentrações com seis repetições cada. O controle de veículo (VC) consistiu somente no meio de cultura para a placa do controle positivo e meio de cultura acrescido do solvente para a placa com BPA. Foram seguidos todos os passos do teste de vermelho neutro descritos acima.

**Figura 2: Configuração da placa de 96 poços**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VCb	VCb	C <sub>1</sub> b	C <sub>2</sub> b	C <sub>3</sub> b	C <sub>4</sub> b	C <sub>5</sub> b	C <sub>6</sub> b	C <sub>7</sub> b	C <sub>8</sub> b	VCb	VCb
B	VCb	VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	VCb
C	VCb	VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	VCb
D	VCb	VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	VCb
E	VCb	VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	VCb
F	VCb	VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	VCb
G	VCb	VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	VCb
H	VCb	VCb	C <sub>1</sub> b	C <sub>2</sub> b	C <sub>3</sub> b	C <sub>4</sub> b	C <sub>5</sub> b	C <sub>6</sub> b	C <sub>7</sub> b	C <sub>8</sub> b	VCb	VCb

**C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>** são as oito concentrações do controle positivo ou da substância teste. **C<sub>x</sub>b** são brancos – contém o controle positivo ou substância teste, mas não contém células. **VC** são os controles de veículo, os quais contêm células, meio de cultura e o solvente (se utilizado), sem a substância teste. **VCb** não contêm células, apenas. Fonte: Protocolo OCDE n.129, Anexo 4 p.42.

## 2.5. Cálculo do IC<sub>50</sub> e LD<sub>50</sub>

O valor do IC<sub>50</sub> é caracterizado pela concentração da substância capaz de inibir o crescimento de células em 50% quando comparado com o controle. Para este cálculo, primeiramente foram calculados os seguintes parâmetros: média geral das absorbâncias dos brancos (VCb), média geral e corrigida das absorbâncias dos controles de veículo (VC), média corrigida das absorbâncias de todas as concentrações de substância teste (C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>) e a viabilidade relativa das células tratadas com cada concentração do ativo, assumindo o controle do veículo como 100% de viabilidade. Posteriormente foi utilizado o programa GraphPad Prism

(versão 5.0), onde os valores de concentração da substância teste, os brancos (VCb) e a viabilidade celular das células tratadas com o bisfenol A foram analisadas em conjunto para obtenção do valor do IC<sub>50</sub>. Esse valor é utilizado em uma equação de regressão linear para estimar o LD<sub>50</sub>, ou seja, a concentração da substância capaz de provocar a morte de 50% dos animais em teste. A equação aplicada tem a seguinte fórmula:

$$\text{Log LD}_{50}(\text{mmol/kg}) = 0,439 * \log \text{IC}_{50} (\text{mM}) + 0,621$$

Após converter o LogLD<sub>50</sub> em LD<sub>50</sub>, multiplica-se o valor obtido pelo peso molecular da substância teste em mg/mmol, para obter o LD<sub>50</sub> em mg/kg.

Os critérios de aceitação do teste de vermelho neutro são:

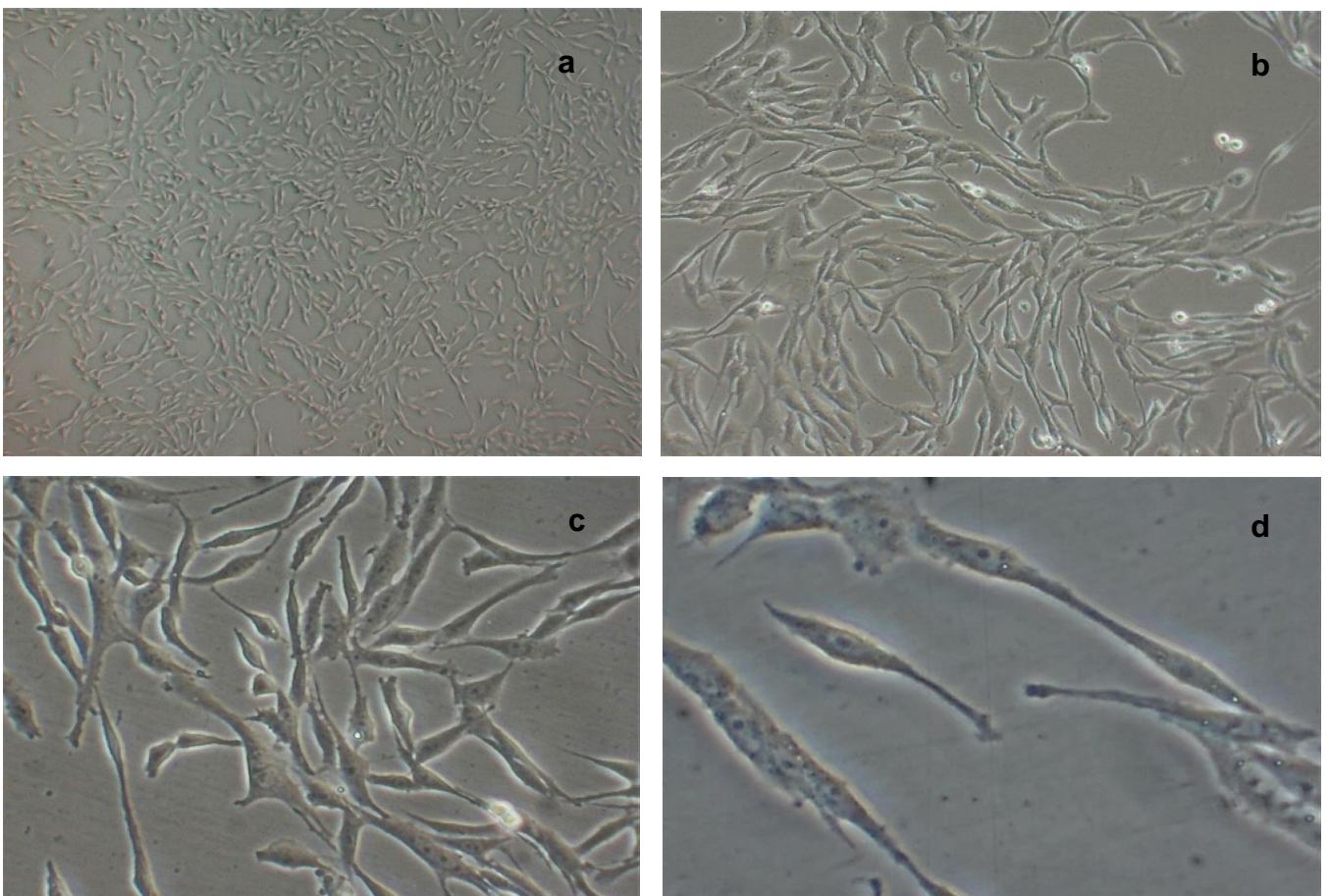
- 1) o branco deve apresentar uma absorvância de aproximadamente 0,05.
- 2) A absorvância esperada para o controle do veículo é  $0,476 \pm 0,117$ .
- 3) O IC<sub>50</sub> esperado do controle positivo (SDS) deve ser  $41,5 \pm 4,85 \mu\text{g/mL}$ .
- 4) A média corrigida do controle de veículo 1 e 2 (VC1 e VC2, vide figura 2) não devem diferir mais de 15% da média corrigida de todos os controles de veículos.
- 5) Deve ser encontrado pelo menos um valor de citotoxicidade maior que 0% e menor ou igual a 50% e pelo menos um valor maior que 50% e menor que 100%.
- 6) O controle positivo deve apresentar um R<sup>2</sup> maior ou igual a 0,85 calculado pela função Hill.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Cultivo celular

O cultivo celular foi iniciado anteriormente com o objetivo de estabelecer um banco de células seguro e disponível para os testes de vermelho neutro com a substância teste bisfenol A. As células da linhagem 3T3 – Swiss albino (ATCC® CCL-92™) foram cultivadas seguindo a metodologia descrita para a expansão da cultura. Após 72h as células apresentavam morfologia alongada e aderência na garrafa, com aproximadamente 80% de confluência (Figura 3). As células foram tripsinizadas e coradas com o marcador azul de tripan e, após a contagem, foi possível constatar uma viabilidade celular média de 99%, evidenciando um crescimento celular ótimo e uma alta taxa de sobrevivência.

**Figura 3: Monocamada de células 3T3 – Swiss albino após 72h de expansão.**

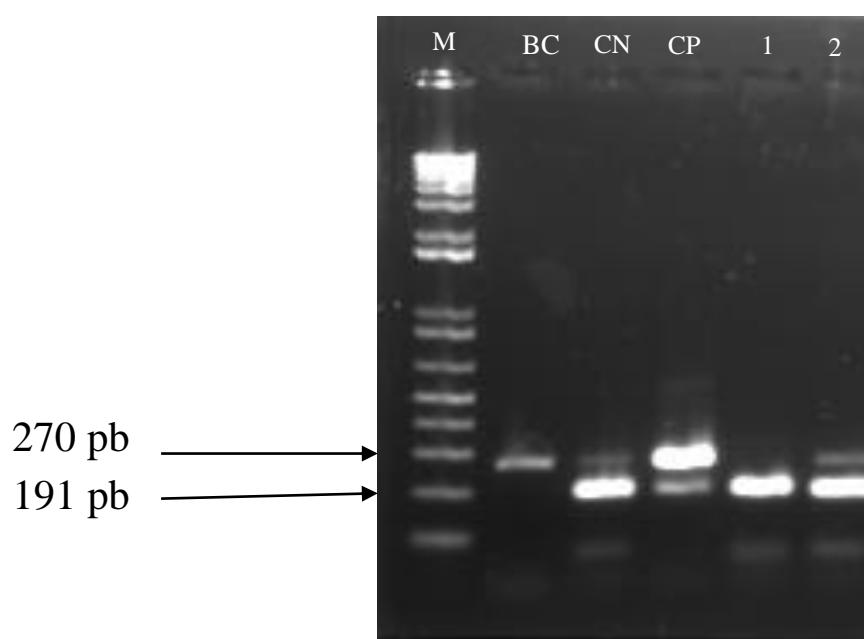


A sequência de imagens mostra o cultivo celular da linhagem 3T3 após 72h de expansão. As letras indicam o aumento utilizado para a visualização no microscópio óptico, sendo **a**: aumento de 4x. **b**: aumento de 10x. **c**: aumento de 20x. **d**: aumento de 40x.

### 3.2. Detecção de *Mycoplasma*

O teste de *Mycoplasma* foi realizado a partir de amostras do sobrenadante, aliqüotadas anteriormente ao processo de tripsinização e centrifugação das garrafas de cultivo. Como descrito na metodologia, o teste baseou-se em PCR e análise do gel de eletroforese, o qual continha duas amostras celulares, um controle negativo e um controle positivo. A contaminação por esse gênero de bactéria é demonstrada no gel quando há uma banda com 270 pb, demonstrado na figura 4 pelo controle positivo. Por conta da sensibilidade do teste, é descrito no protocolo que o CP pode apresentar uma banda fraca em 191 pb. Portanto, as amostras não apresentaram contaminação por *Mycoplasma* (Figura 4) e foram utilizadas para a manutenção do cultivo celular e do teste do vermelho neutro.

**Figura 4: Gel de agarose após eletroforese para detecção de *Mycoplasma***



M: Marcador de peso molecular; BC: Branco; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; 1 e 2: Amostras do sobrenadante do cultivo das células 3T3.

### 3.3. Solubilidade do Bisfenol A

Para o teste de solubilidade do bisfenol A inicialmente foi pesado 100mg da substância e acrescentado 500 $\mu$ L de meio de cultura DMEM High Glucose sem phenol red, obtendo-se uma concentração de 200mg/mL. Nesse teste com o meio, o

bisfenol A não foi completamente solúvel, sendo possível observar precipitações no tubo de ensaio. Seguindo o protocolo do anexo 5, foram realizados testes com as concentrações posteriores em meio de cultura, nos quais o BPA também não foi completamente solubilizado. O solvente subsequente utilizado foi o dimetilsulfóxido, prosseguindo o protocolo de solubilidade até a concentração de 20mg/mL em DMSO, a qual o BPA foi completamente solubilizado, obtendo uma solução com uma aparência limpa e clara, sem precipitações na solução estoque (BPA 20mg/mL) e nas diluições seriadas realizadas em meio de cultura. Portanto, o veículo de dissolução da substância teste utilizado nesse estudo foi o DMSO.

### 3.4. Ensaio de vermelho neutro

#### 3.4.1 Range Finder

Após análises do teste range finder, o valor do IC<sub>50</sub> encontrado para o BPA foi 9 µg/mL (Figura 5). A partir desse dado foi calculado a concentração dos oito pontos a serem utilizados no teste principal do vermelho neutro utilizando o fator de diluição 1,47. O IC<sub>50</sub> encontrado foi fixado como ponto médio e foram adicionadas quatro concentrações acima do seu valor e três abaixo.

Figura 5: Gráfico do IC<sub>50</sub> do teste Range Finder

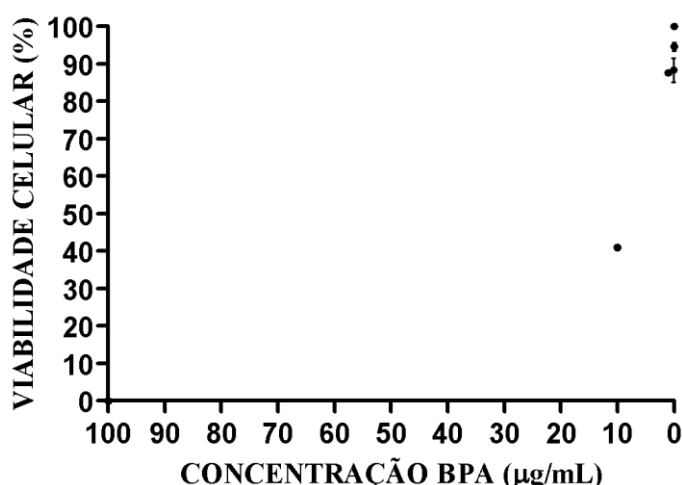


Gráfico do teste range finder que demonstra a viabilidade celular em 50% na concentração de 9 µg/mL do BPA.

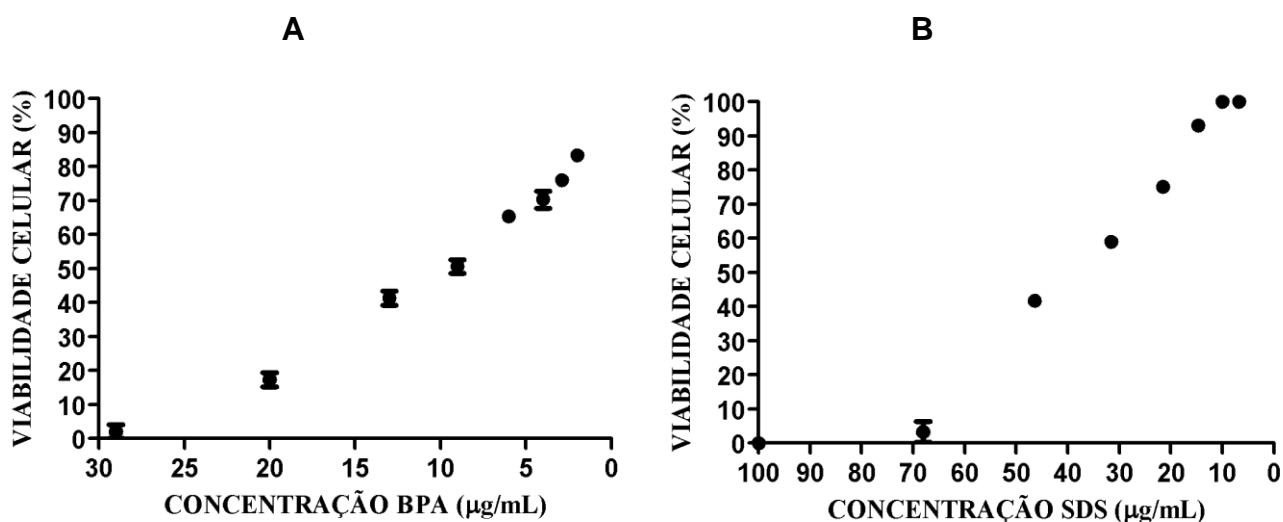
### 3.4.2 Teste Principal

As concentrações para o teste principal com BPA estão apresentadas abaixo na Tabela 1. Simultaneamente foi testada a placa de 96 poços contendo SDS (controle positivo). Após análises dos testes, foi possível calcular o IC<sub>50</sub> tanto do BPA quanto do SDS, por meio do ensaio de citotoxicidade (Figura 6 e Tabela 2).

**Tabela 1: Concentrações do bisfenol A utilizadas no Teste Principal**

C <sub>1</sub> : 29 µg/mL	C <sub>5</sub> : 6 µg/mL
C <sub>2</sub> : 20 µg/mL	C <sub>6</sub> : 4 µg/mL
C <sub>3</sub> : 13 µg/mL	C <sub>7</sub> : 2,9 µg/mL
C <sub>4</sub> : 9 µg/mL	C <sub>8</sub> : 2 µg/mL

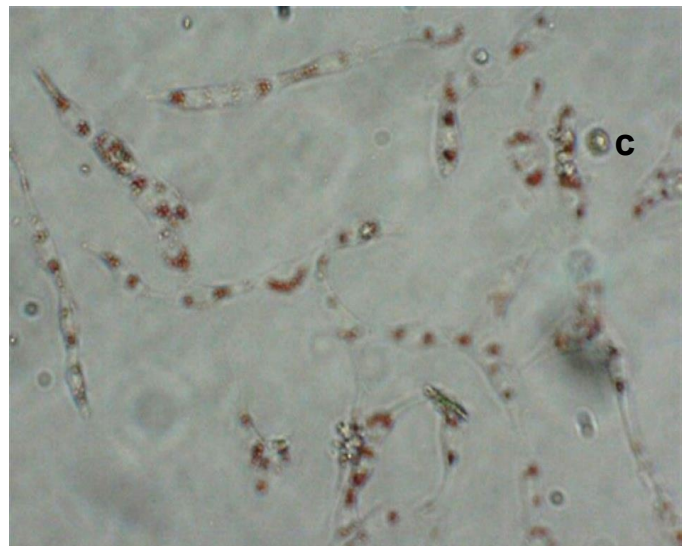
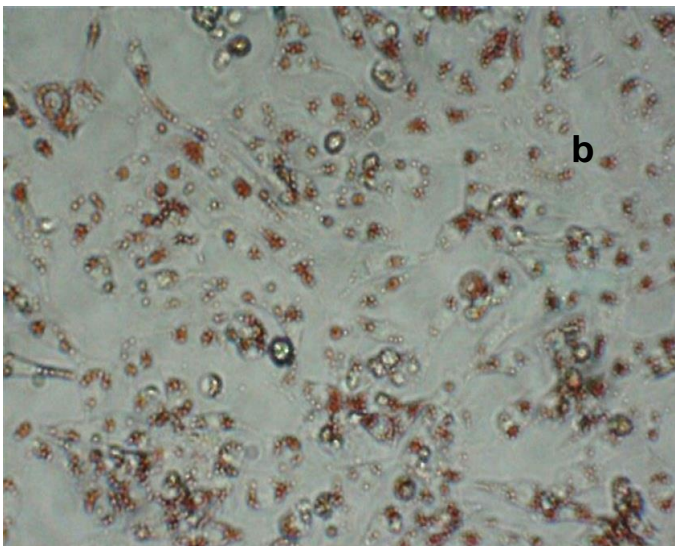
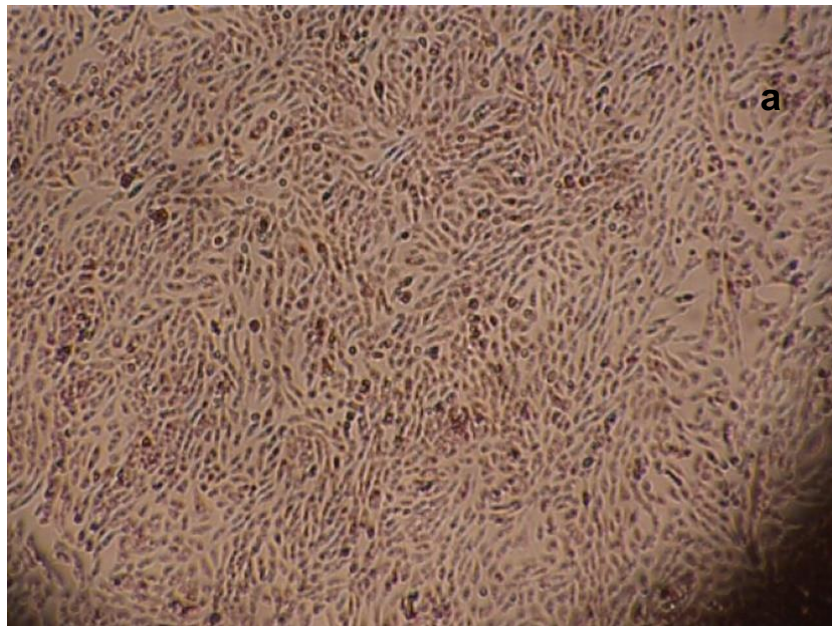
**Figura 6: Citotoxicidade do bisfenol A (A) e SDS (B) pelo ensaio de vermelho neutro.**



Gráficos A e B: Células murinas 3T3 foram tratadas por 48h com diferentes diluições de BPA (A) e SDS (B) e posteriormente incubadas com solução de vermelho neutro por 3h. A citotoxicidade foi demonstrada pela ausência ou redução da absorção do vermelho neutro quando comparado ao controle.

**Tabela 2: Valores da média do IC<sub>50</sub>**

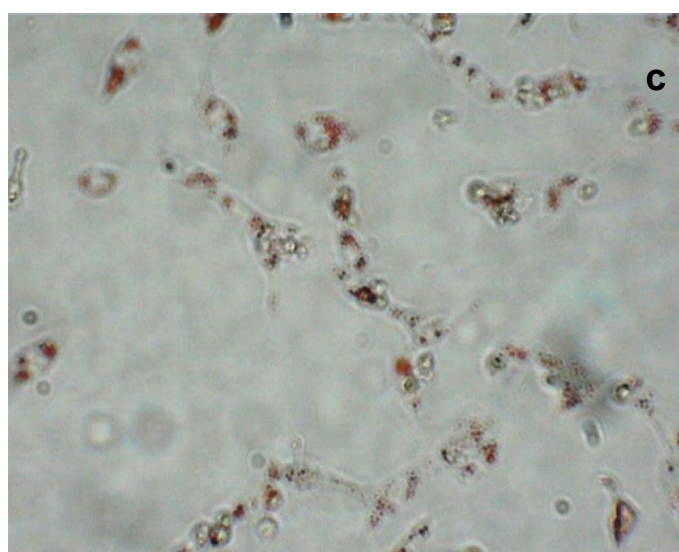
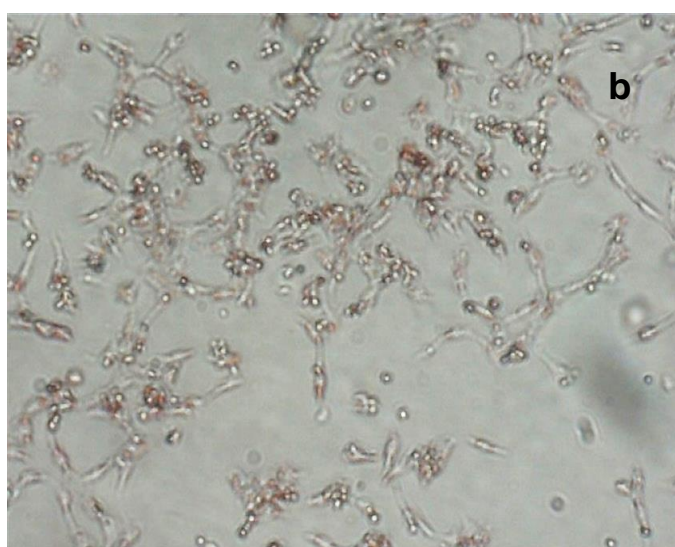
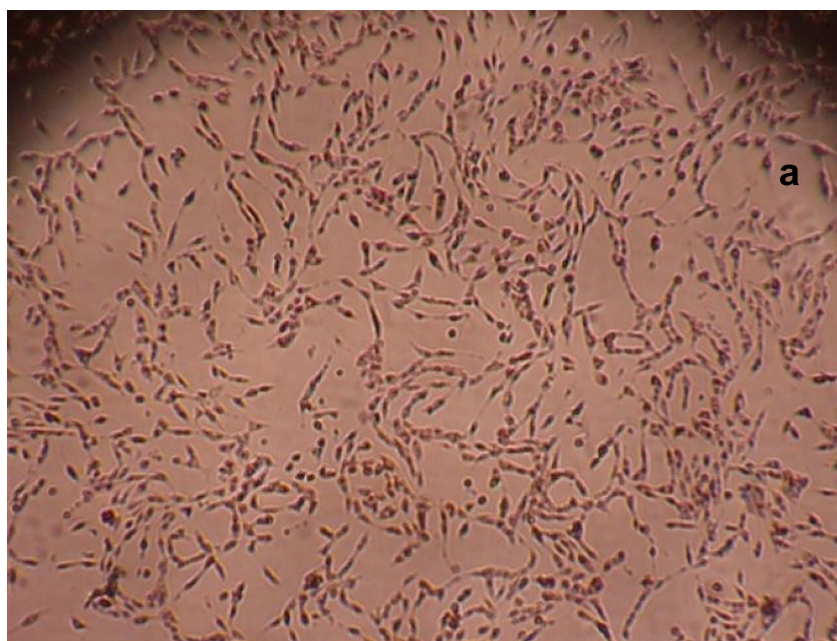
Substância Testada	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Bisfenol A (BPA)	9
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	41,03

**Figura 7: Cultura celular controle (sem BPA) corada com vermelho neutro após 48h em meio de cultura.**

Cultivo de células 3T3 coradas com vermelho neutro após 48h em meio de cultura, sem exposição ao BPA. As letras indicam o aumento utilizado para a visualização no microscópio óptico, sendo a: aumento de 4x. b: aumento de 10x. c: aumento de 20x.

A citotoxicidade apresentada pelo  $IC_{50}$  do bisfenol A acima pode ser visto nas Figuras 7 e 8, que compara a cultura celular controle (sem BPA) com a cultura após exposta ao bisfenol A, ambas após 48h. Além de evidenciar a diferença na quantidade celular, pode-se observar a incorporação do vermelho neutro, que é menos perceptível nas células exposta ao bisfenol A, indicando que a célula foi danificada pelo composto.

**Figura 8. Cultura celular corada com vermelho neutro após 48h de exposição ao BPA ( $IC_{50}=9 \mu\text{g/mL}$ ).**



Cultivo de células 3T3 coradas com vermelho neutro após 48h de exposição ao BPA. As letras indicam o aumento utilizado para a visualização no microscópio óptico, sendo **a**: aumento de 4x. **b**: aumento de 10x. **c**: aumento de 20x.

A partir das análises estatísticas e utilizando da fórmula presente no protocolo e descrita acima, foi possível calcular por meio do valor do IC<sub>50</sub> do BPA e prever o valor da LD<sub>50</sub> via oral, que foi de 2025 mg/kg.

#### 4. DISCUSSÃO

Ensaio para a avaliação de toxicidade utilizando metodologias alternativas, e, dentre elas, ensaios *in vitro*, tem sido cada vez mais difundido e validado, reconhecido por agências internacionais de validação de métodos. O ensaio de vermelho neutro em células 3T3 para o teste de toxicidade oral aguda possui uma baixa taxa de falsos negativos, entre 4% e 8% e apresenta uma alta sensibilidade, entre 92% e 96% (ESTEVEZ-PEDRO et al., 2018).

O protocolo seguido neste estudo tem o propósito de utilizar testes *in vitro* para a determinação das doses iniciais de toxicidade oral aguda em modelos *in vivo*, mais especificamente em roedores. A premissa se baseia na utilização do valor do IC<sub>50</sub> para prever o valor da LD<sub>50</sub>, cuja simulação pode reduzir a utilização de animais experimentais em até 50% (ICCVAM, 2006), auxiliando na substituição e refinamento de técnicas (ESTEVEZ-PEDRO et al., 2018).

Assim, vários parâmetros são utilizados nesse protocolo para garantir a padronização e confiabilidade do teste. Neste estudo, recomenda-se uma série decimal de concentrações geométricas de diluições e estas podem ser usadas para testes toxicológicos pois a série tem a vantagem de que experimentos independentes com fatores de dose amplos ou estreitos podem ser facilmente comparados pois compartilham concentrações idênticas. Ressalta-se, ainda, que o teste principal requer um fator de diluição menor do que o do range finder. Além disso, para validar o ensaio é necessário o resultado do controle positivo, pois a substância possui um histórico de ensaios e valores de confiabilidade. Segundo o protocolo, o IC<sub>50</sub> esperado para o SDS deve ser  $41,5 \pm 4,85 \mu\text{g/mL}$ . O valor obtido nesse estudo foi  $41,03 \mu\text{g/mL}$ , como mostra a figura 6 e a tabela 2, que corrobora para a validação do teste. Os critérios de aceitação do teste foram alcançados, estando as médias e valores obtidos dentro do preconizado pelo teste.

O procedimento do ensaio de citotoxicidade é baseado na capacidade de células viáveis incorporarem o corante vermelho neutro, que se difunde facilmente através da membrana plasmática e se concentra nos lisossomos. Os compostos potencialmente tóxicos podem causar reações adversas, alterando a membrana celular e dos

lisossomos, causando morte ou inibição do crescimento celular. Assim, a quantidade do corante vermelho neutro retido pela cultura é diminuída e a citotoxicidade é expressa através da concentração-dependente da redução do vermelho neutro após a exposição ao composto, uma vez que a concentração de corante vermelho neutro desorvida das células cultivadas é diretamente proporcional ao número de células vivas (OECD, 2010)

Dessa forma, a citotoxicidade apresentada pelo valor do IC<sub>50</sub> do bisfenol A também pôde ser evidenciada a partir da comparação entre as figuras 7 e 8, onde a cultura celular controle (sem BPA) apresentou maior quantidade de células, assim como uma viabilidade maior após o ensaio de vermelho neutro. Pode se observar também a incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos, que é menor na cultura celular exposta ao bisfenol A, indicando que a célula foi danificada pelo composto.

Sendo assim, por meio do valor do IC<sub>50</sub> do BPA foi possível prever que o valor da LD<sub>50</sub> via oral foi de 2025 mg/kg. Esse valor está de acordo com o reportado no documento da European Chemicals Agency (ECHA), onde estudos com roedores foram realizados registrando valores da dose letal mediana (LD<sub>50</sub>) via oral em torno de 2000 mg/kg até aproximadamente 5000mg/kg. Chapin *et al.* (2008) e Michałowicz (2014) também encontraram valores nesta variação para toxicidade aguda oral, reportando como LD<sub>50</sub> 3300 mg/kg a 4100mg/kg e LD<sub>50</sub> 2400mg/kg a 3250mg/kg, respectivamente. Ressalta-se que não há dados na literatura sobre o valor da LD<sub>50</sub> obtido por essa metodologia preconizada pela OCDE (TG n° 129).

O valor encontrado nesse estudo, próximo à dose inicial verificada pelo ECHA, pode ser justificado pelo ensaio ser conduzido em cultura celular, que apresenta sensibilidade maior a substâncias quando comparada ao um organismo complexo. Em estudos futuros esse mesmo protocolo de ensaio de vermelho neutro pode ser utilizado em modelos tridimensionais de cultivo celular, pois estes apresentam uma maior semelhança com modelos *in vivo* quando comparados a modelos de monocamada (2D) (DUVAL *et al.*, 2017).

Destaca-se que com valor predito do LD<sub>50</sub> pode-se estimar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda sistêmica *in vivo*. O ICCVAM e o ECVAM recomendam que estas doses sejam utilizadas no ensaio de Toxicidade Oral Aguda – Método de Classe Tóxica Aguda (CTA) - TG n°423 e no Procedimento Up and Down (PUD) - TG n°425.

A dose inicial para o PUD é a próxima dose mais baixa do que o LD<sub>50</sub> predito. A progressão para este método é de 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550 e 2000 mg/kg usando um teste de limite de 2000 mg /kg ou 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750 e 5000 mg/kg usando um teste de limite de 5000 mg/kg. Por sua vez, a dose inicial para o método CTA é a próxima dose mais baixa do LD<sub>50</sub> estimado na progressão da dose padrão. A progressão de dose padrão para o método é 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg para o teste limite de 2000 mg/kg ou 5, 50, 300, 2000 ou 5000 mg/kg para o teste de limite de 5000 mg/kg.

Em função da maior acessibilidade ao teste de vermelho neutro quando comparado a ensaios com animais experimentais, pode-se destacar a alta viabilidade de reprodução do método com substâncias que possam indicar possíveis problemas na saúde humana ainda desconhecidos ou pouco mensurados, como efeitos de pesticidas, fertilizantes e agroquímicos. Esses dados auxiliariam na elaboração de planos de segurança e no desenvolvimento criterioso de substâncias efetivas e seguras para a saúde humana.

Assim, conclui-se que o objetivo deste estudo utilizando o ensaio de vermelho neutro, descrito no protocolo N° 129 da OCDE foi atingido com sucesso e que a metodologia padronizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular pode ser utilizada para ensaios de substâncias e/ou compostos com IC<sub>50</sub> e LD<sub>50</sub> desconhecidas e que possam acarretar danos para a saúde humana, animal e ambiental. Destaca-se ainda, que produtos químicos agrícolas, como pesticidas, fertilizantes, defensivos e agroquímicos podem ser testados por este método e dessa forma, os resultados obtidos podem auxiliar na elaboração de planos de segurança e no desenvolvimento criterioso de substâncias efetivas e seguras.

## **5. CONCLUSÕES**

O protocolo número 129 da agência internacional Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, intitulado “Documento guia para testes de citotoxicidade para estimar doses iniciais de toxicidade sistêmica aguda oral”, preconizado por agências internacionais e aceitas pela legislação do Brasil, a ANVISA e CONCEA foi padronizado com sucesso, utilizando como substância teste o bisfenol A. A concentração da dose letal mediana (LD<sub>50</sub>) encontrada nesse estudo a partir do cálculo do IC<sub>50</sub> foi 2025mg/kg.

## REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Bisfenol A**. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/alimentos/embalagens/bisfenol-a>>

ATES, Gamze *et al.* Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 19-26, 2017. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2).

AVEY, Marc T; FENWICK, Nicole; GRIFFIN, Gilly. The Use of Systematic Reviews and Reporting Guidelines to Advance the Implementation of the 3Rs. **Journal Of The American Association For Laboratory Animal Science**, [s. l], v. 54, n. 2, p. 153-162, mar. 2015.

AOKI, Shigehisa *et al.* Progress in cell culture systems for pathological research. **Pathology International**, [S.L.], v. 66, n. 10, p. 554-562, 31 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pin.12443>.

BAMBINO, Kathryn; CHU, Jaime. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current Topics In Developmental Biology**, [S.L.], v. 124, p. 331-367, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>.

BAUST, John M. *et al.* Best practices in cell culture: an overview. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [S.L.], v. 53, n. 8, p. 669-672, 14 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>.

BURM, Saskia M. *et al.* Alternative methods for the use of non-human primates in biomedical research. **Altex**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 520-529, nov. 2014. ALTEX Edition. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.1406231>

CALAFAT, Antonia M. *et al.* Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary -Octylphenol: 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 116, n. 1, p. 39-44, jan. 2008. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.10753>.

CANO-NICOLAU, Joel *et al.* Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 10:112, 24 mar. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2016.00112>.

CAVALIERI, Ercole L.; ROGAN, Eleanor G.. Is bisphenol A a weak carcinogen like the natural estrogens and diethylstilbestrol? **Iubmb Life**, [S.L.], v. 62, n. 10, p. 746-751, out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.376>.

CHAPIN, Robert E. *et al.* NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 157-395, 20 jun. 2008. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1002/bdrb.20147>.

DUVAL, Kayla *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 266-277, jul. 2017. American Physiological Society.

<http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.

ESKES, Chantra *et al.* Good cell culture practices & *in vitro* toxicology. **Toxicology In vitro**, [S.L.], v. 45, p. 272-277, dez. 2017. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.022>.

ESTEVEZ-PEDRO, Natalia Mencacci *et al.* Validation Cytotoxicity Assay for Lipophilic Substances. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 275-286, 29 maio 2018. Bentham Science Publishers Ltd..

<http://dx.doi.org/10.2174/1568026618666180410142829>.

European Chemicals Agency (ECHA). **4,4'-isopropylidenediphenol**. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15752/7/3/1>>

FILIPPIS, Elena de; LI, Ting; ROSEN, Evan David. Exposure of adipocytes to bisphenol-A *in vitro* interferes with insulin action without enhancing adipogenesis. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 8, 22 ago. 2018. Public Library of Science (PLoS).

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0201122>.

FITZGERALD, Amanda C. *et al.* Bisphenol A and Related Alkylphenols Exert Nongenomic Estrogenic Actions Through a G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (Gper)/Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr) Pathway to Inhibit Meiotic Maturation of Zebrafish Oocytes1. **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 93, n. 6, p. 1-11, 1 dez. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.115.132316>.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5. ed. New York: Wiley-Liss, 2005. 696 p.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM)**. Disponível em: <[https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1188&Itemid=214](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1188&Itemid=214)>.

HARTUNG, Thomas. From alternative methods to a new toxicology. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 338-349, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.027>

**ICCVAM** - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT: *IN VITRO* CYTOTOXICITY TEST METHODS FOR ESTIMATING STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTING. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences, Nov 2006. NIH Publication No. 07-4519. Disponível em:

<[https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox\\_docs/brd\\_tmter/at-tmter-complete.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmter/at-tmter-complete.pdf)>

JIAO, Liya *et al.* Effects of bisphenol A on chlorophyll synthesis in soybean seedlings. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 5877-5886, 30 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3764-0>

KIM, Dokyung; KWAK, Jin Il; AN, Youn-Joo. Effects of bisphenol A in soil on growth, photosynthesis activity, and genistein levels in crop plants (*Vigna radiata*). **Chemosphere**, [S.L.], v. 209, p. 875-882, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.146>.

KIM, Seoyoung *et al.* Submicromolar bisphenol A induces proliferation and DNA damage in human hepatocyte cell lines *in vitro* and in juvenile rats *in vivo*. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 111, p. 125-132, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.010>.

KIM, Tae-Won; CHE, Jeong-Hwan; YUN, Jun-Won. Use of stem cells as alternative methods to animal experimentation in predictive toxicology. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 105, p. 15-29, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.03.016>.

MA, Ya *et al.* The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. **Environmental Research**, [S.L.], v. 176, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>.

MICHAŁOWICZ, Jaromir. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 738-758, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>.

OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 129 GUIDANCE DOCUMENT ON USING CYTOTOXICITY TESTS TO ESTIMATE STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTS. ENV/JM/MONO(2010)20. Paris: OECD, 2010. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocus/oced/oced-gd129.pdf>>

OECD - Test Guidelines for the Chemicals. Disponível em:<  
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>>

PAMIES, David *et al.* Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems. **Altex**, [S.L.], p. 353-378, 2018. ALTEX Edition. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.1710081>

PTAK, Anna *et al.* Bisphenol A induce ovarian cancer cell migration via the MAPK and PI3K/Akt signalling pathways. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 229, n. 2, p. 357-365, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.001>..

REDDY, P. Venkata Laxma *et al.* Photocatalytic degradation of bisphenol A in aqueous media: a review. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 213, p. 189-205, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.059>.

SHELBY, Michael D. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. **NTP CERHR MON.** 1-64 passim (22):v, vii-ix, Sep 2008 .PMID: 19407859.

VANDENBERG, Laura N. *et al.* Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reproductive Toxicology**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 139-177, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>.

WELSHONS, Wade V.; NAGEL, Susan C.; SAAL, Frederick S. Vom. Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. **Endocrinology**, [S.L.], v. 147, n. 6, p. 56-69, 1 jun. 2006. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-1159>.

WETHERILL, Yelena B. *et al.* *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. **Reproductive Toxicology**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 178-198, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.010>.

YAO, Tatsuma; ASAYAMA, Yuta. Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues. **Reproductive Medicine And Biology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 99-117, 21 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12024>.