

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Bárbara Osmarin Turra

**IMPACTO TOXICOGENÔMICO DO BISFENOL A EM DIFERENTES
MODELOS EXPERIMENTAIS E POTENCIAL EFEITO REVERSOR DE
UM MULTISSUPLEMENTO ALIMENTAR**

Santa Maria, RS
2024

Bárbara Osmarin Turra

**IMPACTO TOXICOGENÔMICO DO BISFENOL A EM DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTAIS E POTENCIAL REVERSOR DE UM MULTISSUPLEMENTO
ALIMENTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Barbisan

Santa Maria, RS
2024

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Turra, Bárbara Osmarin

IMPACTO TOXICOGENÔMICO DO BISFENOL A EM DIFERENTES
MODELOS EXPERIMENTAIS E POTENCIAL REVERSOR DE UM
MULTISSUPLEMENTO ALIMENTAR / Bárbara Osmarin Turra.-
2024.

153 p.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Coorientadora: Fernanda Barbisan

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2024

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, BÁRBARA OSMARIN TURRA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Bárbara Osmarin Turra

**IMPACTO TOXICOGENÔMICO DO BISFENOL A EM DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTAIS E POTENCIAL REVERSOR DE UM MULTISSUPLEMENTO
ALIMENTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Aprovada em 15 de maio de 2024:

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**

Manuel Grandal Martín, Dr. (UAX)

Marina Prigol, Dra. (UNIPAMPA)

Natália Brucker, Dra. (UFSM)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

**SANTA MARIA, RS
2024**

AGRADECIMENTOS

Considero essa uma das etapas mais difíceis de escrever... Para chegar até aqui, muitas pessoas estão envolvidas:

Começo agradecendo a Deus e a minha fé, que embora digam que não se mistura com ciência, foi de extrema importância para o meu suporte emocional e me permitiu levar esse ciclo com um pouco mais de clareza e leveza.

Aos meus pais, Primo Antônio Turra e Marlene Osmarin Turra, sem eles nada disso poderia se tornar realidade, foi deles que sempre tive o apoio e o incentivo que precisei. Tudo o que conquistei foi por eles, que nunca hesitaram esforços para me auxiliar, que me ouviram chorar e comemorar. Essa conquista é nossa. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Rafael Dias Acosta por todo apoio e paciência que precisou ter (risos). Obrigada por sempre compreender as minhas ausências e me incentivar, por me encorajar e acreditar que tudo isso seria possível. Te amo!

À minha família com um todo que sempre se mostrou preocupada e mesmo de longe se fez presente. Menciono a importância da minha melhor amiga e prima Juliana Turra Zanatta. Ela se fez presente durante esses meus 27 anos, em todas as etapas, momentos difíceis e conquistas. Sempre vibrou e torceu comigo. Amo você!

Aos meus amigos, que são muitos... Apesar de não os nominar aqui, todos estão cientes da sua importância e quão psicólogos foram. Obrigada por cada abraço e por cada: “Oi, tá tudo bem? Precisa de alguma coisa?”.

À minha orientadora Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, um ser humano ímpar. Obrigada por me acolher, por acreditar, por confiar em mim. Obrigada por todo tempo que dedicastes na minha formação, me ensinado. Ensinando não só profissionalmente, mas, pessoalmente. Saibas que te admiro muito!

À minha coorientadora Profa. Dra. Fernanda Barbisan. Fer, assim posso chamá-la somos amigas! Amigas desde a infância, o destino nos aproximou e nos uniu, embora não sejamos família de sangue, somos família de vida. Obrigada por todo o apoio que me destes até aqui. Te amo!

Aos meus colegas que hoje já são doutores: Cibele Ferreira Teixeira, Moisés Henrique Mastella, Audrei Alves, Graziela Castagna, Charles Elias Asmann e Isabel Roggia... Vocês são extraordinários, obrigada por cada palavra de apoio, por toda

ajuda, obrigada por fazerem de nosso trabalho, um lugar de convivência, troca de experiências e crescimento. Adoro muito vocês!

À minha “fiel escudeira” Nathália Bonotto, muito mais que minha colega de trabalho, minha amiga. Obrigada por todo o teu apoio e ajuda. Obrigada por ser abraço e clareza quando precisei.

Aos meus colegas do Laboratório Biogenômica como um todo. À iniciação científica que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, sem vocês nada disso teria sido possível! Obrigada a todos (que são muitos). Aquelas que chegaram recentemente, mas se mostraram cooperativas e solidárias aos meus desesperos: Elize Musachio, Juliane Sasso e Fernanda Trombini, obrigada.

À Profa Dra Verônica Farina Azzolin, que é minha amiga. Obrigada por ser apoio, me ouvir, e permitir grandes momentos na pós-graduação e fora dela.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia; aos professores do Programa, por toda a troca de conhecimento e os ensinamentos. A Zeli secretária do programa, obrigada por toda a paciência, gentileza e eficiência, quando as inúmeras dúvidas surgiam (risos). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), à Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade (FUnATI) pelos recursos financeiros que possibilitaram a execução de nossa pesquisa.

Enfim, obrigada a todos aqueles que se fizeram energia, que mandaram positividade e que de alguma forma acompanhavam essa trajetória. Obrigada e Obrigada, um beijo no fundo do coração!

RESUMO

IMPACTO TOXICOGENÔMICO DO BISFENOL A EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS E POTENCIAL REVERSOR DE UM MULTISSUPLEMENTO ALIMENTAR

AUTORA: Bárbara Osmarin Turra
ORIENTADORA: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz
COORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Barbisan

Introdução: O Bisfenol A (BPA) é um monômero sintético amplamente utilizado na indústria de plásticos. Considerado um poluente ambiental, atua como um disruptor endócrino. Suas formas livres no organismo estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs). Entretanto, resultados relacionados aos mecanismos biológicos pelo qual o BPA age, ainda são conflitantes. É possível que, o BPA cause desbalanço oxidativo e/ou inflamatório independentemente do tipo de organismo ou célula. Assim, como tentativa de atenuar esses efeitos, muitos estudos se concentram nas propriedades de frutos e compostos naturais, associados ou isolados. **Objetivo:** avaliar o impacto toxicogenômico do BPA em marcadores oxidativos, genotóxicos e inflamatórios utilizando um modelo *in vivo* de minhocas californianas vermelhas (*Eisenia fetida*) e, um modelo *in vitro* de cultura de células do epitélio pigmentar da retina humana (ARPE-19) e caracterizar o potencial reversor de um multissuplemento a base de Guaraná (Gua), Selênio (Se) e L- Carnitina (LC) (GSC®). **Metodologia:** O trabalho está dividido em dois artigos. No artigo 1 foi avaliado *in vivo* o impacto do BPA sob os marcadores geno-oxi-inflamatórios: a) o efeito da exposição aguda (24 h e 72h) de minhocas adultas a diferentes concentrações de BPA (0,1, 0,3, 1, 10 e 30 μM); b) A citotoxicidade do BPA e a modulação da proliferação de celomócitos foram determinadas por citometria de fluxo; c) Os seguintes marcadores oxidativos foram quantificados por espectrofotometria: ânion superóxido (O_2^-), óxido nítrico (ON), lipoperoxidação (TBARS) e carbonilação de proteínas (PCarb); d) O impacto do BPA no dano de DNA de celomócitos foi determinado via ensaio do micronúcleo (MN); e) Alterações do BPA na eficiência imune das minhocas foram testadas através do ensaio de exposição de celomócitos a leveduras mortas no qual foi avaliada a formação de redes extracelulares de DNA e de corpos marrons através de análises cito-histológicas; f) Efeito genômico do BPA na modulação da expressão dos genes receptor *tool-like* (eaTLR) e lumbricina 1, via *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR). No artigo 2, células da linhagem ARPE-19 foram expostas ao BPA (0,001, 0,01, 0,1, 1, 3 e 10 μM) para determinar a concentração mínima a induzir citogenotoxicidade. b) As células ARPE-19 foram então expostas concomitantemente à concentração selecionada de BPA, GSC e seus componentes isolados (Gua, 1,07 mg/mL; Se, 0,178 $\mu\text{g/mL}$; e LC, 1,43 mg/mL); c) Citometria de fluxo, ensaios bioquímicos, qRT-PCR, genotoxicidade, apoptose e proliferação celular foram avaliados. **Resultados:** A execução do protocolo 1 mostrou que baixas concentrações de BPA induziram aumento na taxa de proliferação de celomócitos, desbalanço na razão entre O_2^-/ON , frequência elevada de MN e apoptose. O BPA também induziu aumento da expressão do gene AMP1, mas menor eficiência na captura de leveduras mortas. Já, o trabalho executado pelo protocolo 2 os resultados sugerem que 10 μM de BPA é suficiente para induzir alterações citogenotóxicas. O BPA não alterou a razão de expressão de Bcl-2/BAX,

mas induziu a superexpressão de Casp3 e Casp8, sugerindo que a apoptose foi induzida principalmente pela via extrínseca. O GSC reverteu parcialmente as alterações desencadeadas pelo BPA nas células ARPE-19. No entanto, o Se teve efeitos negativos inesperados nas células ARPE-19. **Conclusão:** Estes resultados sugeriram que o BPA induz alterações relevantes, independentemente do modelo estudado podendo estar associadas ao risco aumentado de DCNTs. Já o GSC® pode atenuar alterações nos marcadores oxidativos e genotóxicos relacionados à exposição das células ARPE-19, no entanto, suas propriedades antioxidantes, antiapoptóticas e genoprotetoras não foram universalmente compartilhadas, uma vez que o Se não apresentou impacto positivo.

Palavras-chave: Disruptor Endócrino. Doenças Crônicas não Transmissíveis. Estresse oxidativo. Inflamação. Multissuplemento. Compostos Naturais.

ABSTRACT

TOXICOGENOMIC IMPACT OF BISPHENOL A IN DIFFERENT EXPERIMENTAL MODELS AND REVERSAL POTENTIAL OF A FOOD MULTISUPPLEMENT

AUTHOR: Bárbara Osmarin Turra

ADVISOR: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

CO-ADVISOR: Profa. Dra. Fernanda Barbisan

Introduction: Bisphenol A (BPA) is a synthetic monomer widely used in the plastics industry. Considered an environmental pollutant, it acts as an endocrine disruptor. Its free forms in the body are associated with the development of chronic non-communicable diseases (NCDs). However, results related to the biological mechanisms through which BPA acts are still conflicting. It is possible that BPA causes oxidative and/or inflammatory imbalance regardless of the type of organism or cell. Therefore, to mitigate these effects, many studies focus on the properties of fruits and natural compounds, associated or isolated. **Objective:** to evaluate the toxicogenomic impact of BPA on oxidative, genotoxic, and inflammatory markers using an *in vivo* model of Californian red earthworms (*Eisenia fetida*) and an *in vitro* culture model of human retinal pigment epithelium cells (ARPE-19) and characterize the reversing potential of a multi-supplement based on Guarana (Gua), Selenium (Se) and L-Carnitine (LC) (GSC®). **Methodology:** The work is divided into two articles. In article 1, the impact of BPA on geno-oxy-inflammatory markers was evaluated *in vivo*: a) the effect of acute exposure (24 h and 72 h) of adult earthworms to different concentrations of BPA (0.1, 0.3, 1, 10 and 30 μM); b) BPA cytotoxicity and modulation of coelomocyte proliferation were determined by flow cytometry; c) The following oxidative markers were quantified by spectrophotometry: superoxide anion (O_2^-), nitric oxide (NO), lipoperoxidation (TBARS) and protein carbonylation (PCarb); d) The impact of BPA on coelomocyte DNA damage was determined via micronucleus (MN) assay; e) BPA changes in the immune efficiency of earthworms were tested through the coelomocyte exposure assay to dead yeast in which the formation of extracellular DNA networks and brown bodies was evaluated through cytohistological analyses; f) Genomic effect of BPA in modulating the expression of the *tool-like* receptor (eaTLR) and lumbricin 1 genes, via quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (*qRT-PCR*). In article 2, cells of the ARPE-19 lineage were exposed to BPA (0.001, 0.01, 0.1, 1, 3 and 10 μM) to determine the minimum concentration to induce cytogenotoxicity. b) ARPE-19 cells were then concomitantly exposed to the selected concentration of BPA, GSC and their isolated components (Gua, 1.07 mg/mL; Se, 0.178 $\mu\text{g/mL}$; and LC, 1.43 mg/mL); c) Flow cytometry, biochemical assays, *qRT-PCR*, genotoxicity, apoptosis and cell proliferation were evaluated. **Results:** The execution of protocol 1 showed that low concentrations of BPA induced an increase in the rate of coelomocyte proliferation, imbalance in the O_2^-/ON ratio, high frequency of MN and apoptosis. BPA also induced increased expression of the AMP1 gene, but lower efficiency in capturing

dead yeast. Already, the work carried out by protocol 2 results suggest that 10 μ M of BPA is sufficient to induce cytogenotoxic changes. BPA did not change the expression ratio of Bcl-2/BAX, but induced overexpression of Casp3 and Casp8, suggesting that apoptosis was mainly induced by the extrinsic pathway. GSC partially reversed the changes triggered by BPA in ARPE-19 cells. However, Se had unexpected negative effects on ARPE-19 cells. **Conclusion:** These results suggested that BPA induces relevant changes, regardless of the model studied, which may be associated with an increased risk of NCDs. GSC® can attenuate changes in oxidative and genotoxic markers related to exposure of ARPE-19 cells, however, its antioxidant, antiapoptotic and genoprotective properties were not universally shared, since Se did not have a positive impact.

Keywords: Endocrine Disruptor. Chronic non-communicable diseases. Oxidative stress. Inflammation. Multisupplement. Natural Compounds

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1-	Estrutura química do Bisfenol A (BPA).....	22
Figura 2-	Metabolismo do BPA.....	24
Figura 3-	Formas de absorção do BPA e consequências no organismo.....	25
Figura 4-	Semelhança da estrutura química do BPA e do estrogênio.....	26
Figura 5-	Mecanismos moleculares de interação do BPA	30
Figura 6-	Metabolismo Oxidativo.....	31
Figura 7-	Inflamação: Via clássica e alternativa	34
Figura 8-	Mecanismos da apoptose.....	39
Figura 9-	Vias de indução da resposta inflamatória crônica causada pelo BPA.....	40
Figura 10-	Estrutura morfológica da <i>Eisenia fetida</i>	42
Figura 11-	Guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke.....	46
Figura 12-	Selenometionina e selenocisteína: Principais formas orgânicas de selênio.....	48
Figura 13-	Estrutura química da L-carnitina	51
Figura 14-	Esquema do delineamento metodológico geral do ensaio <i>in vivo</i>	55
Figura 15-	Esquema do delineamento metodológico geral do ensaio <i>in vitro</i>	58

ARTIGO 1 (PUBLICADO)

Figure 1-	Schematic for obtaining the coelomic fluid used in the experiments, immune mechanisms involving in the pathogens capture by <i>E. fetida</i> earthworms, and general outline of the study.....	66
Figure 2-	BPA effects on <i>E. fetida</i> coelomocyte populations.....	67
Figure 3-	Cytotoxic BPA effect on <i>E. fetida</i> coelomocytes	68
Figure 4-	Effect of Bisphenol-A (BPA) at different concentrations on <i>E. fetida</i> coelomocytes cell cycle.....	69
Figure 5-	Comparison of total protein and oxidative markers in earthworms exposed to BPA at different concentrations (0.1–10 μ M), 24 h.....	70
Figure 6-	Representative DNA damage alterations in coelomocytes of <i>E. fetida</i>	71
Figure 7-	Bisphenol-A (BPA) effect on <i>E. fetida</i> immunocompetence markers.....	73
Figure 8-	Putative model of BPA effects on innate metabolism involving oxidate based in data described here using <i>E. fetida</i> as experimental model.....	75

ARTIGO 2 (ACEITO PARA A PUBLICAÇÃO)

CONTINUAÇÃO

Figure 1-	Impact of BPA on ARPE-19 cell viability as determined using the MTT (A) and ATP (B) assays. (C–F) Modulation of oxidative markers in ARPE-19 cells exposed to BPA at different concentrations.....	99
Figure 2-	Effect of bisphenol A (BPA) on the proliferation and micronucleus (MN) frequencies in ARPE-19 cells.....	101
Figure 3-	Representative microphotographs of ARPE-19 cells stained with Panopticon, in which nuclear and genetic materials are denoted by a purple color (200× magnification).....	102
Figure 4-	Effect of 3 µM bisphenol A (BPA), GSC, or its individual components (Gua = guarana, Se = selenium, LC = L-carnitine) on the apoptosis rate of ARPE-19 cells cultured for 72h.....	103
Figure 5-	Effect of treatment with the GSC multi-supplement and its individual components (Gua = guarana, Se = selenium, LC = L-carnitine) with or without bisphenol A (BPA) on the frequency (%) of ARPE-19 cells in the S+G2 phase of the cell cycle at 72h.....	104
Figure 6-	Differential expression of apoptotic genes (Bcl-2, BAX, Casp3, and Casp8) in ARPE-19 cells exposed to BPA, the GSC multi-supplement, and its individual components (Gua = guarana, Se = selenium, LC = L-carnitine).....	107

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Tabela 1 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para análise de expressão gênica.....	57
---	----

ARTIGO 1 (PUBLICADO)

Table 1 - Comparison of three main chromosomal alterations of <i>E. fetida</i> coelomocytes bisphenol-A (BPA) exposed at different concentrations...	71
Table 2 - Comparison of immunocompetence markers of <i>E. fetida</i> coelomocytes bisphenol-A (BPA) exposed at different concentrations.....	72

ARTIGO 2 (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)

Table 1 - Gene primers list.....	97
Table 2 - Interaction effect of BPA, the GSC multi-supplement, or its individual components on the oxidative stress markers and micronucleus (MN) frequency of ARPE-19 cells at 72 h.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP-1	Gene do Peptídeo Antimicrobiano
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARPE-19	Células do Epitélio da Retina Humana
ARs	Receptores de Andrógenos
AST	Aspartato Aminotransferase
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC®, Manassas, VA, USA)
ATP	Adenosina trifosfato
BBs	Corpos Marrons
BPA	Bisfenol A (4,4-isopropilidenedifenol; 2,2-bis (4-hidroxifenil) - propano)
C2C12	Células de Mieloblasto
CAT	Catalase
CO	Dióxido de Carbono
CoQ10	Coenzima Q10
CYP450	Citocromo P quatrocentos e cinquenta
DAMPs	do inglês, <i>damage-associated molecular patterns</i>
DCNTs	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DHT	5 α -dihidrotestosterona
DISC	do inglês, <i>Death-induced signaling complex</i>
DMEM/F-12	do inglês, <i>Dulbecco's modified eagle medium: Nutrient Mixture F-doze</i>
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E2	Natural 17 beta estradiol
EaTLR	Gene <i>Toll-like receptor</i>
EFSA	do inglês, <i>European Food Safety Authority</i>
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EMT	Transição Epitelial-Mesenquimal
eNOS	Óxido Nítrico Sintase
EPCs	Eritrócitos Policromáticos
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
ER	Receptores clássicos de estrogênio
ERK1/2	Quinase 1/2 regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ER α	Receptores clássicos de estrogênio alfa
ER β	Receptores clássicos de estrogênio beta
(FasL)	Fas-ligante
GPR30	Receptor de Estrogênio Acoplado a Proteína G
GPx	Glutationa peroxidase
GSC®	(Guaraná; Selênio; L- carnitina)

GSH	Glutationa
Gua	Guaraná
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAND2	Proteína 2 expressa em derivados do coração e da crista neural
Hep3B	Células de hepatoma humano
HepG2	Células de hepatoma humano
HOX	Proteína homeobox
IFN-γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL-1	Interleucina um
IL-10	Interleucina dez
IL-12	Interleucina doze
IL-1β	Interleucina um beta
IL-6	Interleucina seis
(iNOS)	A proteína óxido nítrico sintase induzível
IRF5	Regulador do Interferon Cinco
ISSO	do inglês, <i>International Organization for Standardization</i>
JNK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno
L- car	L- carnitina
MDA	Malondideído
MDT	Manual de Dissertações e Teses
miRNAs	microRNAs
MN	Micronúcleos
MOMP	do inglês, <i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
ncRNA	RNA não codificante
nNos	(óxido nítrico sintase neuronal).
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2, do inglês <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômica
OH	Hidroxila
ON	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOO-	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCarb	Carbonilação de Proteínas
PCEs	Eritrócitos Policromáticos
PPARs	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma
PPARγ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões

qRT-PCR	Do inglês, <i>quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RNA _m	RNA mensageiro
SBF	Soro Bovino Fetal
Se	Selênio
Se ²⁻	Seleneto
SeO ₃ ⁻²	Selenito
SeO ₄ ⁻²	Selenato
SLULT1A1	Fenol Sulfotransferase Simples de Fenol Um
SOD	Superóxido dismutase
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
Srebf1	Fator de transcrição um de ligação ao elemento regulador de esterol
Srebf2	Fator de transcrição dois de ligação ao elemento regulador de esterol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCD	Linfócitos T citotóxicos
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformador Beta 1
Th	Linfócitos Auxiliares
Th1	T <i>helper</i> um
Th2	T <i>helper</i> dois
Th9	T <i>helper</i> nove
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UGP	UDP-glucuroniltransferases polimórficas
UGT2B15	UDP glucuroniltransferases polimórficas da família dois membro B quinze

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	18
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	20
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 ASPECTOS QUÍMICOS – FARMACOLÓGICOS DO BISFENOL A	22
2.2 IMPACTO DO BISFENOL NA SAÚDE HUMANA	25
2.2.1 BPA e as interações com os receptores	26
2.2.2 BPA e interação com fatores de transcrição	27
2.2.3 Mecanismos epigenéticos regulados por BPA	28
2.3 POTENCIAL EFEITO DO BPA NO METABOLISMO OXIDATIVO.....	30
2.4 POTENCIAL EFEITO DO BPA NO METABOLISMO INFLAMATÓRIO	33
2.4.1 <i>Efeitos do BPA nas células imunes inatas</i>	33
2.4.2 <i>Efeitos do BPA nas células imunes adaptativas</i>	36
2.5 PROCESSOS APOPTÓTICOS E INFLUÊNCIA DO BPA.....	37
2.6 DESBALANÇO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO COMO POTENCIAL MECANISMO CAUSAL DO BPA EM DIFERENTES ORGANISMOS E CÉLULAS.	39
2.7 MINHOCAS COMO MODELO EXPERIMENTAL	40
2.7.1 Eisenia fetida	40
2.7.2 Eisenia fétida como modelo experimental	42
2.8 BPA EM CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA	43
2.9 LEGISLAÇÃO E REGULAMENTAÇÃO DO BPA.....	44
2.10 SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMO POTENCIAIS REVERSORES DE DCNTS.....	45
2.10.1 Guaraná	45
2.10.2 Selênio	47
2.10.3 L – carnitina	50
2.10.4 Multissuplemento GSC®	52
3 METODOLOGIA	53
3.1 ARTIGO 1 (PUBLICADO)	53
3.2 ARTIGO 2 (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)	55
4 RESULTADOS	59
4.1 ARTIGO 1 (PUBLICADO)	59
4.2 ARTIGO 2 (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)	81
5 DISCUSSÃO	123
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
ANEXO A – ACEITE PARA A PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 2	153

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), do ano de 2021. O presente estudo buscou avaliar o impacto toxicogenômico do BPA em marcadores oxidativos, genotóxicos e inflamatórios utilizando um modelo animal *in vivo* de minhocas californianas vermelhas (*Eisenia fetida*) que está apresentado na forma de um artigo (referido nesta tese como artigo 1), que foi publicado na Revista Contexto & Saúde classificada no Qualis Capes - Ciências Biológicas II como A4. A segunda parte do trabalho refere-se a um modelo *in vitro* de cultura de células do epitélio pigmentar da retina humana (ARPE-19) e o potencial reversor de um multissuplemento a base de Guaraná, L- carnitina e Selênio (GSC®) que está apresentado na forma de um artigo (referido nesta tese como artigo 2), aceito para a publicação à revista *Brazilian Journal of Biology* classificada no Qualis Capes - Ciências Biológicas II como A3. As seções “introdução”, “revisão bibliográfica”, “metodologia” e “resultados” encontram-se no início deste documento; na sequência, são apresentados, na íntegra, os dois artigos vinculados a esta tese, que seguem as regras de formatação das revistas em que foram publicado/submetido; as seções “discussão” e “considerações finais” encontram-se logo após os artigos. As referências listadas no final da tese incluem todas as citações referidas no decorrer deste documento, com exceção das referências utilizadas nos dois artigos, as quais estão listadas no final de cada um.

1 INTRODUÇÃO

O Bisfenol A (BPA) (4,4-isopropilidenedifenol; 2,2-bis (4-hidroxifenil) - propano) é um monômero de ordem molecular sintética, envolvido na constituição de polímeros de revestimento, tais como: plásticos e resinas epóxi, além de materiais médico-hospitalares e, recentemente em composições têxteis. Estudos de biomonitoramento humano têm indicado exposição generalizada e diária ao BPA. Um estudo americano determinou a concentração de BPA na urina da população em geral. Embora as percentagens encontradas mostraram-se diferentes em relação às etnias e grupos sociais, mais da metade das pessoas analisadas possuíam BPA residual na urina, sendo maiores em crianças em relação aos adultos e maiores em mulheres em relação aos homens (CALAFAT et al., 2008).

Esta exposição dá-se por ordem ambiental, ocupacional e alimentar (TARAFDAR et al., 2022). O potencial impacto do BPA e seus análogos ocorrem por estas moléculas serem disruptores endócrinos suspeitos de contribuir para desfechos adversos à saúde, como alterações no sucesso reprodutivo e no neurodesenvolvimento. Além disto, o BPA pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como é o caso dos cânceres, obesidade e outros distúrbios metabólicos (MUSTIELES et al., 2020).

Nesse contexto, as agências reguladoras de saúde de todo o mundo desenvolveram normativas a fim de diminuir o uso e, até restringir produtos que possuem na sua estrutura química o BPA. No Brasil, atualmente a tolerância diária do composto preconizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Ministério da Saúde) é de 0,6 mg/Kg. Entretanto, o uso do BPA é restrito em produtos voltados para lactentes (BRASIL, 2008).

Embora os efeitos do BPA já tenham sido relatados, ainda existe a necessidade de se compreender melhor os mecanismos e vias de atuação desta molécula e seus análogos, no organismo humano e animal. Isto porque, muitos resultados são conflitantes. Com base em estudos prévios publicados na literatura e compilados na revisão de MICHAŁOWICZ (2014) é possível inferir que o BPA tenha um efeito toxicogênômico indutor de alterações no metabolismo oxidativo e imune. Esta atuação ocorreria via uma cascata de eventos envolvendo modificações na concentração e no balanço de moléculas oxidativas e indução de genotoxicidade. Tais alterações contribuiriam assim, para o aumento de resíduos metabólicos indutores e

mantenedores de estados de inflamação crônica de baixo grau e de menor eficiência na resposta imune, por sua vez, estas condições contribuiriam para o estabelecimento de DCNTs. Acredita-se que, esta sequência de eventos citotéciduais desencadeados pelo BPA poderia ocorrer de modo similar em diferentes espécies animais ou mesmo de células humanas.

Os efeitos tóxicos já conhecidos da molécula levam ao desenvolvimento de pesquisas que utilizam de compostos naturais e\ ou associações entre eles como forma de reverter os danos, ou atenuar os mesmos. Considerando esta hipótese e estudos prévios do grupo, neste trabalho foram escolhidos o guaraná (Paullinia cupana) (Gua), o Selênio (Se) e a L-carnitina (L- car), dando origem ao multissuplemento GSC®.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto toxicogenômico do BPA em marcadores oxidativos, genotóxicos e inflamatórios utilizando um modelo animal *in vivo* (*E. fetida*) e um modelo *in vitro* (ARPE-19) e o potencial reversor de um multissuplemento à base de Gua, Se e L-car e isolados

1.1.2 Objetivos específicos

1.1.2.1 Ensaio *in vivo* (Artigo 1 - publicado)

Avaliar os efeitos da exposição aguda ao BPA em minhocas vermelhas (*E. fetida*) através da análise da:

- citotoxicidade de celomócitos;
- modulação dos marcadores oxidativos Superóxido (O_2^-), óxido nítrico (ON), Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e a Carbonilação de Proteínas (PCarb) no fluido celômico;
- indução de dano de DNA via identificação de alterações mutagênicas e clastrogênicas nos dois principais tipos de celomócitos (eleócitos e amebócitos);

- eficiência da resposta imunológica de celomócitos expostos a leveduras mortas por formação de redes extracelulares de DNA e de corpos marrons e, através da modulação na expressão dos genes *toll-like* receptor (eaTLR) e lumbricina (AMP1).

1.1.2.2 Ensaio *in vitro* (Artigo 2 – aceito para a publicação)

Avaliar os efeitos da exposição do BPA em células ARPE-19 através da análise da:

- viabilidade celular e de alterações citomorfológicas;
- modulação dos marcadores oxidativos O_2^- , ON, TBARS e PCarb;
- indução de dano de DNA via identificação de alterações mutagênicas e clastrogênicas;
- modulação da expressão de genes relacionados ao dano de DNA e apoptose (Bax, Bcl-2, Caspases 3 e 8).

Avaliar o potencial efeito reversor do multissuplemento GSC® e seus componentes isolados através da análise do:

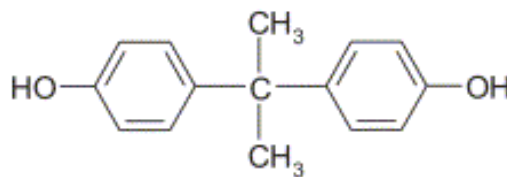
- ciclo celular e taxa de apoptose;
- genotoxicidade e expressão gênica relacionada à a apoptose;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS QUÍMICOS – FARMACOLÓGICOS DO BISFENOL A

Sintetizado pela primeira vez em 1891, pelo químico russo Alexander Pavlovich Dianin, o BPA é um composto químico com peso molecular de 228,29 g/cm³, sua forma sólida possui coloração clara e cristalina, com ponto de fusão de 156°C e ebulição de 220°C. Seu coeficiente de água-octanol é expresso na forma logarítmica 3,32 (log P = 3,32), que mostra sua boa solubilidade em gorduras e baixa solubilidade em água. O BPA pertence a um grupo de fenóis que possuem resíduo de hidroxila diretamente ligado a dois anéis aromáticos (Figura 1) (FLINT et al., 2012).

Figura1 – Estrutura química do Bisfenol A (BPA)



Fonte: MICHAŁOWICZ, 2014.

Legenda: Estrutura química do Bisfenol A. A cadeia da molécula é representada por um centro quiral ligado a dois anéis aromáticos do grupo dos fenóis.

Por se tratar de um monômero é amplamente utilizado na produção de plásticos de policarbonato e resinas epóxi. Estas matérias-primas são largamente utilizadas na produção industrial de recipientes de armazenamento, brinquedos, equipamentos médicos, entre outros (CALAFAT et al., 2009; CAO; CORRIVEAU; POPOVIC, 2009; FLEISCH et al., 2010; IRIBARNE-DURÁN et al., 2019; MOLINA-MOLINA et al., 2019 VANDENBERG et al., 2007). Recentemente, um estudo identificou a presença do BPA em materiais têxteis (FREIRE et al., 2019). Estima-se que a utilização do BPA cresça entre 6 e 10% ao ano (BERNARDO et al., 2015).

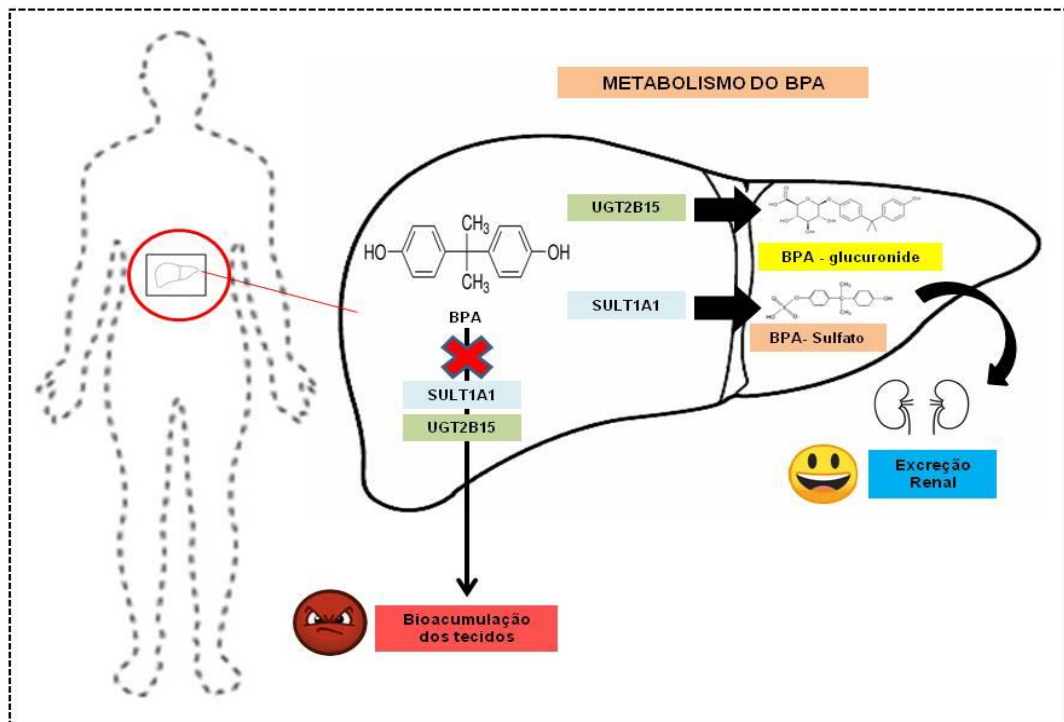
Por estar presente em produtos amplamente utilizados pela população a exposição humana ocorre, sobretudo por via ocupacional, vertical, ambiental e alimentar, sendo a alimentar de maior impacto e preocupação. A dieta é uma das fontes predominantes de exposição ao BPA devido à lixiviação dos materiais (BUCKLEY et al., 2019; VANDENBERG et al., 2010) e a capacidade migratória dos recipientes para os alimentos (EU, 2003), outras fontes e rotas também contribuem para a exposição humana como por exemplo: cutâneas e inalatórias, possuindo relevância toxicológica igual ou ainda maior do que fontes dietéticas (FREIRE et al., 2019; LIU; MARTIN, 2017; MOLINA-MOLINA et al., 2019; MORGAN et al., 2018; VON GOETZ et al., 2017).

O BPA tem uma meia-vida curta (TEEGUARDEN et al., 2016; YE et al., 2013), o BPA é ligeiramente absorvido após a administração oral e, é submetido a um metabolismo (Figura 2) de primeira passagem no fígado, com o auxílio das enzimas UDP-glucuroniltransferases polimórficas (UGP), especialmente a UDP-glucuroniltransferases da família 2 membro B15 (UGT2B15) sendo sua principal via de metabolização a glucorinadação. Ele não é extensivamente metabolizado através de reações de fase I, mas é rapidamente conjugado com ácido glucurônico (metabolismo da fase II) para o BPA não ativo - glucuronide na parede do intestino e fígado, tornando-se solúvel em água (INÁCIO, 2018).

Quantidades pequenas de BPA também podem reagir com sulfato para formar a BPA-sulfato, em uma reação de sulfatação (GEENS et al., 2012). Esta é mediada por sulfotransferases, também ao nível do sistema hepático, sendo a sua principal sulfotranferasea Fenol Sulfotransferase Simples de Fenol Um (SLULT1A1) (YALCIN et al., 2016).

A formação de conjugados de BPA é considerada um processo de desintoxicação e só as formas livres exibem atividade estrogênicas ou “nocivas”. Os BPA´s conjugados formados no fígado são transportados para o sangue seguidos da filtração pelo rim, sendo ainda, excretados na urina com meia-vidas terminais de menos de 6 horas. Assim, a exposição de BPA pode ser estimada a partir dos níveis urinários (SHINJE et al., 2021). O BPA ingerido por inalação ou contato com a pele não sofre efeito de primeira passagem e, portanto, é eliminado em um ritmo mais lento (ABRAHAM; CHO, 2009; COUSINS et al., 2002).

Figura 2 – Metabolismo do BPA



Fonte: A autora.

Legenda: A principal via metabólica do BPA ocorre no fígado, onde a degradação da molécula depende das enzimas UDP glucuroniltransferases polimórficas da família 2 membro B5 (UGT2B15) e Fenol Sulfotransferase Simples de Fenol Um (SULT1A1), envolvidas pelo processo de glucoronidação e sulfatação. Assim, as formas inativas são eliminadas na urina, via excreção renal. Este efeito tende a diminuir suas formas ativas, porém, é possível que isto não ocorra e a bioacumulação nos tecidos é efeito consequente, esta bioacumulação leva a prováveis desfechos patológicos.

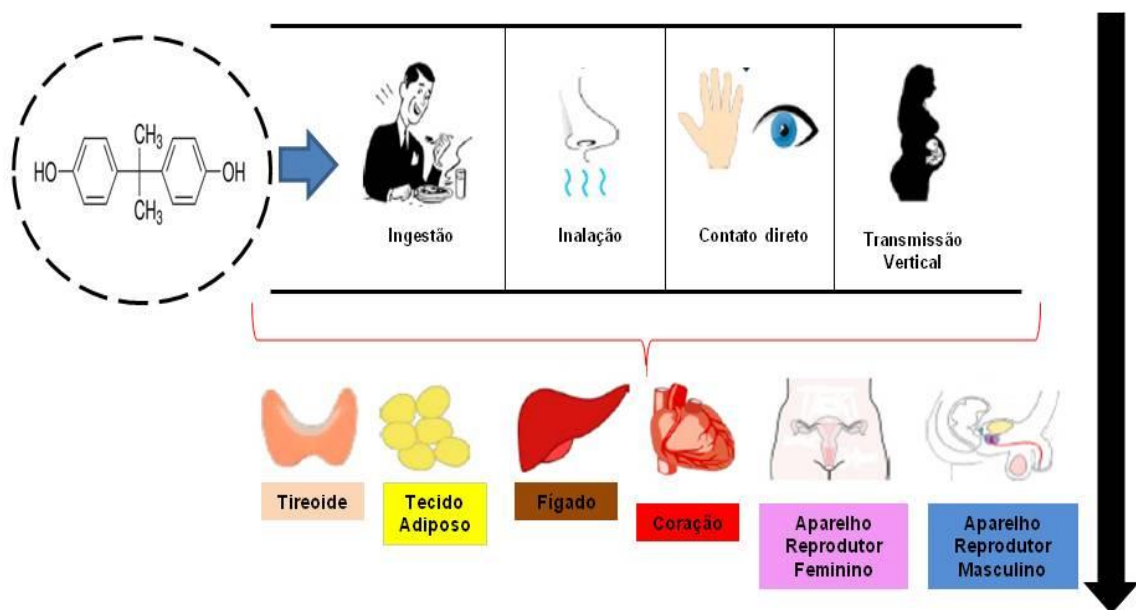
Com extensa distribuição, tem sido detectado bioacumulativamente em diversos órgãos como o fígado, a medula óssea, os testículos, a placenta, o cordão umbilical e até no feto. Este efeito bioacumulativo se dá pela alta afinidade lipofílica; Na gordura, o acúmulo de BPA é três vezes superior aos outros tecidos e assim, ocorre cronicidade do efeito que resulta em desequilíbrios homeostáticos e desordens patológicas (CSANÁDY et al., 2002; GENUIS et al., 2012).

2.2 IMPACTO DO BISFENOL NA SAÚDE HUMANA

Devido à alta e contínua exposição o BPA é associado a uma grande toxicidade. Essa toxicidade se dá através de interações com os hormônios sexuais (estrogênio e androgênio), hidrocarboneto aromático e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), portanto, interfere na função não só do sistema endócrino, mas também afeta outros sistemas do corpo, como o imunológico e nervoso (MICHAŁOWICZ, 2014; ROGERS; METZ; YONG, 2013; ROCHESTER, 2013).

Mesmo em concentrações muito baixas, o BPA tem a capacidade de interferir na atividade do hormônio tireoidiano, em induzir a proliferação de células tumorias e em impedir a síntese de testosterona quando em níveis já diminuídos. Os resultados das investigações mostram que o BPA exerce efeitos multidirecionais em organismos vivos porque interage com os receptores, gera Espécies Reativas De Oxigênio (EROs), altera a sinalização celular, provoca alterações mutagênicas e inibe a metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Essas alterações podem aumentar o risco de doença (Figura 3) cardíaca e distúrbios metabólicos, incluindo diabetes e obesidade (MICHAŁOWICZ, 2014).

Figura 3 – Formas de absorção do BPA e consequências no organismo.



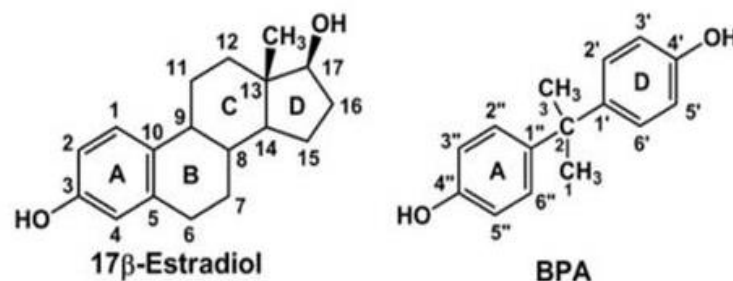
Fonte: A autora.

Legenda: O BPA pode ser absorvido por diferentes vias: A ingestão de alimentos em recipientes plásticos, a inalação de micropoluentes e o contato direto através da exposição ocupacional ou ambiental levam a quadros críticos, bem como, a transmissão materno-fetal, via cordão umbilical. De tal modo, estas vias são vistas como iniciadores de Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs), pois interferem nos tecidos e sistemas do organismo.

2.2.1 BPA e as interações com os receptores

Os estrogênios estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos, incluindo crescimento, desenvolvimento e a manutenção homeostática de vários órgãos e tecidos, isso tudo através da ligação e ativação dos receptores clássicos de estrogênio (ER) alfa (ER α) e beta (ER β). Além dos receptores clássicos, podem se ligar a uma ampla gama de compostos com diferentes, porém semelhantes estruturas, incluindo o BPA (Figura 4) (CIMMINO et al., 2020).

Figura 4 – Semelhança da estrutura química do BPA e do estrogênio.



Fonte: INÁCIO, 2018

Legenda: As cadeias estruturais do 17 β - Estradiol e do Bisfenol A permitem a visualização de suas semelhanças, que se concentram no grupo dos fenóis e radical hidroxila.

Neste caso, o BPA atua como o estradiol (ACCONCIA; PALLOTTINI; MARINO, 2015; ANGLE et al., 2020). Eles assumem semelhanças no gene da transcrição adipogênica (PHRAKONKHAM et al., 2008), com capacidade de inibir a secreção de adiponectina – importante na regulação glicêmica e no catabolismo de ácidos graxos

– (BEN-JONATHAN; HUGO; BRANDEBOURG, 2009; RUBIN et al., 2017). A ligação do BPA aos ERs desempenha um papel importante também na tumorigênese, aumentando a proliferação e migração (PTAK; GREGORASZCZUK, 2012; SONG et al., 2015), podendo ainda, inibir os efeitos pró-apoptóticos (DAIRKEE et al., 2013).

Em contraste com a sinalização genômica dos receptores nucleares, foi recentemente proposto que os efeitos de baixas concentrações de BPA na saúde humana podem ser mediados por receptores de membrana em um sistema não genômico, a fim de produzir respostas biológicas rápidas em alvos celulares específicos. O receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPR30) é expresso através de seu RNA mensageiro (RNAm) em vários tecidos e sistemas, como por exemplo a placenta, o pulmão, o fígado, a próstata, os ovários e o endotélio (CIMMINO et al., 2020; WANG et al., 2017). A interação BPA – GPR30 tem causado interferência direta no metabolismo da glicose, a qual possui a tolerância prejudicada conjunta ao ganho de peso corporal e a redução da secreção da insulina (GARCIA-AREVALO et al., 2014; MOON et al., 2015). O aumento do GPR30 está também associado à elevação de proteínas inflamatórias como interleucinas seis (IL-6) e oito (IL-8) importantes na resposta imune inata (CIMMINO et al., 2019), além de estar amplamente expresso em células cancerosas (CIMMINO et al., 2020).

Ainda, o BPA é capaz de exercer um efeito anti-androgênico (KOJIMA et al., 2019), competindo com 5 α -dihidrotestosterona (DHT) através da ligação aos receptores de andrógenos (ARs). Este efeito leva a consequências na espermatogênese, esteroidogênese, atrofia dos testículos e alteração dos parâmetros do espermatozoides, como menor contagem de espermatozoides, motilidade e densidade (MANFO et al., 2014).

2.2.2 BPA e interação com fatores de transcrição

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (*PPAR γ*) desempenham uma diversidade de efeitos biológicos: homeostase energética, adipogênese, proliferação celular, diferenciação e resposta imune (SOMM et al., 2009). É dependente da interação entre pequenos ligantes lipofílicos o que permite que a exposição ao BPA module diversas vias, desenvolvendo quadros de hiperglicemia em jejum, intolerância à glicose, e altos níveis de ácidos graxos não esterificados (GARCIA-AREVALO et al., 2014).

Assim como os PPAR γ 's, as proteínas de ligação ao intensificador CCAAT também recebem notada importância, já que estão associadas a disfunções e doenças hepáticas com expressão alterada de albumina, alfa-fetoproteína e glicogênio sintase, em contato com o BPA (DEBENEDICTIS; GUAN; YANG, 2016)

O fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2 (Nrf2) é outro fator de transcrição importante pois, atua contra danos oxidativos, regulando a expressão de proteínas antioxidantes (MA, 2013). Quando seu ciclo é alterado há um desbalço na produção de EROs e assim, na rota inflamatória (XU et al., 2018; XU et al., 2015).

Os genes Homeobox (Hox) são expressos durante a embriogênese e desenvolvimento inicial, sendo considerados reguladores transcricionais mestres. Em adultos, eles estão principalmente envolvidos na manutenção do fenótipo "normal" (LAPPIN et al., 2006). Quando expresso de forma inadequada associa-se a várias condições patológicas, incluindo gravidez ectópica, síndrome dos ovários policísticos (SOP), endometriose, hidrossalpinge e implantação inadequada do embrião (MALLO, 2018). Segundo alguns estudos o BPA aumenta a sua expressão (DEB et al., 2016; HUSSAIN et al., 2015).

A Proteína 2 expressa em derivados do coração e da crista neural (HAND2) está envolvida no estabelecimento de um ambiente embrionário adequado para a gravidez, sendo o BPA capaz de diminuir a expressão desta proteína no estroma uterino e assim, afetar a implantação do embrião e a formação da decídua durante as primeiras fases da gestação (LI et al., 2016); ela também está envolvida no desenvolvimento do sistema ventricular através das câmaras cardíacas (LOMBO et al., 2019).

2.2.3 Mecanismos epigenéticos regulados por BPA

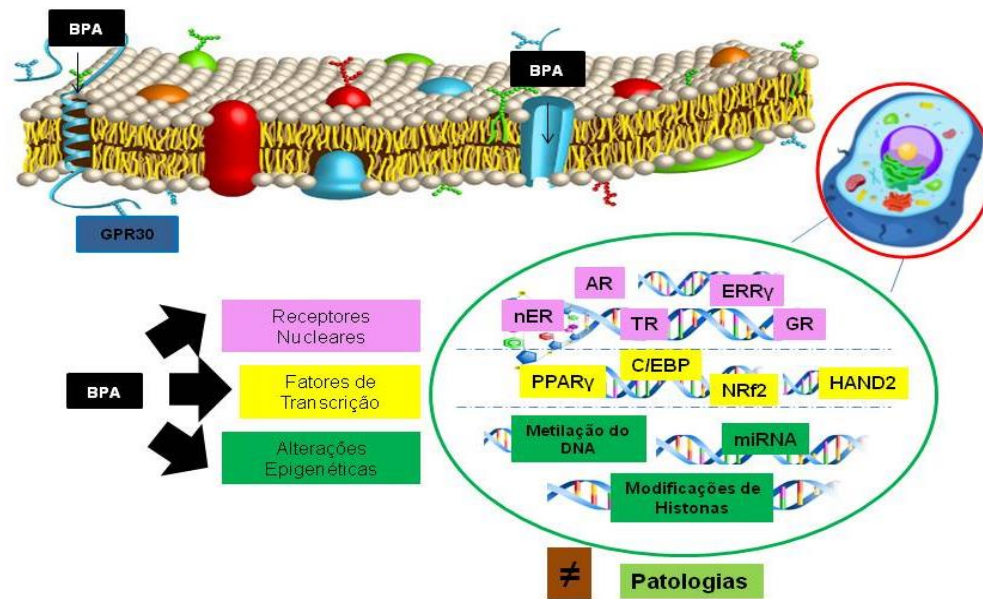
As alterações epigenéticas são modificações químicas hereditárias mitoticamente capazes de afetar a conformação tridimensional da cromatina e, conseqüentemente, a expressão gênica. Fatores ambientais como: agentes nutricionais e contaminantes xenobióticos modulam padrões epigenéticos, influenciando na metilação do DNA, modificações químicas pós-tradução de caudas de histonas, e pequenos níveis de RNA não codificante (ncRNA). Nesse contexto, evidências já sugerem que o BPA em sua capacidade interativa pode modular a metilação do DNA (BROMER et al., 2010; ZHU et al., 2021). A metilação do DNA não

é a única forma de interação do BPA, ele também tem a capacidade de interferir na expressão de múltiplos microRNAs (miRNAs), e assim desencadear uma série de interferências, que se originam em doenças (KILINGE, 2009).

A descoberta do composto como um causador de alterações epigenéticas levou a demonstrações indesejáveis das vias metabólicas, como a rota da insulina (LI et al., 2014), além de notáveis alterações na expressão dos genes de função hepática - fator de transcrição 1 e 2 de ligação ao elemento regulador de esterol (Srebf1; Srebf2) que estão envolvidos na síntese de lipídios. Assim, como uma cascata de eventos pode-se desenvolver quadros de obesidade pelo acúmulo hepático significativo de triglicerídeos e colesterol (KE et al., 2016).

A ação do BPA é iniciada através da ligação a receptores hormonais relativamente específicos, incluindo os sexuais e receptores do hormônio tireoidiano, regulando diretamente a expressão gênica. Não obstante, ações não genômicas rápidas podem ser mediadas pelos ERs associados à membrana e / ou GPR30, que por sua vez, podem alterar as vias de transdução de sinal, finalmente recrutando fatores-chave de transcrição envolvidos em crescimento e diferenciação, bem como, no metabolismo de energia e nutrientes. Sendo assim, todas as vias podem contribuir para modificações estáveis e hereditárias, por meio da regulação epigenética e enzimática, que também podem sustentar a exposição anterior ao BPA (Figura 5) (SINGH; LI, 2012).

Figura 5 – Mecanismos moleculares de interação do BPA



Fonte: Adaptado de CIMMINO et al., 2020.

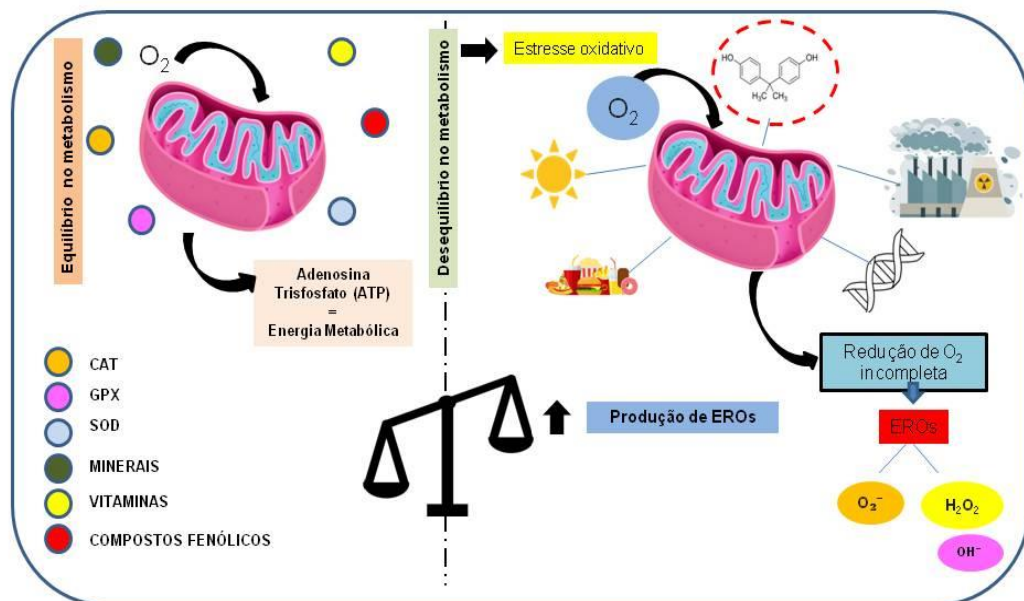
Legenda: O efeito do BPA dá - se através da interação com os receptores de membrana. E através da execução de segundos mensageiros, como é o caso da associação com o Receptor de Estrogênio Acoplado a Proteína G (GPR30). Após a entrada na célula, receptores de núcleo e fatores de transcrição são tidos como ligantes para inúmeros genes e proteínas, assim, os processos sofrem interferência e a homeostase do organismo é atingida. Ainda, a modificação da conformação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), leva a padrões de expressão instáveis. Todas essas alterações são condizentes com o desenvolvimento de momentos de estresse oxidativo e inflamação crônica de baixo grau, importantes na fisiopatologia das Doenças Crônicas Não- Transmissíveis (DCNTs).

2.3 POTENCIAL EFEITO DO BPA NO METABOLISMO OXIDATIVO

O metabolismo oxidativo (Figura 6) é um processo que ocorre na mitocôndria, no qual a molécula de oxigênio (O_2) é utilizada para a produção de energia. O O_2 passa pela cadeia transportadora de elétrons gerando a Adenosina Trisfosfato (ATP), ou seja, realiza a formação da energia metabólica (VITALE et al., 2013).

Quando há um desequilíbrio no metabolismo, ocorre o estresse oxidativo e o desbalanço fica entre a maior produção e/ou queda na neutralização das EROs, pelos sistemas antioxidantes do organismo. Assim, quando a redução de O_2 é incompleta consequentemente há a formação de diferentes EROs, dentre elas o O_2^- e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), considerados as principais espécies causadoras de danos às células (VITALE et al., 2013). O H_2O_2 é capaz de gerar outros EROs, sendo o principal deles o radical hidroxila (OH^-) que apresenta grande afinidade com o DNA que passa a sofrer os respectivos danos. Vale ressaltar que o organismo não possui defesas contra o OH^- . Esse desbalanço pode ocorrer pela exposição de diferentes fatores, como exógenos (BARBISAN, 2014; PERL, 2013).

Figura 6 – Metabolismo Oxidativo



Fonte: A autora

Legenda: A mitocôndria é responsável pela produção da energia metabólica através da redução de oxigênio (O_2) e formação de moléculas de Adenosina Trifosfato (ATP). Importantes moléculas antioxidantes permitem o equilíbrio metabólico, tais como Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPX), Superóxido Dismutase (SOD) além, de moléculas obtidas através da dieta (minerais, vitamina e compostos fenólicos). Por vezes ocorre um desequilíbrio do metabolismo oxidativo, em que muitos agentes são estressores e potenciais desencadeadores como mostra a figura: a Luz UV, dieta desequilibrada, poluição atmosférica, fatores genéticos e o próprio Bisfenol A (representado por sua molécula, no interior de um círculo vermelho). Esses estressores levam a redução incompleta de (O_2) e assim a produção aumentada de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) como o Superóxido (O_2^-) e o Peróxido de

Hidrogênio (H_2O_2) - este último leva a formação do radical hidroxila (OH) que apresenta grande afinidade com a molécula do Ácido Desoxirribonucleico (DNA). Esta condição é “porta” para quadros estabelecidos de inflamação crônica de baixo grau, e as respectivas doenças, como por exemplo, as neoplasias.

O BPA é um fator exógeno. Embora em sua maioria ele se transforme em formas menos tóxicas, ainda assim, ocorre a presença residual e circulante em sua forma tóxica. A sua forma livre leva a formação destes EROs (GASSMAN, 2017). Assim, o dano ao DNA é induzido, e a citotoxicidade é uma notável consequência. As macromoléculas celulares são danificadas, e conseqüentemente ocorre a quebra de fitas de DNA e o rompimento das ligações cruzadas de proteínas (DEAVALL et al., 2012 , ORRENIUS et al., 2011).

Além de produzir EROs, o processamento enzimático do BPA pelo citocromo P quatrocentos e cinquenta (CYP450) também gera a forma quinona reativa ao DNA (CAVALIERI; ROGAN, 2010). Quinonas tem efeitos tóxicos e deletérios no corpo humano, devido a alteração na estrutura da cromatina, o sistema de reparo não se desenvolve adequadamente, isto porque a sinalização das vias não consegue ser acionada. Esta influência direta no desempenho do DNA e o desequilíbrio celular contribuem significativamente para a mutagenicidade e genotoxicidade, incluindo o desenvolvimento de cânceres (ALLARD; COLAIÁCOVO, 2010; FERNANDEZ et al., 2012; GASSMAN et al., 2015 , PORRECA et al., 2016).

Outro importante fator da molécula de BPA é a interação que esta possui com as mitocôndrias. De natureza lipofílica, o BPA pode se acumular na membrana mitocondrial, e assim inibir a produção energia metabólica. O ATP intracelular passa a ficar em níveis reduzidos, e a respiração da organela é atingida, devido a incompleta fosforilação oxidativa (NAKAGAWA; TAYAMA, 2000).

Particularmente, uma vez que as mitocôndrias não têm o conjunto completo de vias de reparo de DNA contidas no núcleo, o dano ao DNA da mitocôndria, também pode induzir mutações. Em tese, o BPA promove a geração de EROs que levam a disfunção mitocondrial e promovem mudanças em várias vias de sinalização celular. Isso indica que sua forma não conjugada, ou seja, ativa/ livre e seus numerosos metabólitos têm efeitos de exposição mais significativos do que os originalmente considerados. Esse conjunto de efeitos independe de suas propriedades de desregulação endócrina, podendo produzir uma série de efeitos pleiotrópicos

(influencia em mais de uma característica no indivíduo). e influenciar profundamente o desenvolvimento de doenças (CLINE, 2012).

2.4 POTENCIAL EFEITO DO BPA NO METABOLISMO INFLAMATÓRIO

O papel do BPA nas células imunes e no consequente metabolismo inflamatório, ainda não está bem elucidado, porém, sabe-se que a maneira como os processos se desenvolvem são dependentes da concentração e do tempo de exposição (MURATA; KANG, 2018).

2.4.1. Efeitos do BPA nas células imunes inatas

2.4.1.1 Macrófagos

Os macrófagos desempenham papel fundamental na regulação dos processos inflamatórios agudos e principalmente crônicos, por meio da secreção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FULLERTON; GILROY, 2016). Estas células potencializam a ativação de linfócitos T e B pela expressão de moléculas coestimuladoras, liberando assim, as citocinas pró - inflamatórias como a Interleucina um (IL-1), a IL-6, a Interleucina doze (IL-12) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF – α). Os macrófagos também são responsáveis pela síntese de alguns EROs (O_2^- , OH, H_2O_2) e intermediários reativos do nitrogênio, cujo seu principal representante é o ON (CRUVINEL et al., 2010).

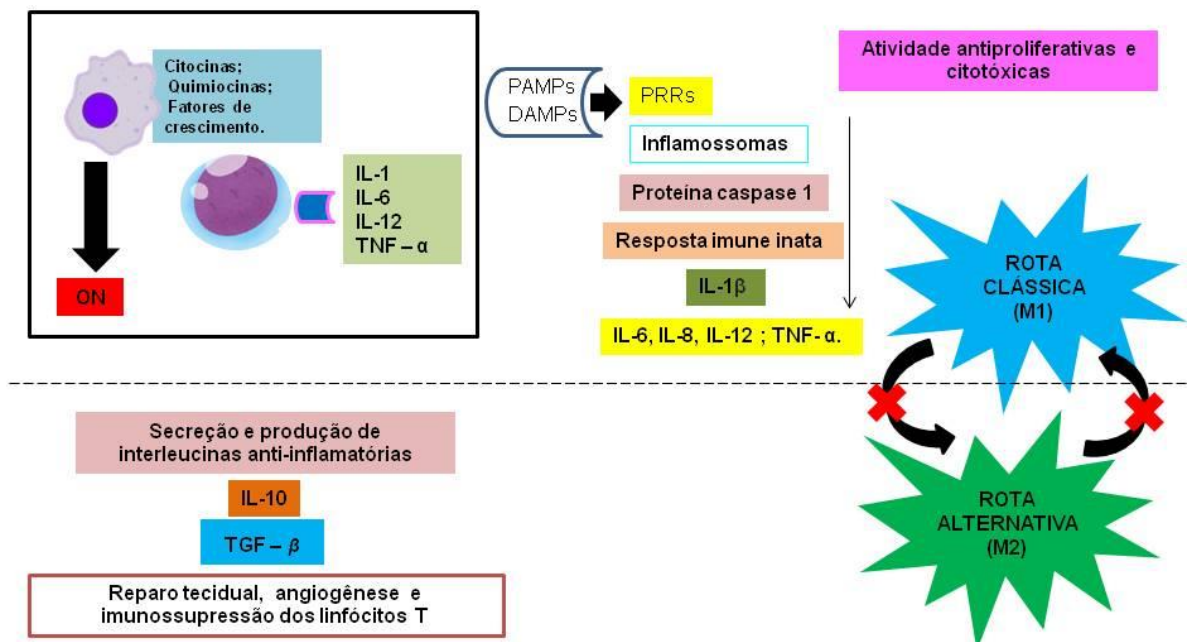
A rota inflamatória (Figura 7) inicia-se quando os receptores de reconhecimento de hospedeiros PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) são capazes de identificar segmentos moleculares conservados, os PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Pattern*), ou por padrões moleculares associados a danos DAMPs (do inglês, *Damage-associated molecular pattern*). Alguns PRRs promovem a defesa do organismo via ativação de inflamossomas (LACKEY; OLEFDKY, 2015).

Os inflamossomas são complexos macromoleculares que se unem ao citoplasma e ativam a proteína caspase 1, sendo a mesma responsável pela ativação da resposta imune inata (CRUVINEL et al., 2010; FULLERTON; GILROY, 2016). A caspase 1 é responsável depois de ativada por desencadear o processo conhecido

como piroptose, a clivagem proteolítica da pró – interleucina 1 β , que posteriormente leva a formação da IL-1 β madura, que por sua vez, induz o processo inflamatório pela síntese de macrófagos de outras citocinas, como a IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α (ROITT et al., 2014).

Com isso, é sabido e destaca-se que em inflamações agudas ocorre a ativação clássica da rota denominada de M1 e, em seguida ocorre à ativação da rota alternativa, denominada de M2. Logo, os macrófagos M1 são representativos da via clássica, exercendo atividades antiproliferativas e citotóxicas, sendo produto da secreção de ON, EROs e as citocinas pró- inflamatórias anteriormente mencionadas. Enquanto, os macrófagos M2 representam a via alternativa com capacidade de inibir estas funções, ou ações executadas pelos macrófagos M1, que conseqüentemente realizam a secreção e produção de interleucinas anti-inflamatórias, como a Interleucina dez (IL-10) e o TGF – β ; (do inglês, *Transforming growth factor – beta*), favorecendo o reparo tecidual, induzindo angiogênese, além de imunossuprimirem a atividade dos linfócitos T (BRUNE et al., 2013).

Figura 7– Inflamação: Via clássica e alternativa



Fonte: A autora

Legenda: Os macrófagos são importantes células do sistema imune inato, são eles os precursores de muitas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento envolvidos na ativação dos linfócitos T e a consequente liberação pró – inflamatória. O processo inflamatório inicia-se quando os PRRs (do inglês, Pattern Recognition Receptors) são capazes de identificar segmentos moleculares conservados, os PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Pattern*) ou por padrões moleculares associados a danos DAMPs (do inglês, *Damage-associated molecular pattern*). Alguns PRRs promovem a defesa do organismo via ativação de inflamossomas que são capazes de ativar a caspase 1 que consequentemente ativa a interleucina um beta (IL -1 β), que por meio dos macrófagos e linfócitos, leva a síntese de outras citocinas inflamatórias, assim, constitui-se a rota clássica (M1). Já a rota alternativa (M2), funciona como um processo de *feedback* negativo, em que os fatores anti-inflamatórios são liberados, promovendo a interrupção da atividade dos M1, levando ao reparo tecidual e suprimindo a atividade das interleucinas, complementando o processo inflamatório total.

Além disso, eles expressam as duas isoformas ER (ER α e ER β) pelas quais o BPA pode exercer seus efeitos, e ativar a rota (CAMPEI et al., 2017). Mesmo que em concentrações baixas, o BPA pode potencializar a produção de ON e assim, estimular a produção de IL-1, IL-6 e IL-12 (KUAN et al., 2012; YAMASHITA et al., 2005).

Ainda, sabe-se que o BPA pode promover a regulação positiva em M1, na expressão do fator regulador do interferon cinco (IRF5), bem como o TNF- α e IL-6, enquanto os M2 sofrem regulação negativa de IL-10 e o TGF- β , com isso a produção de EROs é aumentada e a morte celular por apoptose pode ser induzida (LU et al., 2019; LIU et al., 2014; YANG et al., 2015).

Em resumo, o BPA altera as funções dos macrófagos, diminuindo a secreção de citocinas, ativando o fenótipo M2 e gerando um “quadro” de imunotoxicidade; Isto pode refletir na alteração de algumas vias de sinalização relacionadas à resposta imune (LIU et al., 2020).

2.4.1.3. Granulócitos

Os granulócitos são as células imunes inatas mais abundantes. Eles são divididos em: neutrófilos, que constituem entre 90 e 95% de sua totalidade, eosinófilos de 3 a 5% e basófilos menos de 1%. Na literatura, existem poucos relatos sobre o efeito do BPA nessas células, porém, sabe-se que o BPA, mesmo em concentrações doses baixas tem a capacidade de elevar a expressão da proteína integrina CD18, a diferenciação neutrofílica e a produção de O₂⁻ (WATANABE et al., 2003).

Os eosinófilos – que são as principais células envolvidas na alergia e patogênese da asma – são hiperestimuladas quando em contato com a molécula, e assim, há uma consequente ativação da capacidade de resposta das vias aéreas. De tal modo que, o recrutamento de eosinófilos nos alvéolos e submucosa das vias aéreas leva a altos níveis de citocinas e quimiocinas, que tem papel importante no agravo destas doenças imunomediadas (MIDORO-HORIUTI et al., 2010).

2.4.1.4 Mastócitos

Envolvidos nos processos alérgicos e inflamatórios, os mastócitos são as células residentes nos tecidos. Essas células são caracterizadas por seu alto conteúdo de grânulos citoplasmáticos que contém mediadores pré-formados (amina vasoativa histamina, proteases e citocinas). Os mastócitos podem ser ativados por uma variedade de estímulos por meio de numerosos receptores em sua superfície. O mecanismo de ativação dos mastócitos mais estudado é a resposta mediada pela imunoglobulina “E” (IgE), que pode ser dividida em dois estágios; no primeiro estágio, a IgE produzida pelos plasmócitos se liga a superfície dos mastócitos, levando a um estado de sensibilização. Já em um segundo momento, o antígeno se liga à IgE da superfície, que desencadeia a degranulação dos mastócitos e liberação dos mediadores (ARAIZA et al., 2020).

O papel do BPA tem sido associado à sensibilização ao patógeno. Essa sensibilização leva um aumento nos leucotrienos, prostaglandinas e interleucinas, sugerindo maior ativação dessas células e a desregulação do mecanismo condicionando a inflamação de baixo grau (O'BRIEN; DOLINOY; MANCUSO, 2014).

2.4.2 Efeitos do BPA nas células imunes adaptativas

2.4.2.1 Linfócitos T e B

Os linfócitos T são as células do sistema imune adaptativo, sendo divididos em linfócitos T citotóxicos (TCD) ou linfócitos T auxiliares (Th), que se diferenciam em Th um, dois, nove, etc (Th1; Th2; Th9) – conforme a secreção de citocinas e as vias de resposta-. Essas células expressam diferentes receptores hormonais, os quais são responsáveis pelas suas ativações (KLEIN; FLANAGAN, 2016).

De tal modo que, o BPA realiza a interação com essas células através destes receptores hormonais, e notadamente desenvolve um processo com os diversos e diferentes Th's, podendo, por exemplo, aumentar os níveis de secreção de interleucinas inflamatórias e fatores de crescimento. Todos esses compostos ativados e secretados, permitem inúmeras formas de resposta e vias, alterando o sistema como um todo e sendo precursor de diversas doenças (ARAIZA et al., 2021).

Os linfócitos B são células cuja importância reside na imunidade humoral, pois são capazes de se diferenciar em células plasmáticas responsáveis pela produção de anticorpos como, por exemplo, a IgE. A exposição ao BPA pode modificar a maneira como esses anticorpos são produzidos, isto depende do estímulo e afinidade, mas a geração das imunoglobulinas é inversamente proporcional à dose de exposição, assim como as hiperreações (ARAIZA et al., 2021).

Com isso, podemos considerar que o BPA tem alta capacidade de modular os processos inflamatórios e imunes, com diferentes formas de respostas, sendo elas, por vezes inibidas e por vezes altamente estimuladas. Nesse contexto, o processo de homeostase dos sistemas assume perfis e características diferentes entre concentração- resposta e BPA- indutores.

2.5 PROCESSOS APOPTÓTICOS E INFLUÊNCIA DO BPA

A apoptose é considerada o principal mecanismo envolvido na morte celular fisiológica. Essa denominação se dá para conceituar uma série de seguidas alterações morfológicas. Entre os processos que acontecem podemos citar: retração celular, perda do contato com células vizinhas, condensação da cromatina e formação de vacúolos citoplasmáticos que levam à formação de bolhas na célula, também chamados de corpos apoptóticos. Bioquimicamente, ocorre o aumento de cálcio e EROs, além da diminuição no potencial da membrana mitocondrial interna, ativação de proteases seletivas e clivagem do DNA (HUANG et al., 2018).

A morte celular causada pelo processo apoptótico é caracterizada pela ativação das caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) que são recrutadas em grandes complexos de proteínas, onde são submetidas à oligomerização e se ativam. O complexo de sinalização indutor de morte DISC (do inglês, *Death-induced signaling complex*), juntamente com o apoptossomo, são os

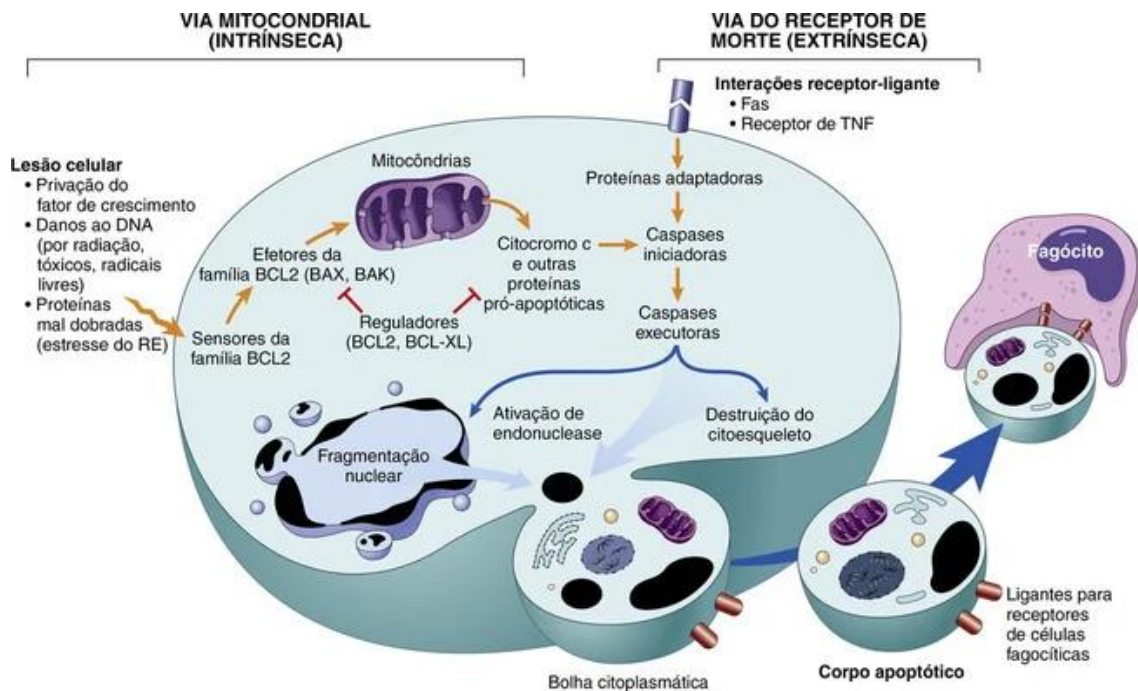
principais complexos responsáveis pela ativação das caspases iniciadoras e ambos estão intimamente ligados à ativação das vias intrínseca e a extrínseca (BONTEMPO et al., 2009).

A via extrínseca da apoptose é desencadeada pela ativação de ligantes dos receptores de morte, tais como o TNF, Fas-ligante (FasL) e o TRAIL. O Fas é um dos receptores de morte mais bem caracterizados e desempenha um papel crucial em uma variedade de processos imunológicos. A agregação destes receptores com a molécula FADD (Fas-associated death domain) promove o recrutamento e a ativação das caspases 8 e 10, iniciando a formação do DISC. Em algumas células, a ativação de caspase 8 leva à clivagem de pró-caspase 3 e ativação de caspase 3, que é considerado o ponto irreversível de morte dependente de caspases (ELMORE, 2007).

Em contrapartida, a via intrínseca da apoptose é iniciada quando as proteínas apoptogênicas, especialmente o citocromo c, são liberadas a partir do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol, essa liberação ocorre em resposta a uma variedade de danos. O extravasamento de tais proteínas se dá quando poros na membrana externa mitocondrial se abrem; esse processo é chamado de permeabilização da membrana externa mitocondrial MOMP (do inglês, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) que resultará no desequilíbrio do potencial da membrana. A abertura desses poros é controlada por proteínas que são membros da família Bcl-2. Elas podem ser divididas em proteínas pró-apoptóticas: Bax e Bak, que quando oligomerizam-se promovem a abertura dos poros e proteínas anti-apoptóticas: Bcl-2 e Bcl-xL, que quando associadas com Bax e Bak as inativam (OBENG, 2021).

Nesse contexto, sabe-se que as vias podem ser estimuladas ou ativadas pelos xenobióticos, como é o caso do BPA. Um recente estudo demonstrou que a exposição ao BPA aumentou significativamente as taxas de apoptose e a atividade da enzima caspase, o que contribuiu para estados descompensados de metabolismo celular que assumem perfis de iniciadores patológicos (WANGA; ZHAO; JI, 2019).

Figura 8- Mecanismos da apoptose



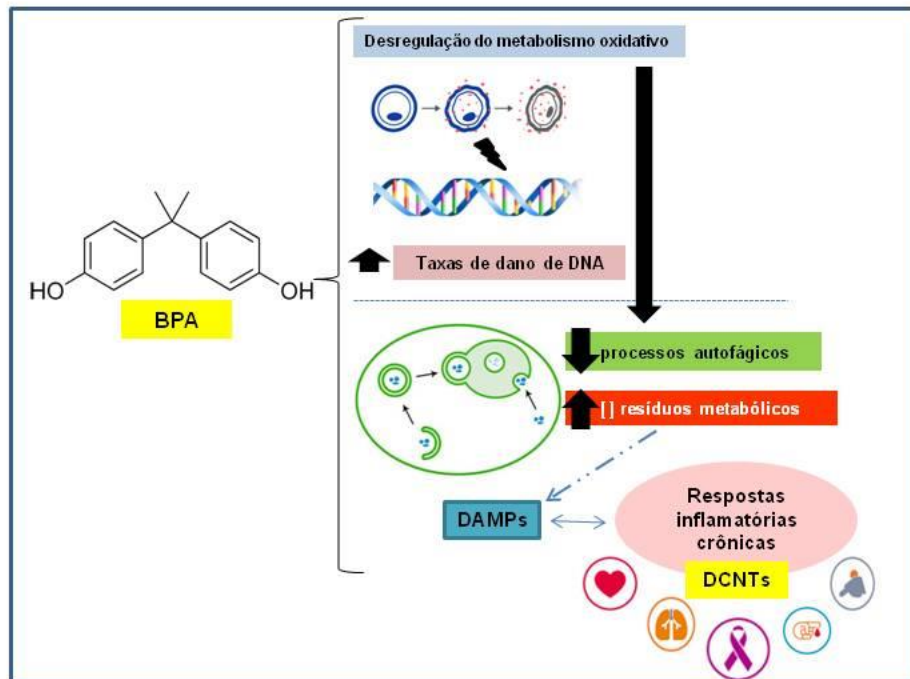
Fonte: ROBBINS AND COTRAN, 2017.

Legenda: As duas vias de apoptose diferem em sua indução e regulação, e ambas culminam na ativação de caspases. Na via mitocondrial, proteínas da família BCL2, que regulam a permeabilidade mitocondrial, tornam-se desequilibradas, e a liberação de várias substâncias da mitocôndria leva à ativação de caspases. Na via do receptor de morte, sinais de receptores da membrana plasmática levam à montagem de proteínas adaptadoras em um “complexo de sinalização incluindo a morte”, que ativa caspases, e o resultado é o mesmo.

2.6 DESBALANÇO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO COMO POTENCIAL MECANISMO CAUSAL DO BPA EM DIFERENTES ORGANISMOS E CÉLULAS

Considerando as evidências publicadas na literatura é possível que o BPA atue via uma cascata de eventos que envolvam: (1) desregulação do metabolismo oxidativo aumentando as taxas de dano de DNA e oxidação de outras macromoléculas celulares (lipídios e proteínas); (2) diminuição em processos autofágicos aumentando a concentração de resíduos metabólicos que têm a capacidade de induzir respostas inflamatórias. (3) Estes resíduos são os DAMPs e funcionam similares a patógenos, induzindo respostas inflamatórias crônicas presentes na etiopatologia de diversas DCNTs (OLCUM et al., 2019) (Figura 9).

Figura 9 – Vias de indução da resposta inflamatória crônica causada pelo BPA



Fonte: A autora

Legenda: O BPA é potencialmente capaz de desregular o metabolismo oxidativo e aumentar a taxa de dano ao Ácido Desoxirribonucleico (DNA). Nesse contexto, os processos autofágicos não desempenham seu papel com êxito, estando sua eficiência diminuída e assim, a ocorrência do aumento de resíduos metabólicos. Os resíduos metabólicos então, são reconhecidos pelos DAMPs (do inglês, *Damage-associated molecular pattern*), que são importantes efetores das respostas inflamatórias e permitem estados crônicos de baixo grau, precursores das Doenças Crônicas Não – Transmissíveis (DCNTs).

Para testar esta hipótese, estudos em diferentes modelos experimentais são necessários, sejam eles em diferentes espécies ou diferentes células humanas.

2.7 MINHOCAS COMO MODELO EXPERIMENTAL

2.7.1 *Eisenia fetida*

As minhocas são invertebradas ectotérmicas pertencentes à classe Clitellata, caracterizadas por possuírem clitelo - uma estrutura reprodutiva particular desses anelídeos - (BRIONES; ÁLVAREZ-OTER, 2018). Elas são segmentadas, tanto internamente quanto externamente. A divisão ao longo do corpo é marcada por septos

transversais que separam o celoma em cavidades. O celoma encontra-se em todo o corpo (Figura 10) da minhoca e, é preenchido pelo fluido celômico (ROUBALOVÁ et al., 2015).

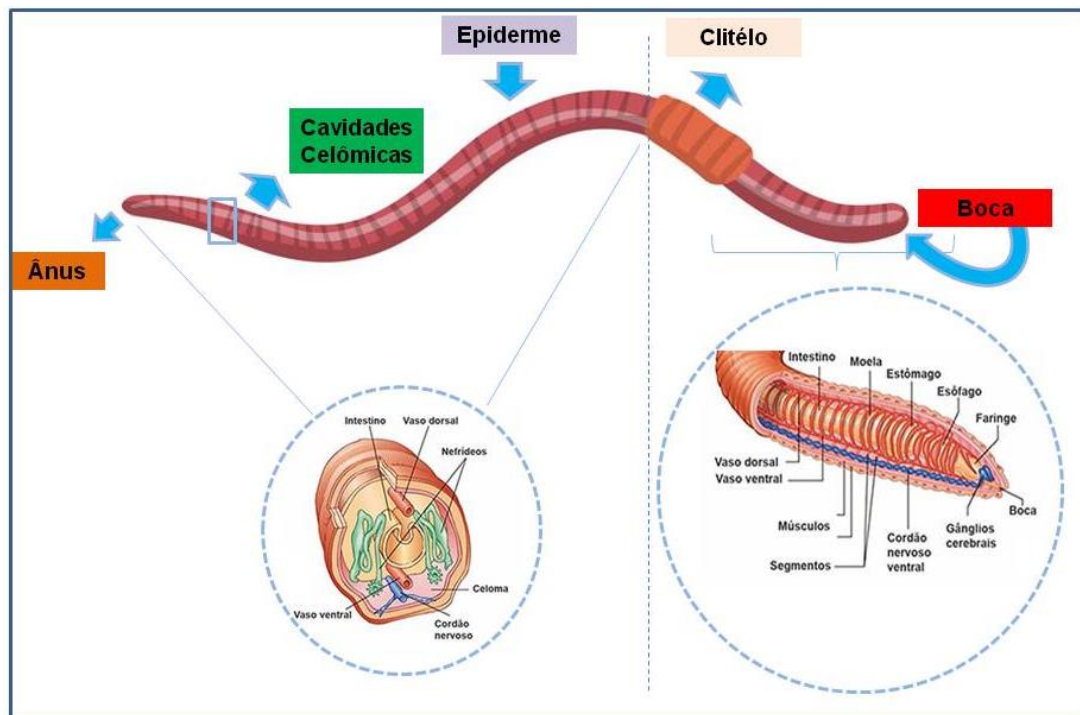
Em cada segmento, é possível observar cerdas laterais quitinosas que aumentam a tração ao substrato. O primeiro segmento corresponde à boca da minhoca, enquanto o último segmento pertence ao ânus. Seu sistema vascular é fechado, com vaso dorsal e ventral e um cordão nervoso ventral. Já a reprodução é hermafrodita, caracterizada na maturidade pelo clitelo (SIVAKUMAR et al., 2015).

Elas alimentam-se essencialmente de matéria orgânica e possuem um sistema digestivo relativamente simples formado por: boca, faringe, esôfago, moela, papo e intestino (SHARMA et al., 2005). O tegumento das minhocas é constituído pela epiderme, que consiste numa única camada epitelial ou pseudoestratificada. Subjacentes à epiderme encontram-se os tecidos conjuntivo e muscular que formam a maior parte da parede do corpo da minhoca (SILVA, 2020).

O epitélio epidérmico é formado por células de suporte (colunares), células basais (confinadas às regiões basais) e por dois tipos de células calciformes secretoras de muco: células ortocromáticas e células metacromáticas. O controle deste tipo de secreção é modulado por substâncias bioativas, como a serotonina, endotelina e a enolase (SILVA, 2020).

As células ortocromáticas são dotadas por um complexo de mucopolissacáridos, proteínas e lipídios neutros (definidas como tipo I), e as células metacromáticas secretam mucinas carboxiladas, levemente sulfatadas (definidas como tipo II, III e IV). De uma forma generalizada, o muco secretado por estas células é responsável pela proteção contra a desidratação e o desequilíbrio metabólico, absorção de metabólitos e proteção contra parasitas (MASTRODONATO et al., 2005).

Figura 10 – Estrutura morfológica da *Eisenia fetida*



Fonte: A autora.

Legenda: A imagem ilustra a minhoca *Eisenia fetida*. Em sua morfologia é possível observar seus segmentos que acompanham todo o corpo, além de possuir clitelo – importante estrutura que define a maturidade animal. O primeiro segmento corresponde à boca da minhoca, enquanto o último segmento pertence ao ânus. Seu sistema vascular é fechado, com vaso dorsal e ventral e um cordão nervoso ventral. O sistema digestivo é relativamente simples formado por: boca, faringe, esôfago, moela, papo e intestino.

2.7.2 *Eisenia fetida* como modelo experimental

Por possuir uma estrutura evolutivamente organizada, o uso da *Eisenia fetida* começou a ganhar destaque em muitos ensaios e pesquisas, por isso tornou-se um organismo padrão para testes ecotoxicológicos pela OECD (2004) e, passou a ter variados testes registrados na ISO (do inglês, *International Organization for Standardization*) (ISO 17512-1:2008(en)).

Desde então, a minhoca californiana tem contribuído para a compreensão da ação de agentes tóxicos como o próprio BPA (BABIC et al., 2016; NOVO et al., 2018), além da tifulzamida (YAO et al., 2019), e de metais pesados (HUANG et al., 2020),

bem como, em avaliações utilizando fármacos, como ciprofloxacino (YANG; YUANBO; WANG, 2020), albendazol (GAO et al., 2016), benzovindiflupir (YAO et al., 2021) e fluoroquinolona (MÁRQUEZ-LÁZARO et al., 2021).

Embora o seu uso esteja em ênfase, poucas pesquisas se destinam a avaliar os mecanismos causais e potenciais iniciadores de DCNTs. A exposição a agentes tóxicos representa uma atual via de estudo para a caracterização das manifestações e alterações de metabolismo, especialmente o óxi-inflamatório. Em ensaios prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa, os padrões comportamentais de *E. fetida* foram alterados em exposição aguda a rotenona (JUNG et al., 2021) por exemplo, outro estudo do grupo demonstrou que a inflamação aguda pode ser modulada em celomócitos de *E. fetida* quando expostos a bebidas cafeinadas (ALVES et al., 2019). E mais recentemente, a fisiologia de resposta das minhocas em relação ao metabolismo oxidativo e inflamatório foi conceituado (TEIXEIRA et al., 2021).

Tais estudos nos asseguram do modelo experimental e nos demonstram a sua ampla utilização, que vão desde o entendimento de ação- resposta, até tratamentos e os modelos de ecotoxicidade. Por isso, este trabalho visa entender os mecanismos de um agente ecotóxico de alta exposição em relação a sua forma de metabolismo e efeito direto no organismo.

2.8 BPA EM CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA

Grande parte dos estudos disponíveis na literatura se concentra nos efeitos do BPA em células ou tecidos reprodutivos, pouco se relata em relação ao tecido nervoso e suas peculiaridades, sendo a retina uma pequena estrutura de alta e complexa funcionalidade, que sofre alteração mediante a exposição a agentes tóxicos e pode desenvolver DCNTs. O epitélio pigmentar da retina (EPR) é uma camada fina de tecido nervoso que reveste o globo ocular, diretamente sob as células fotorreceptoras. É responsável por levar nutrientes e oxigênio, reciclando e desintoxicando produtos envolvidos no processo de foto transdução (estímulo luminoso e nervoso enviado ao cérebro para que as imagens sejam lidas e interpretadas) (DOUGLAS, 2002).

Nos últimos anos, apenas um estudo trouxe as evidências da relação BPA - células do epitélio pigmentar da retina: Este estudo demonstrou que a molécula é capaz de interferir no metabolismo apoptótico, via EROs e estados inflamatórios (CHIANG et al., 2021). A formação de EROs e a inflamação, por sua vez, estão

associadas à degeneração macular relacionada à idade (DMRI), essa degeneração é progressiva e acontece nas células epiteliais da retina que levam além da distorção da imagem à eventuais perdas da visão (KAUPPINEN et al., 2012).

Em tese, a exposição ao BPA leva a diminuição de proteínas anti-apoptóticas, e ao conseqüente aumento de proteínas pró-apoptóticas. Além de condicionar estados de citotoxicidade, alterando os potenciais de membrana via ativação de proteínas inflamatórias, e suprimindo importantes enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Embora as evidências sejam poucas, já podemos considerar que o BPA é potencialmente tóxico, levando aos mais diferentes iniciadores de estados patológicos por interferir na rota inflamatória, seguida da reposta pelos sistemas (CHIANG et al., 2021).

2.9 LEGISLAÇÃO E REGULAMENTAÇÃO DO BPA

Na tentativa de preservar a saúde coletiva e diminuir a exposição ao BPA, fez-se necessária à implementação de normas e leis. Já no ano de 2006, a *European Food Safety Authority (EFSA)*, definiu como tolerância diária o valor 0,05 mg BPA/kg de peso corporal. A EFSA, no seu parecer concluiu que lactentes de 3 e 6 meses alimentados com recurso de mamadeiras de policarbonato apresentavam a exposição mais elevada ao BPA, embora os níveis se mantivessem abaixo do limite diário. Em 2011, o uso do material plástico de policarbonato foi proibido para a fabricação de mamadeiras (EU, 2011).

Em 2008, o Canadá restringiu a utilização de policarbonatos na fabricação de mamadeiras e estabeleceu limites para o BPA em enlatados. Na Dinamarca, em 2010, o BPA passou a ser banido dos recipientes de armazenamento de alimentos destinados a crianças de 0 a 3 anos. Na França, o governo proibiu temporariamente a fabricação, a importação, a exportação e a colocação no mercado de mamadeiras que contenham BPA (FLINT et al., 2012).

No Brasil, a Resolução RDC nº 17/2008, de 17 de março de 2008 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), correspondente à Resolução GMC do Mercosul nº 32/2007 estabelece o limite diário de 0,6 mg de BPA/kg de alimento ou simulante. E a Resolução RDC nº 41, de 16 de setembro de 2011, proíbe a fabricação e importação de mamadeiras que contenham BPA em sua fabricação, ambas as legislações não sofreram alterações e permanecem vigentes (BRASIL, 2008).

2.10 SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMO POTENCIAIS REVERSORES DE DCNTS

O BPA por seus efeitos toxigenômicos é um potencial indutor de alterações do metabolismo oxidativo e imune. Esta atuação ocorre via uma cascata de eventos que envolvem modificações no balanço de moléculas oxidativas e indução de genotoxicidade. Esse desbalanço contribui para o aumento de resíduos metabólicos que são indutores e mantenedores de estados de inflamação crônica de baixo grau e, assim de menor eficiência na resposta imune, que por sua vez, contribuem para o desenvolvimento de DCNTs (MICHAŁOWICZ, 2014).

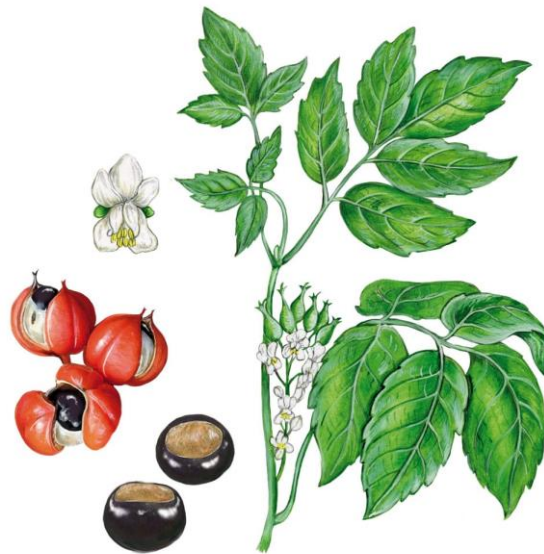
Vários suplementos alimentares já foram estudados como forma de reverter ou atenuar esses quadros de inflamação crônica de baixo grau e o desbalanço entre as moléculas envolvidas nos quadros de estresse oxidativo (UPADHYAY; DIXIT, 2015). Dentre os compostos já analisados e estudados, destaca-se o Se (SAHEBARI et al., 2019), a L- car (KELEK et al., 2019; ZHANG et al., 2019) e o Gua (*Paullinia cupana*) (G) - essa fruta amazônica possui alta concentração de metilxantinas (principalmente cafeína) e catequinas (DA COSTA KREWER et al., 2014; YONEKURA et al., 2016).

Um estudo anterior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa investigou o efeito de cada composto (Gua, Se ou L-car) e descobriram que a formulação do multissuplemento de GSC® pode ser mais eficaz na atenuação do estresse oxidativo e da inflamação do que cada composto isolado (TEIXEIRA et al., 2021).

2.10.1 Guaraná

O Gua (Figura 11) (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma planta nativa da região amazônica pertencente à família Sapindaceae e conhecida por suas 41 propriedades estimulantes e medicinais (PATRICK et al., 2019; TORRES et al., 2022).

Figura 11- Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)



Fonte: Google Imagens

Legenda: A imagem representa as diferentes formas em que o guaraná pode se apresentar: Folhas, sementes, flores e frutos.

Suas sementes são consideradas cientificamente e comercialmente úteis, em decorrência do seu sabor e da grande quantidade de compostos bioativos. A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), uma metilxantina, é o composto majoritário, à qual são atribuídos muitos dos seus efeitos, incluindo os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. A concentração de cafeína nas sementes é superior a outras espécies cafeinadas, como o café (*Coffea arabica*), por exemplo, estando em concentrações entre 5 – 6% (ALVES et al., 2019; TORRES et al., 2022).

Além dela, há a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina), em proporções menores (ambas abaixo de 0,3%). Flavan-3-óis são encontrados em quantidades consideráveis, com maior prevalência de catequina (3%) e epicatequina 42 (2%). Oligômeros de flavan-3-óis, conhecidos como proantocianidinas ou taninos condensados, também compõem as sementes do Gua, com maior predomínio das proantocianidinas B1 e B2, seguidas da A2. Saponinas também estão presentes, embora em quantidades menores (MACHADO et al., 2018; PATRICK et al., 2019; TORRES et al., 2022).

O Brasil é o único país que comercializa o Gua; as primeiras evidências sobre o seu consumo foram descritas pela primeira vez por missionários jesuítas no século XVII. Eles observaram que os indígenas da Amazônia o consumiam diariamente para fins energéticos e medicinais, como tratamento de dor de cabeça, diarreia, febre e cólicas (HENMAN, 1982; SMITH; ATROCH, 2010).

Já os primeiros relatos científicos sobre os efeitos do Gua na saúde humana surgiram no século XIX. Desde então, o uso de sua semente na forma de pó e extrato tem sido estudado por seus diversos efeitos na saúde humana, como efeitos estimulantes, anti-inflamatórios (KREWER et al., 2014), antioxidantes (YONEKURA et al., 2016), genoprotetores e outros efeitos biológicos (ROGGIA et al., 2019).

Diante disso, ele está incluído na lista de constituintes autorizados para uso em suplementos alimentares, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Instrução Normativa nº 28, publicada em julho de 2018 (BRASIL, 2018).

Em relação a sua utilização como potencial reversor dos danos provocados pelo BPA, especificamente, ainda não há estudos, o que torna nosso trabalho ainda mais relevante.

2.10.2 Selênio

O Se é um oligoelemento encontrado em pequenas quantidades no organismo, sendo de fundamental importância para a saúde humana. Foi isolado pela primeira vez em 1817 pelo químico sueco Jacob Berzelius Jöns, mas sua importância só foi destacada em 1957 (MEHDI et al., 2013).

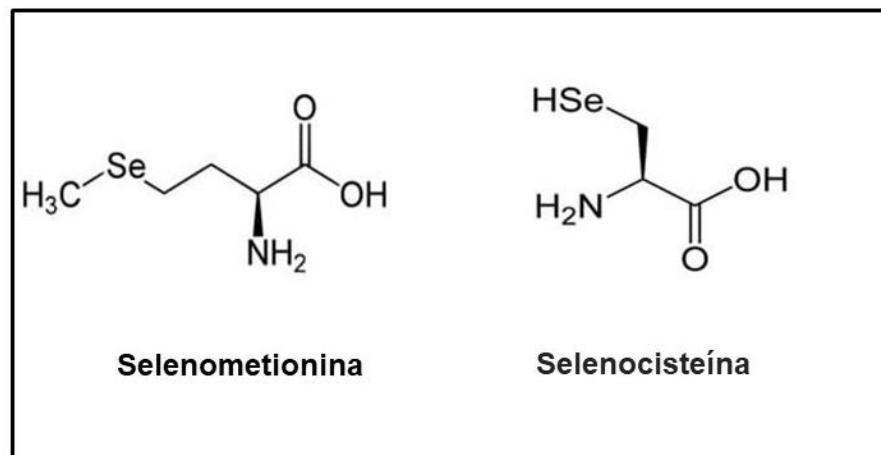
Ele é um componente essencial das selenoproteínas que desempenha um papel crucial em muitas funções biológicas, como a atividade antioxidante, a formação de hormônios tireoidianos, na síntese de DNA, fertilidade e reprodução (CABARAUX et al., 2007; SUTTLE, 2010.)

No metabolismo humano, cerca de 25 selenoproteínas foram identificadas. Das quais, estão as GPxs, que são críticas para a defesa antioxidante; as tioredoxina redutases, que são importantes no controle da sinalização redox, regulação da expressão gênica e da proliferação celular; as iodotironina desiodinases, que são fundamentais para a regulação do metabolismo dos hormônios tireoidianos; e a selenoproteína P, que representa o principal sistema de transporte de Se no plasma

para os tecidos (DOMINIÁK et al., 2016; HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020; HU et al., 2021).

O Se está presente na natureza e nos organismos sob formas orgânicas e/ou inorgânicas. As principais formas orgânicas são a selenometionina e a selenocisteína (Figura 12). As formas inorgânicas são selenito (SeO_3^{2-}), seleneto (Se^{2-}), selenato (SeO_4^{2-}) e o elemento Se (MEHDI et al., 2013).

Figura 12 - Selenometionina e Selenocisteína: Principais formas orgânicas de Se.



Fonte: Adaptado de Mehdi et al., 2013.

Legenda: A figura apresenta as estruturas moleculares das formas orgânicas do selênio.

O Se está presente em uma variedade de alimentos, predominantemente na forma de Selenometionina. A sua principal fonte alimentar é a castanha do Brasil, sendo também encontrado em cereais, grãos, carnes, peixes, frutos do mar, pães, arroz, nozes, leite e derivados, ovos, entre outros (DOMINIÁK et al., 2016; HARIHARAN; DHARMARAJ, 2020; HU et al., 2021).

O teor de Se encontrado nos alimentos varia muito, e conseqüentemente a quantidade biodisponível no organismo humano também. Fatores individuais como a dieta e a idade são pontos importantes do processo homeostático, assim como, o teor

de Se dos grãos e vegetais geralmente dependem do teor de Se nos solos correspondentes (MEHDI et al., 2013).

A biodisponibilidade e a atividade biológica deste micronutriente não dependem apenas da quantidade total ingerida, mas também de fatores, como a sua forma química e o estado fisiológico do organismo. As formas orgânicas, especialmente a Selenometionina, possuem maior biodisponibilidade e são menos tóxicas do que as inorgânicas. A absorção dos compostos orgânicos de Se é mais rápida e completa (entre 85 e 95%), enquanto a faixa de absorção do Se inorgânico é de 40 a 50% (CONSTANTINESCU-ARUXANDEI et al., 2018).

Há também um outro fator a se considerar, existe uma relação não linear entre o status de Se e os efeitos à saúde, ou seja, tanto a sua deficiência quanto o seu excesso são altamente prejudiciais e afetam o funcionamento do organismo. Com uma estreita janela terapêutica é chamado de “veneno essencial”; assim, os efeitos da suplementação de Se podem ser benéficos em indivíduos com deficiência deste elemento e altamente tóxicos naqueles que estão com os níveis ideais ou elevados (CONSTANTINESCU-ARUXANDEI et al., 2018; HU et al., 2021; KIELISZEK, 2019).

Por isso, no Brasil os limites da ingestão diária já foram estabelecidos pela ANVISA: para adultos com 19 anos ou mais, o consumo deve manter -se entre 8,25 e 320µg ao dia (BRASIL, 2018). Em outros países, esses limites apresentam oscilações, entretanto já estão estabelecidos. A ingestão diária recomendada de Se na Bélgica (CSS, 2012) (varia de 60 µg para mulheres a 70 µg para homens (a partir de 14 anos). Esta recomendação é aumentada para 65 µg para gestantes e 75 µg durante a lactação. As diretrizes de 2006 da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) definem a ingestão máxima tolerável em 300µg/dia para adultos. Para crianças, a dose máxima tolerável é de 60 µg (crianças de 1 a 3 anos) a 250 µg (crianças de 15 a 17 anos).

Nos seres humanos, os artigos sobre sintomas de deficiência de Se descreveram apenas casos extremos, graves e prolongados de privação. Caracteriza-se por cardiomiopatia necrosante, miopatia periférica, diminuição do tônus muscular e distúrbios de condução, alterações nos anexos da pele (afinamento dos cabelos, opacificação das unhas) e anemia (MEHDHI et al., 2013).

Em relação a utilização do Se como reversor ou protetor de danos induzidos pelo BPA, há alguns estudos na literatura: Khalaf e seu grupo de estudos (2019) avaliaram o papel do Se como agente protetores para aliviar a toxicidade testicular

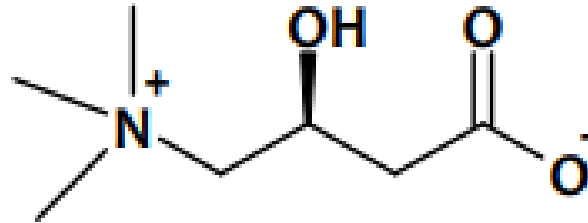
induzida pelo BPA. Os resultados relataram que o dano testicular acentuado induzido pelo BPA foi evidenciado por elevações significativas na atividade sérica da fosfatase ácida prostática, nos níveis de malondialdeído, na diminuição da atividade da catalase testicular e na redução do nível de glutathione. A coadministração de Se atenuou a toxicidade reprodutiva induzida pelo BPA através da melhoria da atividade antioxidante, alterações genéticas e restauração do tecido testicular quase como no controle. Estes resultados indicaram que Se podem ser utilizadas como agentes protetores reprodutivos contra o efeito prejudicial induzido pelo BPA. Assim como KAUR et al. (2021) demonstraram resultados semelhantes e complementares.

No estudo de ZAKI e colaboradores (2021) os efeitos benéficos do Se foram avaliados em ratos machos com danos hepáticos causados pelo BPA. A administração do Se proporcionou melhorias histológicas e ultraestruturais, além dos níveis de Aspartato aminotransferase (AST) e a Alanina aminotransferase (ALT) reduzirem, os níveis séricos de IL-6 foram significativamente modulados. Muitos resultados são encontrados em potencial, de tal modo que nossa hipótese apresenta grande relevância.

2.10.3 L – carnitina

A L-carnitina (L- car) é uma amina quaternária (3-hidroxi-4-N-trimetilaminobutirato), encontrada em todas as espécies de mamíferos (Figura 13). Este composto endógeno da membrana mitocondrial é armazenado primariamente no coração e no músculo esquelético, o que corresponde a aproximadamente 95% do estoque total, enquanto concentrações muito mais baixas são encontradas no fígado, rins e plasma (FIELDING et al., 2018).

Figura 13 – Estrutura química da L-carnitina



Fonte: Adaptado de Pekala, et al., 2011.

Legenda: A imagem representa a estrutura molecular da L- carnitina.

A L-car é obtida ou por síntese endógena no fígado, rins e cérebro - a partir dos aminoácidos essenciais lisina e metionina, ou por obtenção exógena, a partir da ingestão alimentar. A biossíntese de L-car é responsável por suprir apenas 25% das necessidades diárias do organismo, sendo necessário a suplementação. Na alimentação, a fonte primária de L-car é a carne vermelha, mas também está presente em aves, peixes e produtos lácteos em quantidades moderadas, enquanto, em vegetais, a sua quantidade é ínfima (DURAZZO et al., 2020; FIELDING et al., 2018).

De acordo com a Instrução Normativa nº 28, da ANVISA, o limite máximo recomendado da ingestão diária de L-car em suplementos alimentares é de 2000 mg/dia, para adultos \geq 19 anos (BRASIL, 2018). Por se tratar de uma molécula amplamente estudada, a sua segurança é relatada em diferentes estudos; Hathcock et al. (2006) relatam que ela é um nutriente seguro, com efeitos adversos limitados a um leve desconforto gastrointestinal, quando ingeridas em altas dosagens (> 5 g/dia), assim como, sua administração na forma de suplementos foi demonstrada por sua segurança e eficiência nos estudos de Olde e colaboradores (2014), Ayuso et al. (2021) e Evans e Fornasini (2003).

A L-car desempenha importante papel na homeostase do organismo, tendo como principal função o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria, onde são submetidos à β -oxidação, e os produtos formados são utilizados no ciclo de Krebs para a geração de energia, na forma de ATP (DURAZZO et al., 2020; PEKALA et al., 2011)

Além das funções basais, muitas outras propriedades já foram identificadas como as anti-inflamatórias e antioxidantes propriedades antiapoptóticas, de controle glicêmico, cardioprotetoras, além de atividade antineoplásica e melhora rendimento na atividade física e da recuperação após o exercício (DINICOLANTONIO et al., 2013; FLANAGAN et al., 2010; MELONE et al., 2018; RIBAS et al., 2014; SHANG et al., 2014; XU et al., 2017).

Em relação a estudos que avaliaram a coadministração da L- car ou seu papel protetor e reversor dos danos causados pelo BPA, apenas um estudo é identificado nos últimos 5 anos. BADAWEY et al (2022) investigaram o papel do BPA em alterações bioquímicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas na artéria coronária e no miocárdio e, o potencial papel protetor da L-car. 24 ratos machos albinos Wistar adultos foram divididos igualmente em um grupo controle, um grupo tratado com BPA (40 mg/kg/d, por gavagem por 4 semanas) e um grupo tratado com BPA mais L-car (recebeu 40 mg/kg/d de BPA e 300 mg/kg/d de L-car, por gavagem durante 4 semanas). Ratos expostos ao BPA demonstraram anomalias estruturais no tecido da artéria coronária, incluindo vacuolização de células na mília e descolamento do endotélio da íntima. Congestão de vasos sanguíneos e infiltração de células polinucleares foram observadas no miocárdio. Houve uma maior deposição de colágeno em ambos os tecidos, indicando fibrose. As alterações imuno-histoquímicas incluíram expressão aumentada de óxido nítrico sintase (eNOS) e caspase-3 na artéria coronária e no miocárdio, indicando doença vascular e apoptose, respectivamente. O dano oxidativo foi evidente na artéria coronária e no miocárdio de ratos tratados com BPA, o que foi indicado pelo nível reduzido de glutathiona (GSH) e níveis elevados de malondideído (MDA). A coadministração de L-car melhorou significativamente as alterações estruturais e o estresse oxidativo induzidos pelo BPA. Em conclusão, o BPA poderia potencialmente causar alterações patológicas e danos oxidativos na artéria coronária e no miocárdio, que poderiam ser melhorados pela L- car.

2.10.4 Multissuplemento GSC®

Estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa mostram a eficiência e segurança da composição do multissuplemento GSC®. O GSC® não apresentou efeito tóxico sobre modelos *in vitro* e *in vivo*; modulando o eixo redox e

aumentando a eficiência da resposta do sistema imune (TEIXEIRA et al., 2021). Complementar a esse estudo, executamos um estudo piloto onde o objetivo era verificar uma dose mínima diária do multissuplemento, o qual foi administrado durante 12 semanas a 28 pacientes portadores de Esclerose Múltipla. Os resultados indicaram que uma baixa concentração de GSC® era capaz de reduzir os níveis plasmáticos de DNA oxidado e citocinas pró-inflamatórias (TEIXEIRA et al., 2023). Baseados nesses resultados postulamos a hipótese que a coadministração, bem como, os seus compostos isolados podem apresentar efeitos significativamente positivos aos danos induzidos por BPA nos diferentes modelos experimentais aqui descritos.

3 METODOLOGIA

3.1 ARTIGO 1 (PUBLICADO)

A metodologia empregada neste estudo está descrita sob a forma de artigo, o qual foi publicado na revista *Revista Contexto & Saúde estando detalhadamente a partir da página 63.*

A seguir, é apresentado o delineamento metodológico geral do estudo:

Minhocas cliteladas foram escolhidas para o desenvolvimento do experimento. Elas foram acondicionadas em frascos contendo 3,5g de espessante de amido modificado (Nutilis, Danone, São Paulo), 37,50 mL de água e 12,5 mL de uma solução com BPA (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) previamente diluído em 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações de 0,1, 0,3, 1, 10 e 30 μ M.

Testes piloto mostraram que esse espessante comercial, comumente usados por pacientes com dificuldades de deglutição, não era tóxico ou aversivo às minhocas. Para evitar que as minhocas saíssem dos recipientes, eles foram cobertos com plástico perfurado para permitir a troca gasosa. O fluido celômico de minhoca foi coletado para a maioria das análises realizadas neste estudo. As minhocas foram eutanasiadas com álcool gelado 70% e os segmentos posteriores foram cortados, fixados e corados histologicamente para análise da resposta imune das minhocas.

As análises foram realizadas em 24 h e 72 h após a exposição ao BPA, seguindo os protocolos para moléculas tóxicas previamente realizados em minhocas, semelhantes aos realizados por Jung et al. (2021). Inicialmente, avaliamos se o BPA

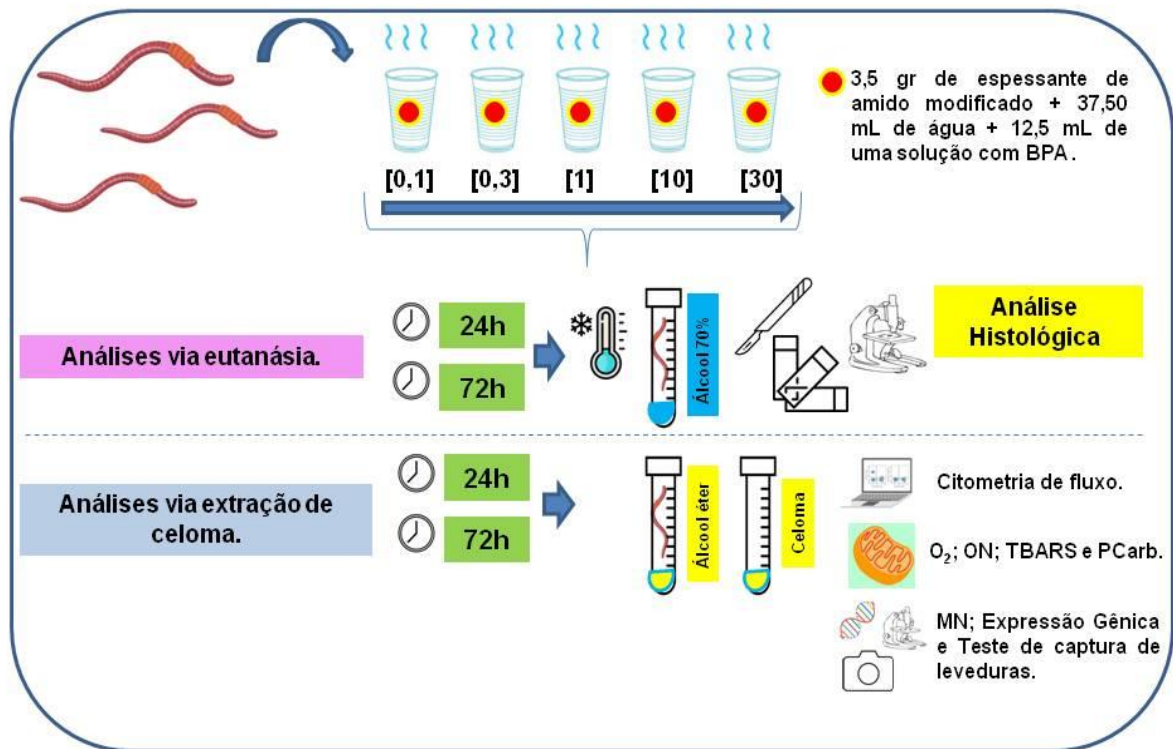
induzia alterações na taxa de proliferação celular, eventos apoptóticos e distribuição de amebócitos e eleócitos no fluido celômico. Estas três análises foram realizadas por citometria de fluxo. Os níveis dos seguintes marcadores oxidativos foram avaliados no sobrenadante do fluido celômico: O₂, ON, TBARS e PCarb. O efeito do BPA no dano ao DNA foi avaliado via formação de MN em dois tipos de celomócitos (amebócitos e eleócitos) presentes no fluido celômico.

Para avaliar o efeito do BPA nos marcadores de imunocompetência de minhocas, foi analisada a expressão de dois genes relacionados à resposta imune: gene Toll-like receptor (eaTLR) (NCBI: JX898685) e gene do peptídeo antimicrobiano (AMP1) (AF060552), também conhecido como "lumbricina 1" (CHO et al., 1998). Nas minhocas, ambos os genes são modulados por microrganismos, lesão tecidual ou presença de alguns tóxicos (MO et al., 2012; SKANTA et al., 2013). Além da expressão gênica, o efeito do BPA na imunocompetência de minhocas foi avaliado usando um ensaio de captura de leveduras descrito por ALVES e colaboradores (2019).

O MN, as estruturas formadas no ensaio de captura de leveduras e o armazenamento de corpos marrons (BBs) nos segmentos posteriores da minhoca também foram analisados por microscopia óptica usando o pacote de software de análise de imagens Digimizer®, que permite a medição manual precisa, bem como, a detecção automática de objetos com suas medições características.

Abaixo, a figura 14 resume a metodologia utilizada neste estudo.

Figura 14 – Esquema do delineamento metodológico geral do ensaio *in vivo*.



Fonte: A autora

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, com no mínimo três minhocas por repetição.

3.2 ARTIGO 2 (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)

Este artigo foi submetido à revista *Brazilian Journal of Biology* e a metodologia empregada está descrita na íntegra, a partir da página 99 desta tese. A seguir, é apresentado o delineamento metodológico geral do estudo (Figura 15).

Para tanto, células do epitélio pigmentar da retina (ARPE-19) foram obtidas comercialmente da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, VA, USA). As células foram cultivadas separadamente em meio *Dulbecco's modified eagle medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F-12), suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF), 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina e 1% do antifúngico anfotericina B.

As células foram mantidas em incubadora de cultivo celular a 37°C e saturação de 5% de dióxido de carbono (CO₂), até a obtenção da concentração de 1x10⁵ cél/mL. Após 24 horas, foram tratadas com as concentrações 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 3;10 µM de BPA previamente diluídos em 0,1% de DMSO. A escolha das concentrações foi baseada nos estudos prévios de Liang et al (2020).

Após, as 24 horas de tratamento, foi realizada a (1) avaliação de marcadores da viabilidade celular através dos ensaios espectrofotométricos do Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (FUKUI et al., 2010) e ATP (Sigma-Aldrich®) conforme indicação do fabricante, a fim de determinar a curva de concentração necessária para induzir quadros de toxicidades. Realizado isso, a curva foi reduzida em 0,1,3,10 µM de BPA previamente diluídos em 0,1% de DMSO. Por conseguinte, (2) testes oxidativos foram determinados em tempos distintos de 06h, 24h e 72h: O₂⁻ (MORABITO et al., 2010), ON (CHOI et al., 2012), TBARS (JENTZSCH, 1996) e Pcarb (LEVINE et al., 1990). Ainda, (3) o teste Clonogênico foi realizado no 1º, 3º e 7º dia (CUBILLOS-ROJAS et al., 2014) a fim de avaliar a exposição crônica do BPA. Para avaliação de dano ao DNA, perfil genotóxico, proliferação e alterações morfométricas das células realizaram-se os testes de Micronúcleo (MN) (OECD, 2016), coloração panóptica (LaborClin®) conforme instruções do fabricante e MTT (FUKUI et al., 2010) em 72 horas.

Com isso, caracterizou-se a melhor concentração de uso do BPA e (4) iniciou-se a avaliação do multissuplemento e seus componentes isolados estando as concentrações pré- estabelecidas pelo estudo de Teixeira et al (2020): Gua, 1.07 mg/mL; Se, 0.178 µg/mL; e L-car, 1.43 mg/mL, onde utilizou-se a técnica de citometria de fluxo para determinar o percentual de apoptose via marcação por iodeto de propídeo e anexina, bem como, o perfil das células nas fases do ciclo celular, ambos conforme orientação do fabricante (BD Pharmingen™) e estudos de Vermes e colaboradores (1995). (5) A interação de marcadores oxidativos e a frequência de MN e por fim (6) avaliou-se a expressão proteica e gênica (via *Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR) dos gens Beta- actina, Bax, Bcl-2, Caspase 3 e 8, conforme a tabela 1.

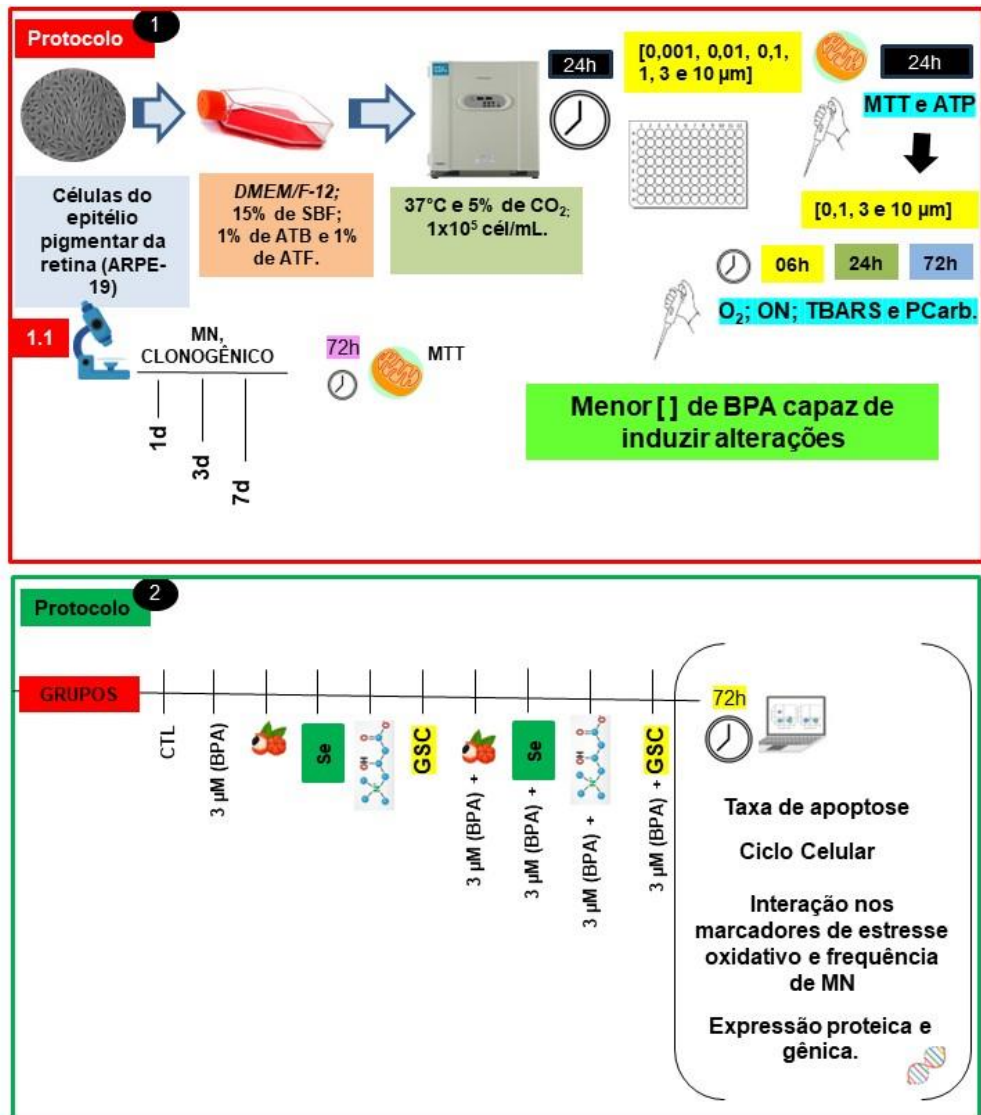
Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados para análise de expressão gênica.

Genes	Sequência dos Iniciadores (<i>Primers</i>)	
	<i>Forward</i> (5'-3')	<i>Reverse</i> (3'-5')
<i>β-actina</i>	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA
Bax	CCC TTT TCT ACT TTG CCA GCA A	CCC GGA GGA AGT CCA ATG T
Bcl-2	GAG GAT TGT GGC CTT CTT TGA GT	AGT CAT CCA CAG GGC GAT GT
Caspase 3	TTT GAG CCT GAG CAG AGA CAT G	TAC CAG TGC GTA TGG AGA AAT GG
Caspase 8	AGG AGC TGC TCT TCC GAA TT	CCC TGC CTG GTG TCT GAA GT

O gene da beta-actina foi utilizado como controle interno da reação (housekeeping).

A análise estatística deu-se conforme a uniformidade e características dos dados.

Figura 15– Esquema do delineamento metodológico geral do ensaio *in vitro*.



Fonte: A autora.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 (PUBLICADO)

Os resultados deste artigo, publicado na Revista Contexto & Saúde estão descritos na íntegra, a partir da página 67 desta tese.

Acute Bisphenol-A Exposure Triggers Superoxide-Nitric Oxide Imbalance and Immunocompetence Impairment of *Eisenia Fetida* Earthworm

Bárbara Osmarin Turra¹, Ivana Beatrice Mânica da Cruz²
Nathália Cardoso de Afonso Bonotto³, Cibele Ferreira Teixeira⁴, Moisés Mastella⁵
Wellington Claudino Ferreira⁶, Ivo Emilio da Cruz Jung⁷, Elize Aparecida Santos Musachio⁸
Marina Prigol⁹, Fernanda Barbisan¹⁰

Highlights:

1. BPA in concentrations considered tolerable had a negative effect in *E.fetida*.
2. BPA induces oxidative stress causing DNA damage and compromises the immune competence.
3. DNA and innate immune metabolism damage may be associated with NCDs.

ABSTRACT

Bisphenol-A (BPA) is an endocrine-disrupting molecule associated with the risk of several non-transmissible chronic diseases. We postulated that BPA triggers oxidative alterations, altering immunocompetence and contributing to physiological dysfunction. To evaluate the effects of BPA on the oxidative and immune system, Californian earthworms were reared in a culture medium containing different BPA concentrations for 24 and 72 h. Coelomocytes were used to evaluate the effects of BPA on oxidative markers, cellular proliferation, and apoptosis, and immunocompetence effects were investigated by yeast-exposure assay and the modulation of genes related to immune response. Low BPA concentrations induced coelomocyte proliferation, imbalanced superoxide/NO levels, higher micronucleus frequency, and apoptosis. BPA also induced Amp1 gene overexpression and a low efficiency of dead yeast capture. The association between DNA damage and changes in innate immune metabolism could be related to the action of BPA, which is associated with the risk of physiological disturbances and non-transmissible chronic diseases.

Keywords: endocrine disruptors; genotoxicity; oxidative stress; inflammation; apoptosis; immunocompetence.

EXPOSIÇÃO AGUDA AO BISFENOL-A DESENCADEIA UM DESEQUILÍBRIO SUPERÓXIDO-ÓXIDO NÍTRICO E COMPROMETIMENTO DA IMUNOCOMPETÊNCIA NA MINHOC A *EISENIA FETIDA*

RESUMO

O bisfenol-A (BPA) é uma molécula desreguladora endócrina associada ao risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis. Postulamos que o BPA desencadeia alterações oxidativas, alterando a imunocompetência e contribuindo para a disfunção fisiológica. Para avaliar os efeitos do BPA no sistema oxidativo e imunológico, minhocas californianas foram criadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BPA por 24 horas e 72 horas. Celomócitos foram utilizados para avaliar os efeitos do BPA em marcadores oxidativos, proliferação celular e apoptose, e efeitos de imunocompetência foram investigados por ensaio de exposição a leveduras e modulação de genes relacionados à resposta imune. Baixas concentrações de BPA induziram proliferação de celomócitos, níveis desequilibrados de superóxido/NO, maior frequência de micronúcleos e apoptose. O BPA também induziu a superexpressão do gene Amp1 e uma baixa eficiência de captura de levedura morta. A associação entre danos no DNA e alterações no metabolismo imune inato pode estar relacionada à ação do BPA, que está associado ao risco de distúrbios fisiológicos e doenças crônicas não transmissíveis.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos; genotoxicidade; estresse oxidativo; inflamação; apoptose; imunocompetência.

¹ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-4175-9534>

² Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-3008-6899>

³ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-3733-3549>

⁴ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-0058-3827>

⁵ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-6990-6079>

⁶ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-0401-1300>

⁷ Universidade Estadual do Amazonas – UEA. Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-0516-7278>

⁸ Universidade Federal do Pampa – Unipampa. Itaquí/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-2577-2379>

⁹ Universidade Federal do Pampa – Unipampa. Itaquí/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-9724-7469>

¹⁰ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-2960-7047>

INTRODUCTION

Many chemicals derived from industrially processed materials have undesirable biological activities, such as bisphenol A-[4,4'-(propane-2,2-diyl)-diphenol] (BPA), one of the most widely used synthetic compounds on Earth. As BPA is an endocrine-disrupting molecule, several lines of evidence have suggested that it has a relevant impact on human health¹. Regarding the effects of BPA on the immune system, some studies have shown that this molecule could harm neutrophil function, the most abundant population of peripheral blood leukocytes, which represents the primary defense against microorganisms, tissue injuries, and cancer cells^{2-3,4,5}. Furthermore, BPA appears to worsen the prognosis of some non-transmissible chronic diseases (NCDs) through alterations that contribute to the establishment, maintenance, or intensification of chronic inflammatory states or a decrease in immunocompetence related to the recognition of microorganisms and procarcinogenic cells⁶⁻⁷.

However, contradictory aspects related to the potential concomitant effect of BPA on immune function have been reported⁸. These inconsistencies are related to the complexity of the factors involved in the effects of BPA on the immune system. BPA may generate oxidative stress with pleiotropic consequences on cells, including: (1) DNA damage triggering cellular dysfunction and (2) high concentration of derived residues, mainly from the oxidation of macromolecules, associated with mitochondrial dysfunction, by an increase in superoxide (O_2^-) and nitric oxide (NO) reactions, generating peroxynitrite (ONOO⁻), which form hydroxyl radicals (OH^{*}) and nitrogen dioxide (NO₂). These reactive oxygen species (ROS) cause extensive lipoperoxidation, protein carbonylation, and DNA damage, leading to cellular dysfunction, such as autophagy impairment by lysosomes. The increase in the concentration of intra- and extracellular immunogenic metabolic residues (damage-associated molecular patterns, DAMPs) triggers low-grade chronic inflammatory states in several NCDs⁹⁻¹⁰.

To test the association between oxidative stress states and concomitant alterations caused by BPA on immunocompetence, mainly involving inflammatory response, we performed an *in vivo* study using the red Californian earthworm *Eisenia fetida* (*E. fetida*) as an experimental model. The choice of this model was based on the following reasons: previous evidence suggests that BPA has a toxic effect on earthworms, triggering hyperplasia of the epidermis, increased body wall thickness, ovarian atrophy¹¹, and the differential modulation of genes related to detoxification (metallothionein), stress response (HSC704), and genotoxicity (PARP1)¹². Furthermore, earthworm immune cells, named coelomocytes, can be easily and abundantly accessed from coelomic body fluid, presenting similarities with the human innate immune response. Coelomocytes represent the first line of immune defense against microorganisms and pollutants, including physiological processes, such as migration, phagocytosis, cellular aggregation, and earthworm neutrophil extracellular trap (eNET) production¹³. Like humans, earthworm innate metabolism is responsive to environmental components, such as antioxidant and anti-inflammatory foods and pollutants. In this case, these components seem to improve or worsen immune efficiency in capturing and destroying pathogens¹⁴⁻¹⁵.

In this context, we evaluated the simultaneous impact of acute exposure to different concentrations of BPA on immune *E. fetida* metabolism by analyzing oxidative markers (NO, superoxide anion (S), lipoperoxidation (LPX), protein carbonylation (PCarb), genotoxicity by identification of micronucleus (MN) formation, apoptosis, and immunocompetence markers.

METHODS

Earthworm rearing conditions and ethics issues

The earthworms used in this study were commercially obtained from Minhocas Japi (Jundiaí, São Paulo, Brazil) and maintained under standardized laboratory conditions, in which sterilized humus

enriched with yerba mate powder or coffee residues that are used as food by these organisms were used. Humidity was maintained at 60-70% and temperature between 20–22°C. For the experiments, the earthworms were placed in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) incubator in the dark. Like many other countries, Brazil does not require approval for studies involving earthworms and other invertebrate organisms by animal research ethics committees. For this reason, this study did not receive formal approval from an ethical board. The authors declare that the research was performed according to the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

General experimental design and earthworms reared conditions

A total of 102 earthworms were used in the experiments with 54 earthworms to conduct toxicity tests considering the control group and the groups exposed to five different concentrations of BPA. The tests were carried out in triplicate with three earthworms per plate. A total of 54 earthworms were also used to carry out laboratory tests, repeating the same sampling distribution used in toxicity tests. In all assays, we used clitellate earthworms transferred to a vial containing 3.5 g of starch thickener (Nutillis, Danone, São Paulo), 37.50 mL of water, and 12.5 mL of a solution with BPA (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, USA) previously diluted in 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) at concentrations of 0.1, 0.3, 1, 10, and 30 µM. DMSO was used as a solvent because the dilution of BPA in water is very low. Although this solvent has some toxicity depending on the concentration used, the dilution of BPA in DMSO has been carried out in studies with other chemicals molecules using *E. fetida* as experimental model¹⁷. Even so, a pilot test conducted (data not shown) from the experimental conditions that will be described below indicated that the concentration of DMSO used in the study had no toxic effect on earthworms.

The starch medium was used to guarantee the ingestion of the substrate by the earthworm BPA-contaminated because it does not require heating the medium, which could cause some interference in the BPA molecule. Pilot tests showed that this commercial thickener, commonly used by patients with swallowing difficulties, was not toxic or aversive to earthworms. To prevent earthworms from leaving the containers, they were covered with perforated plastic to allow for gas exchange. Earthworm coelomic fluid was collected for most analyses conducted in this study. The earthworms were euthanized with cold alcohol 70% and the posterior segments were cut, fixed, and histologically stained for further analysis of the earthworm immune response.

The inflammatory response to an antigen involves the activation of the immune system, mainly the production of nitric oxide and cell proliferation as part of a series of complex events to combat infections and maintain the body's homeostasis. In a previous study, it was observed that the exposure of earthworms to rotenone induced an inflammatory response observed through changes occurring after 24h and 72h.¹⁵ Therefore, this study was used as a reference to evaluate the effect of BPA on earthworms.

Three analyses were performed by flow cytometry. Initially, we evaluated whether BPA induced immunological activation in earthworms 72h BPA-exposed through analysis of alterations in the cell proliferation rate, apoptotic events, and distribution of amoebocytes and leucocytes in the coelomic fluid. To confirm that BPA was inducing an inflammatory activation in the earthworms, a subsequent analysis was carried out on the distribution pattern of cells throughout the cell cycle. It was considered that the increase in the percentage of cells in S and G2 phase in earthworms exposed to BPA for 24 hours would confirm the influence of this substance on the immune system. The levels of the following oxidative markers were also evaluated in the coelomic fluid supernatant (S, NO, LPX, and PCarb) of earthworms 24h BPA-exposed, since the differential modulation of oxidative metabolism is part of the inflammatory activation process, mainly considering the levels of NO and S molecules.¹⁶

On the other hand, micronucleus assay (MN), one of the most popular methods to assess genotoxicity of different chemical and physical factors, must be conducted in mitotic cells, which would be more easily obtained in earthworms exposed to BPA for 72 hours. In this test it is possible to detect rounded bodies of chromatin visible in the cytoplasm of cells, generally produced by DNA damage or genomic instability. The effect of BPA on DNA damage was evaluated via MN assay formation in two types of coelomocytes (amoebocytes and eleocytes) present in the coelomic fluid.

To evaluate the effect of BPA on earthworm immunocompetence markers, the expression of two genes related to immune response was analyzed: Toll-like receptor gene (eaTLR) (NCBI: JX898685) and antimicrobial peptide (AMP1) gene (AF060552), also known as "lumbricin 1"^{19,20}. In earthworms, both genes are modulated by microorganisms, tissue injury, or the presence of some toxicants^{19,20}. In addition to gene expression, the effect of BPA on the immunocompetence of earthworms has been evaluated using a yeast capture assay¹⁴.

The micronucleus, the structures formed in the yeast capture assay, and the storage of brown bodies (BBs) in the posterior segments of the earthworm were also analyzed by optical microscopy using the Digimizer[®] image analysis software package, which allows for precise manual measurement as well as automatic object detection with measurements of object characteristics.

Coelomic fluid collection

The coelomic fluid was obtained using a protocol previously described by Alves et al.¹⁴ with some modifications (Figure 1A). After treatment, the earthworms were removed from the medium, quickly washed with distilled water, dried on filter paper, and placed individually or up to three earthworms in six-well culture plates. Next, the six-well plate was covered with a lid containing filter paper soaked in 2 mL of ethyl ether. Within two minutes, the earthworms released the coelomic fluid without this process, triggering the death of the organisms. The earthworms were removed from the culture plate and phosphate buffer (PBS) was added. When necessary, the coelomic fluid was centrifuged to conduct laboratory analyses. The concomitant collection of coelomic fluid from at least six earthworms reduced the time required to obtain biological material, thus improving the experimental conditions.

Cell proliferation and apoptosis by flow cytometry assay

Pollutants can trigger the activation of the inflammatory response, which leads to an increase in the rate of proliferation of immune cells. In contrast, oxidative events can trigger DNA damage that induces apoptosis. Both conditions can reduce the immunocompetence of organisms in the face of pathogenic challenges. For this reason, the effect of BPA on the cell cycle of coelomocytes, on the proportion of cells associated with the immune response of earthworms (amoebocytes) and on the induction of apoptosis was evaluated using flow cytometry, as previously described by Alves et al.¹⁴ and Jung et al.¹⁵. Briefly, flow cytometry was performed using a FACS Canto[™] II Flow Cytometer (BD Biosciences[®], San Diego, CA, USA), and data acquisition and cell content analysis were performed using FlowJo vX.0.7 software[®] (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). The coelomic fluid was collected and added to 2 mL of PBS containing 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) to decrease cell aggregation events and subsequently centrifuged at 250 × g for 2 min. The supernatant was removed and coelomocytes were used to perform three flow cytometry analyses. The effect of BPA on coelomocyte proliferation was determined by cell cycle analysis as follows: cells were washed with cold PBS, resuspended in cold 70% ethanol, and centrifuged at 250 × g for 2 min. The cells were then resuspended in a staining solution containing 50 µg/mL propidium iodide (PI) solution, 100 µg/mL RNase A, and PBS solution with 0.05% Triton X-100, and incubated for 40 min at 37°C. The two main coelomocyte populations were identified by granulometry and size, with cells sorted according to their forward scatter/side scatter (FSC/SSC) patterns.

Apoptosis events were identified using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit[®] according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were washed twice with cold PBS and resuspended in 1X binding buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Next, 100 μ L of each sample was transferred to a culture tube, with the addition of FITC Annexin V (5 μ L) and PI (5 μ L) staining solution. Before analysis, the cells were gently vortexed and incubated for 15 min in the dark at room temperature. Then, 400 μ L of 1X binding buffer was added to each tube, and cell fluorescence was determined by flow cytometry.

Biochemical quantification of oxidative markers

The oxidative markers present in the supernatants of the coelomic bodies were quantified using spectrophotometric techniques. Initially, total proteins were quantified using the biuret method (total monoagent proteins kit; Bioclin, Minas Gerais, Brazil) to normalize all other biochemical analyses performed. The S-anion was quantified by analysis of the formazan concentration triggered by the Nitroblue Tetrazolium Test (NBT-reaction)²¹ and NO by determination of nitrate levels using the Griess reagent²². The LPX concentration was estimated by the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) measured spectrophotometrically and read at 532 nm²³. PCarb was determined by the Levine et al.²⁴ method and read at 370 nm.

Micronucleus assay

After the extrusion of the coelomic fluid, the coelomocytes became highly adherent, and MN analysis was performed in six-well plates, instead of a part of the sample being transferred to a histological slide, as is usually done. This strategy increased the number of whole cells available for analysis. The coelomic fluid was gently spread to the bottom of the well to help spread the cells, as this fluid was dense because of the large amount of mucus. Coelomocyte staining was performed using the Rapid Panoptic Hematologic Dye[®] (Laborclin Co., São Paulo) based on the principle of haematological staining established by Romanowsky, which has three reagents: a fixative solution composed of a 0.1% triarylmethane solution, 0.1% xanthene solution, and 0.1% thiazine solution.

After drying, all the samples were fixed and stained according to the manufacturer's instructions. Panoptic staining allowed for the visualization of nuclear and cytoplasmic structures, which is a critical aspect for the analysis of MN in coelomic fluid, as most cells fuse their cytoplasm, making the analysis difficult. Slides were analyzed following the criteria proposed by Holland et al.²⁵, and the number of micronuclei in 1000 cells per sample was counted under a light microscope at a magnification of 400 \times .

Immunocompetence assays

Yeast capture test

The effects of BPA on the immunocompetence of earthworms were evaluated using three complementary analyses. The first assay evaluated the *ex vivo* response of coelomocytes exposed to dead yeasts, involving migration, formation of cell aggregates, NETs, and BBs, as previously described by Alves et al.¹⁴. Briefly, the yeasts were inactivated with boiling water at a concentration of 10^5 /mL, added to 1000 μ L of coelomic fluid, and placed in six-well plates.

Figure 1B shows the main immune events triggered by fluid coelomic extrusion from the controls and earthworms treated with BPA: (1–3) coelomocyte migration, fragmentation, and fusion of eleocytes, which form a polynucleated cytoplasmic mass; (4–5) attraction of amoebocytes (cells more cuboidal, granular, and nucleus proportionately larger than the cytoplasm) to this cytoplasmic polynucleated mass, forming cell aggregates; (6) production of eNETs from cell aggregates forming a network, which often links one cell aggregate to another, allowing the capture and imprisonment of microorganisms and other substances; (7–8) aggregates form BBs. Thus, within 1 h, it was possible to

analyze and compare the immune responses of coelomocytes from control earthworms and those exposed to BPA. Further, the six-well plates were stained with the Panoptic kit as described in the preparation and analysis of MNs, followed by analysis by optical microscopy.

Histological analysis of brown bodies (BBs) deposition

As the formed BBs detached and remained floating in the middle, the posterior segments of the earthworm were histologically analyzed to evaluate the formation of these structures. The earthworms were euthanized with cold 70% alcohol for 5 min, and 10 posterior segments in the tail direction were cut with the aid of a scalpel and fixed in 4% buffered formaldehyde for further preparation and histological analysis. The samples were dehydrated using a 15-min dehydration battery per step with a Kline shaker (GT-20IBSU[®]) with 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol, two passages in anhydrous alcohol, alcohol, and xylol, and two more passages in xylol. Two hours later, the samples were kept in xylol with paraffin, then paraffin 1 and paraffin 2, and subsequently blocked and dried overnight at room temperature. Histological sections were obtained using a semiautomatic microtome (Yd-335) at a thickness of 7 μ m. The slides were mounted and dried overnight at room temperature for subsequent staining. For histological staining, the slides were subjected to a standard dewaxing process, with two passages in xylol heated to 50°C (5 min each), anhydrous alcohol (5 min), 90% alcohol (3 min), 70% alcohol (3 min), running water (3 min), and distilled water (1 min).

The histological sections were stained with the Masson-Goldner trichrome (MGT) staining technique, which identifies components of connective and muscle tissues selectively visualized by using a combination of three different staining solutions: azophloxine and tungstophosphoric acid orange G solutions stain components such as muscle and cytoplasm, and light green SF solution then counter-stains connective tissue. A Sigma-Aldrich kit was used to perform the MGT staining (100485). Photographic images were analyzed using Digimizer[®] software, which allowed for the counting of cell aggregates (CA) per field (200 \times magnification), measuring the perimeter of the CAs (μ m), identifying the presence of NETs, and the deposition of BBs in the posterior region of the body of the earthworm. Ten optical fields were evaluated per treatment.

Analysis of the expression of genes associated with immune response

The effect of BPA on the expression of eATLR and AMP1 genes was determined as previously described by Jung et al¹⁵. Briefly, the earthworms were rinsed with distilled water, dried, and ground. At least three earthworms from each treatment were used to extract RNA using Quick-Zol[®] (TriZol; Ludwig Biotech Co, Alvorada, Brazil), in accordance with the manufacturer's instructions. The extracted RNA was quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

qRT-PCR was performed using a thermocycler (Axygen[®] MaxyGene II Thermal Cycler; Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, EUA) with RNA samples treated with 0.2 μ L of DNase (Invitrogen Life Technologies[®], Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 5 min to digest any DNA contamination, and at 65°C for 10 min. Reverse transcription was performed using the following primers: EATLR (forward: 5'-GAGACATC-GCTGAAAACATC-3'; reverse: 5'-CTGCATCTGAATCTGGAGTC-3')²⁰ and AMP (forward: 5'-CATACTCGGAACG-CAAGAACC-3'; reverse: 5'-TTTGATGACCTTCTGCGGTG-3')²¹. RNA was reverse-transcribed to cDNA in the presence of 1 μ L of iScript reverse transcriptase and 4 μ L of iScript Mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using the following reaction steps: 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, 85°C for 5 min, and 5°C for 60 min.

qRT-PCR analysis was conducted using a 1 \times QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and 20 μ L containing 1 μ L of cDNA sample (1:20 dilution). The amplification of both genes was performed using the following cycling conditions: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 30 s, followed by a melting gradient from 50°C to 90°C (1°C increments every 5 s). Reactions were performed in duplicate, and β -actin (Y09623) was used as the housekeeping gene

(forward: 5'-CGCCTCTTCATCGTCCCTC-3'; reverse: 5'-GAACATGGTCGTGCCTCCG-3'). The amplification curves, melting curves, and standard curve slope were checked to ensure that non-specific amplification and the relative quantification of Ct values were determined¹⁹ and compared among BPA treatments.

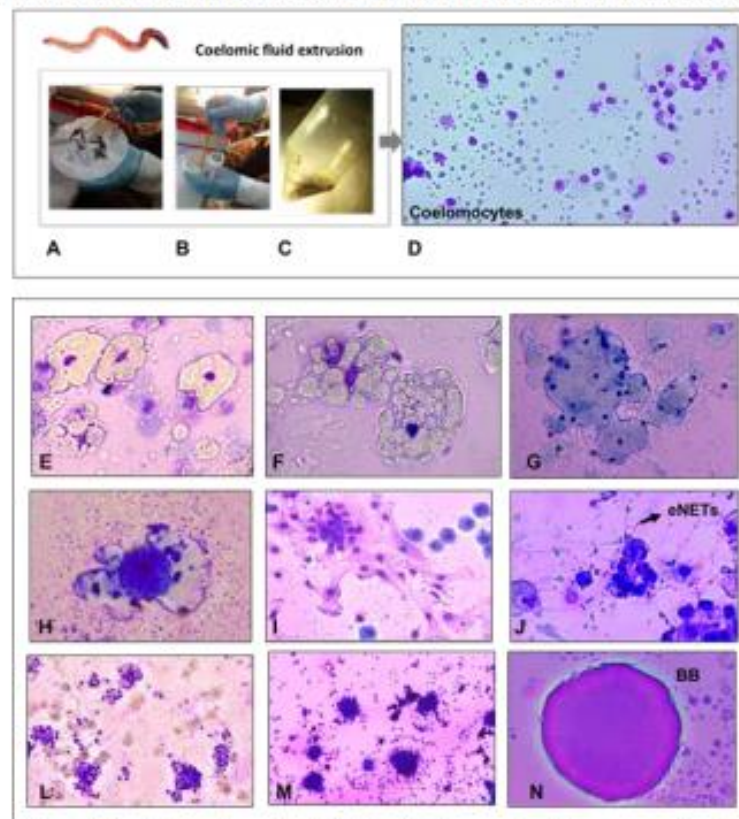


Figure 1 – Schematic for obtaining the coelomic fluid used in the experiments, immune mechanisms involving in the pathogens capture by *E. fetida* earthworms, and general outline of the study. (A) Three earthworms were selected, washed and dried to obtain coelomic fluid; (B) They were then transferred to a Falcon tube covered with a cotton swab to which 1 ml of ethyl ether was added, which is an irritating substance for the earthworm; (C) After 1 to 2 minutes, the earthworms expelled the yellowish coelomic fluid. Similar to human leucocytes, coelomocytes represent a group of heterogeneous cells, mainly eleocytes and amoebocytes. Mainly amoebocytes play a relevant role in the immune response induced by exposure to pathogens or antigenic substances. (D) The study postulated that bisphenol-A (BPA) exposure could impact earthworm immunocompetence in capture and kill pathogens. This process involves the main phases, which were compared among treatments: (D,E,F) cellular migration and fusion forming a polynucleated cytoplasmic mass, that exert chemotaxis in other coelomocytes; (G,H) production of cellular aggregates (I,J) forming polynucleate structures; (L,M) CAs interconnection formed by DNA and protein networks similar to human neutrophil extracellular traps eNETs; (8–9) CA retraction forming 1–2 mm wide nodules, with cells on its edge flatten out, that quickly darkens via melanization (brown bodies, BBs), stored in the posterior segments. The BBs are then deposited inside pockets of the worm's posterior segments. As BBs are not reabsorbed, the excess of these structures containing cell debris and dead pathogens induces an autotomy process, by which the earthworm cuts and eliminates these posterior parts, quickly regenerating its tail. The increase in BB deposition may indicate that the earthworm is trying to eliminate toxic or pathogenic components. On the other hand, the decrease in the formation of BBs in the presence of a chemical agent, such as BPA, may indicate a decrease in the earthworm's immunocompetence.

Statistical analysis

Data were statistically analyzed using the Prism GraphPad program. Quantitative variables were compared using one-way analysis of variance followed by Tukey's *post-hoc* test. Quantitative variables were analyzed using chi-square or Fisher's exact tests. All tests were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of BPA on coelomocytes population and apoptosis induction

Initially, it was verified whether 24-hour exposure to BPA at different concentrations could have a cytotoxic effect on the main groups of coelomocytes by analyzing the proportion of amoebocytes and eleocytes and the rate of cells killed by apoptosis or apoptotic cells. As can see in Figure 2, eleocytes are more complex and larger cells than amoebocytes, which can be detected via granulometric analysis (green cloud of cells). In the presence of BPA, the proportion of eleocytes increased while that of amoebocytes decreased when compared to control earthworms.

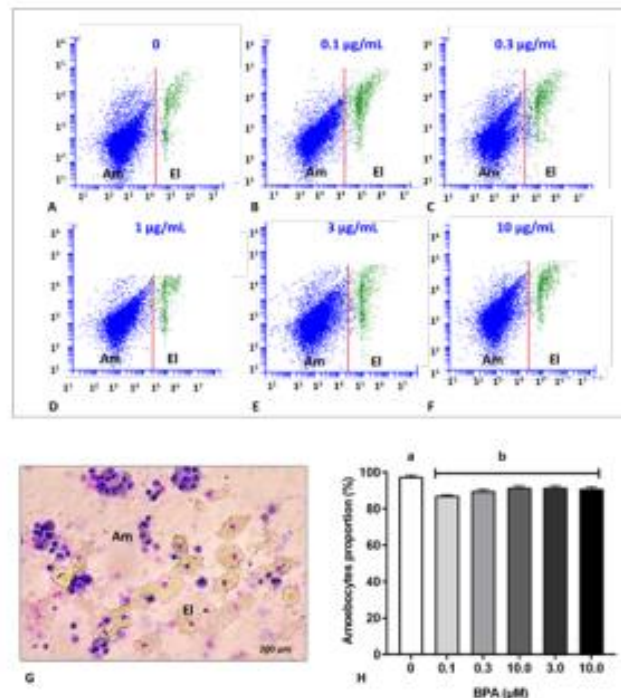


Figure 2 – BPA effects on *E. fetida* coelomocyte populations. (A-F) Representative flow cytometry of amoebocytes and eleocytes frequency identified by cell granulometry of earthworm BPA exposed at different concentrations. Am = amoebocytes; El=eleocytes. (G) microphotograph with amoebocytes which include smaller cells, generally blue, that come together to form spheroids, and eleocytes, which are larger cells with a cytomorphology similar to macrophages; (H) Comparison of amoebocytes proportion (%) in coelomocytes from earthworms BPA-exposed at different concentrations. Different letters indicated statistical differences ($p < 0.05$) determined by One-Way variance analysis followed by Tukey *post hoc* test.

Next, it was assessed whether exposure to BPA could increase the proportion of apoptotic events by flow cytometry analysis. The results showed a significant increase in apoptosis rates in the immune cells of earthworms exposed to lower concentrations of BPA (0.1-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), while higher concentrations showed a proportion of cells killed by apoptosis or apoptotic similar to the control (Figure 3).

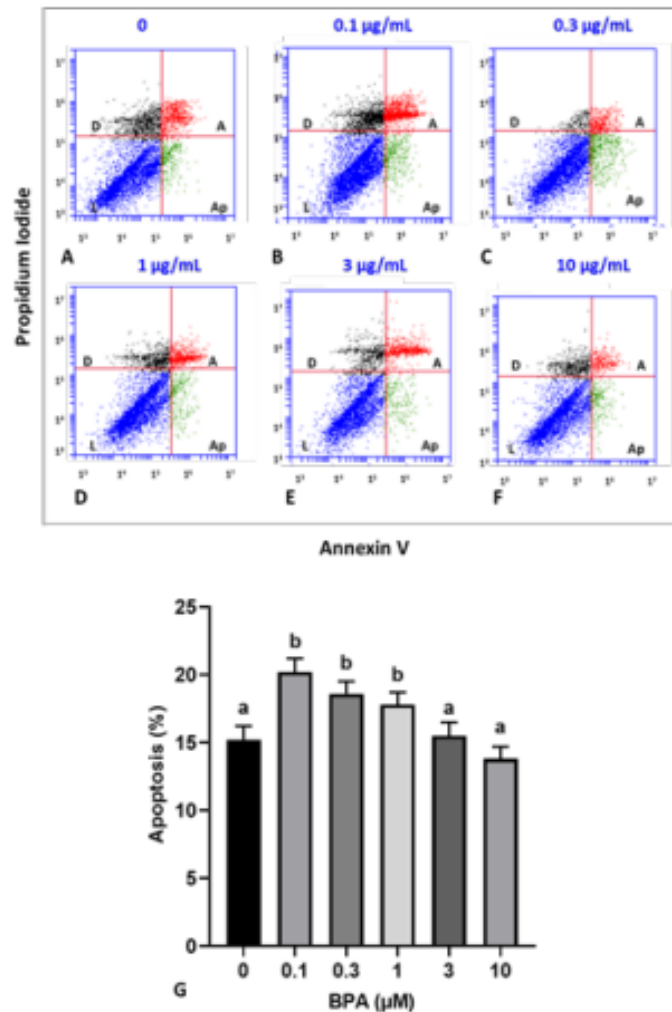


Figure 3 – Cytotoxic BPA effect on *E. fetida* coelomocytes. (A-F) representative flow cytometry chart showing general distribution of live cells (L), apoptotic cells (Ap), dead cells for other causes and cells dead by apoptosis (A) identified by Propidium Iodide (Y axis) and Annexin V (X axis) markers. Comparison in the proportion of apoptosis events among control and BPA at different concentrations was performed by One Way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Different letters indicated statistical differences among treatments with $p < 0.05$.

Effects of BPA on coelomocytes cellular proliferation

This analysis evaluated the impact of BPA on earthworm coelomocyte proliferation using cell cycle flow cytometry. After 24 h and 72h, BPA exposure triggered an increase in the frequency of cells in the S and G2 phases, indicating the stimulation of mitotic events. However, BPA at lower concentrations occurred more intense mitotic induction than at higher concentrations (Figure 4).

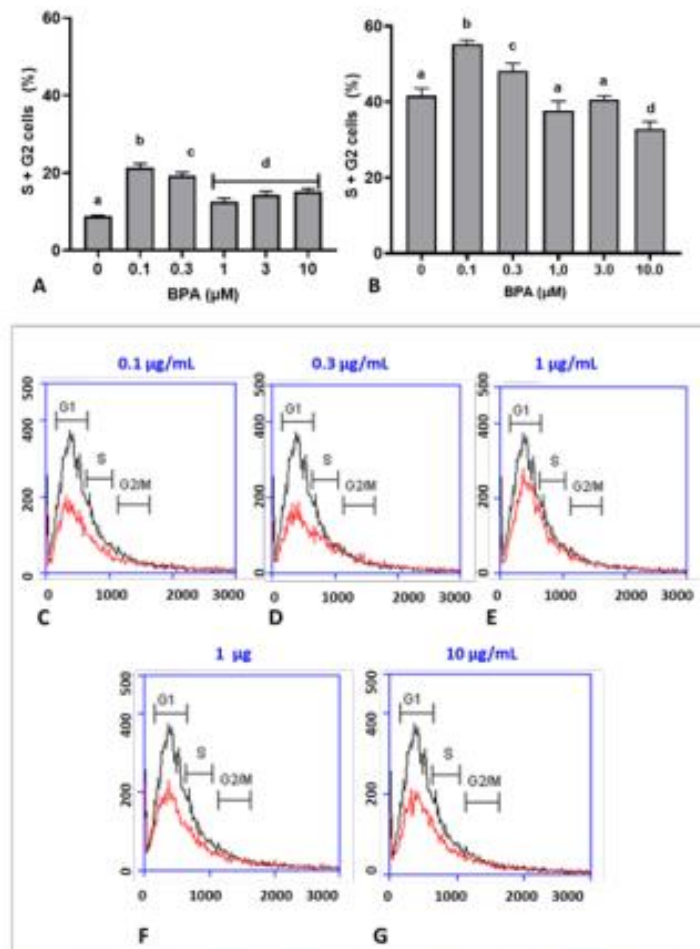


Figure 4 – Effect of Bisphenol-A (BPA) at different concentrations on *E. fetida* coelomocytes cell cycle.

(A) Comparison among S+G2 frequency in coelomocytes from earthworms 24h BPA-exposed. (B) Comparison among S+G2 frequency in coelomocytes from earthworms 72h BPA-exposed. Statistical analysis of A and B figures was performed with One Way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test. Different letters represent significant differences at $p < 0.05$. (C-G) Representative charts of flow cytometry of 72 h treatment showing cells frequency in G1, S and G2/M phases. The black graph represents the frequency of cell cycle phases in the control group, while the red graph represents the treated group of earthworms treated with BPA.

Effects of BPA on coelomocytes oxidative markers

Initially, the amount of total protein was calculated and compared between the control and earthworms exposed to different BPA concentrations, showing no significant alterations (Figure 5A). Contrary to our expectations, BPA induced a significant decrease in superoxide anion levels (Figure 5B). However, an elevation in the NO levels was observed in earthworms exposed at lower concentrations of this pollutant (0.1 to 1 μ M) (Figure 5C).

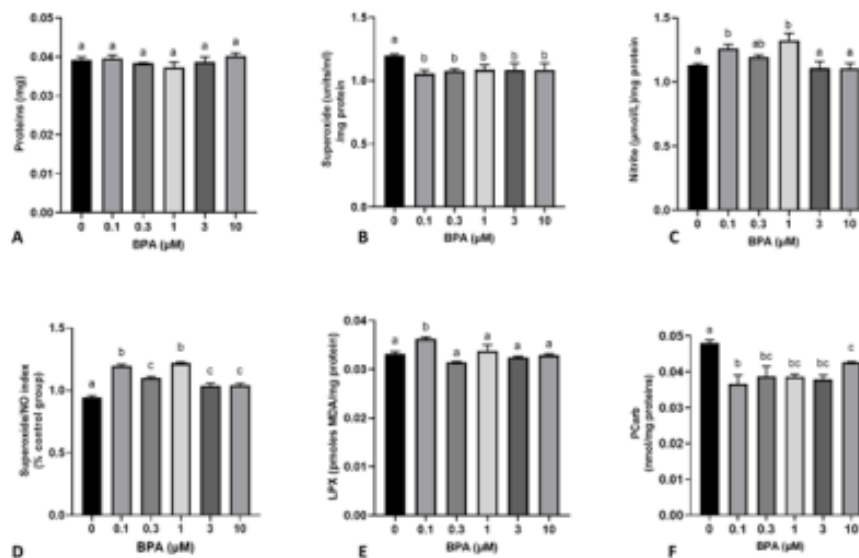


Figure 5 – Comparison of total protein and oxidative markers in earthworms exposed to BPA at different concentrations (0.1–10 μ M), 24 h. (A) Total protein. (B) Superoxide anion (S). (C) Nitric oxide (NO) estimated by nitrite concentrations. (D) S/NO index. (E) Lipoperoxidation quantified by TBARS-MDA assay. (F) Protein carbonylation. Treatments were statistically compared to the control by one-way analysis of variance followed by Tukey's test, and significant differences at $p < 0.05$ are identified by different letters. Considering the high affinity of the superoxide anion and NO, the ratio of these molecules was calculated and compared by dividing the concentration of the S anion by that of NO. In the control earthworms, the level of NO was slightly higher than that of anion S. However, exposure to BPA changed this index, which increased significantly in earthworms exposed to BP owing to an increase in the concentration of NO (Figure 5D). These results were more pronounced in earthworms treated with the lowest BPA (0.1–1 μ M). Except at 0.1 μ M BPA, in which an increase in LPX was observed, all other concentrations did not influence this oxidative marker (Figure 5E). In contrast, all BPA concentrations induced a decrease in PCarb levels compared with the control group (Figure 5F).

Effects of BPA on MN formation

The effects of BPA on chromosomal damage in *E. fetida* coelomocytes were evaluated using MN analysis in both amoebocytes and eleocytes. First, MN analysis was difficult because the cells tended to aggregate and fuse their cytoplasm. Therefore, the detection of individual and whole cells is more laborious. Figure 6 shows the representative micrographs of amoebocytes and eleocytes with relevant nuclear alterations. The results obtained by the sum of all types of coelomocytes are presented in Table 1, grouped by MN mitotic catastrophes (MIC) and chromosomal aberrations (Ab.C) frequencies.

Table 1 – Comparison of three main chromosomal alterations of *E. fetida* coelomocytes bisphenol-A (BPA) exposed at different concentrations

Alterations	Cells scored	BPA (μM)						p
		0	0.1	0.3	1	3	10	
MNs	1000	17 ^a	21 ^b	60 ^c	104 ^d	98 ^d	107 ^d	0.001
Ab.C	1000	02 ^a	05 ^b	18 ^c	21 ^c	19 ^c	19 ^c	0.001
MiC	1000	03 ^a	05 ^b	11 ^c	13 ^c	09 ^c	13 ^c	0.001

MNs, micronuclei; Ab.C, aberrant cells (two or more micronuclei); MiC, mitotic catastrophe. Statistical comparisons were performed using the Chi-squared non-parametric test.

MN frequency increased in a dose-dependent manner up to a concentration of 1 μM BPA. Between concentrations of 1 and 30 μM , the MN rate was similar and remained higher than that of the control and lower concentrations of BPA. The increase in Ab.C and MiC followed a pattern similar to that of MNs, with no significant differences in the distribution of these chromosomal alterations between concentrations of 0.3 and 10 μM BPA. It was not possible to accurately account for cells undergoing apoptosis due to the tendency of cytoplasmic fusion and the presence of many intracellular granules, mainly in some types of amoebocytes.

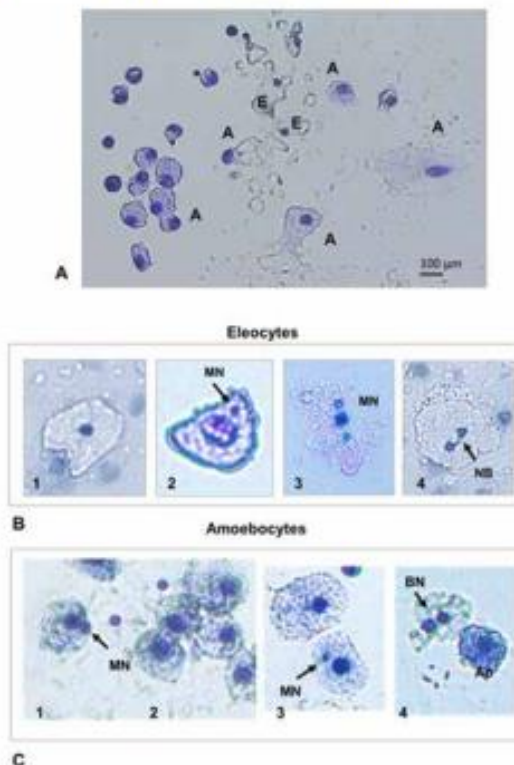


Figure 6 – Representative DNA damage alterations in coelomocytes of *E. fetida*. (A) Microphotograph presents a representative photo (100 \times magnification) showing individualized eleocytes (E) and amoebocytes (A), which were used in the micronucleus (MN) analyses. (B) Microphotograph 1 shows an unaltered eleocytes, with a small eccentric nucleus. Cells with one or more micronuclei (2,3) were observed as well as cells with nucleoplasmic bridge (NB) (4). (C) Amoebocytes include more rounded cells proportionately larger than the cytoplasm. Once the coelomic fluid is expelled, these cells tended to clump together quickly. In some situations, it was possible to detect cells undergoing apoptosis. However, they were not counted as they could be confused with cells undergoing cytoplasmic fusion process. As images from B and C figures are representative, they were extracted and enlarged from microphotographs of different treatments and also of the control group. For this reason, individualized scales are not presented and their original treatment is not identified.

Effects of BPA on immunocompetence markers

The changes in earthworm immunocompetence markers are summarized in Table 2 and Figure 6. The number of CAs per optical field at 200× magnification varied depending on the concentration of BPA to which earthworms were exposed for 24 h. The lowest concentration of BPA doubled the number of CAs compared with that in the control. However, the other concentrations significantly reduced the number of CAs per optical field compared with the control. This pattern indicates that BPA acted as an inhibitor of cell aggregation, which is part of the earthworm's initial immune defense against biotic and abiotic agents.

The perimeter of the CAs was also compared, considering aggregates with four or more amoebocytes, and the results did not show a dose-dependent pattern. While the lowest concentration of BPA had mean CAs perimeter similar to the control, earthworms exposed to 0.3 μM BPA had CAs with greater perimeter. At a concentration of 1 μM BPA, the perimeter of the CAs was significantly reduced compared with that of the control. A notable result was the extensive inhibition of eNET formation in earthworms exposed to BPA at all the concentrations tested. The low cell aggregation was somewhat corroborated by analysis of the storage pattern of BBs in the posterior segments of the earthworm body. The number of segments that also presented this accumulation was significantly lower than that observed in control earthworms.

Table 2 – Comparison of immunocompetence markers of *E. fetida* coelomocytes bisphenol-A (BPA) exposed at different concentrations.

Markers	BPA (μM)						p
	0	0.1	0.3	1	3	10	
CAs (number/field, 200× magnification)	7.6 ± 2.5 ^a	14.1 ± 4.5 ^b	2.0 ± 0.8 ^c	1.6 ± 0.9 ^c	1.8 ± 1.3 ^c	1.4 ± 0.6 ^c	0.001
CAs (Perimeter, μm)	64.9 ± 17.1 ^a	62.7 ± 15.2 ^a	133.3 ± 22.3 ^b	51.2 ± 12.5 ^b	33.4 ± 10.3 ^c	31.0 ± 8.2 ^c	0.001
eNETs (presence/10 fields, 200 x magnification)	9/10	0/10	0/10	1/10	2/10	0/10	0.001
BBs (presence/10 posterior segments, 200× magnification)	5/10 ^a	4/10 ^a	3/10 ^a	1/10 ^d	1/10 ^d	2/10 ^d	0.001

CA, cell aggregations in coelomic fluid (>4 amoebocytes); eNETs, Eisenia neutrophil extracellular traps; BBs, brown bodies counted in histological sections of 10 posterior segments. Statistical analyses of CA number and perimeter were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. eNETs and BBs were statistically compared between each treatment and control using Fisher's exact test. Different letters indicate significance at $p < 0.05$.

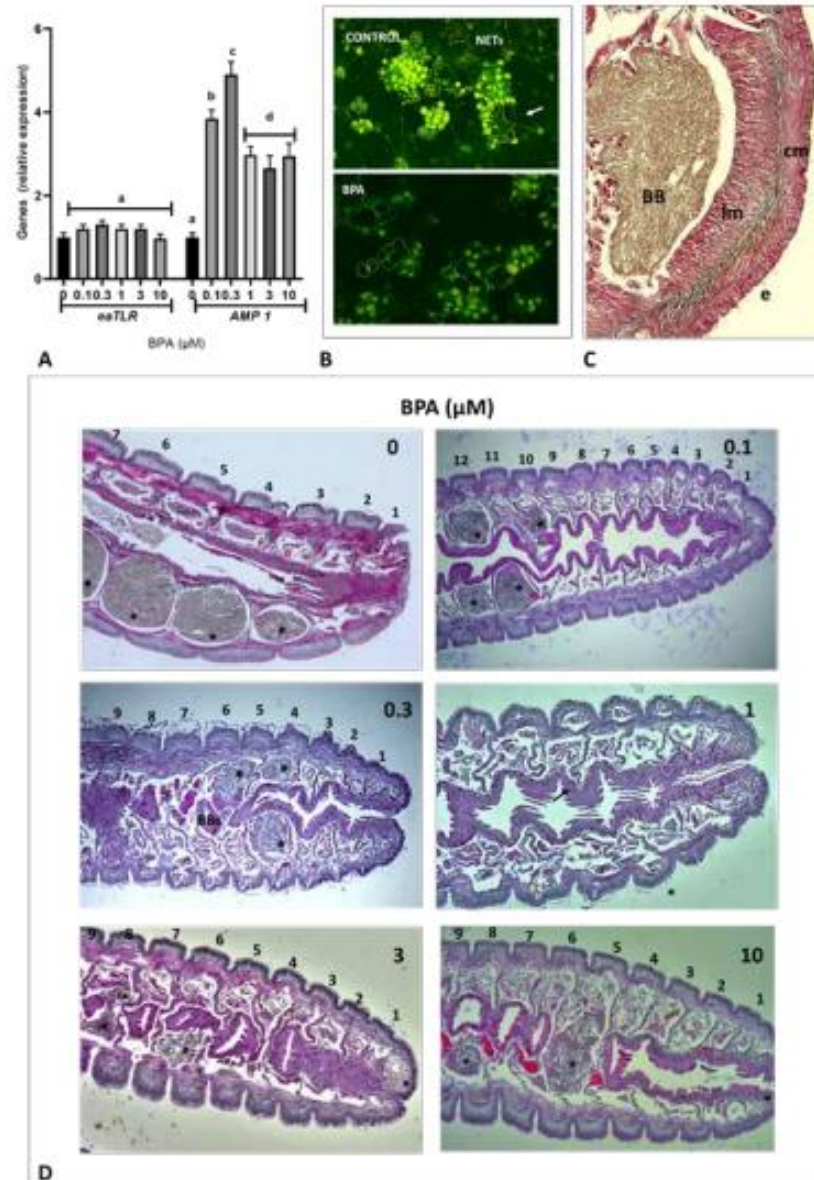


Figure 7 – Bisphenol-A (BPA) effect on *E. fetida* immunocompetence markers. (A) Comparison of expression of eaTLR and AMP1 genes among earthworms 24 h exposed to BPA at different concentrations (0.1, 0.3, 3, 1, and 10 µM) by qRT-PCR assay. Genes were normalized by β -actin a housekeeping gene. mRNAs of earthworms without BPA exposure (controls) were considered 1 and used as reference to calculate the relative mRNA expression of other treatments. Comparisons

were performed by one-way analysis of variance followed by Tukey' post-hoc test. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). (B) Representative microphotographs with inverted staining showing the presence of NETs in coelomic fluid from a control earthworm and absence of NETs in an earthworm exposed to 1 μM of BPA (400 \times magnification); (C) Detail of a histological section showing the accumulation of brown bodies (BBs) in the coelomic cavity located laterally to the intestines, in the posterior segments of the earthworm. These brown bodies clump together and become very compacted. At a certain moment, which can be triggered by the volume or perhaps by the chemical nature of the residues, the earthworm performs autotomy, eliminating these segments that are quickly regenerated. The microphotograph shows a detail of the body wall with the longitudinal musculature (lm), circular musculature (cm), and the epidermis covered by a cuticle (e). (D) Representative longitudinal histological sections of the last posterior segments of control earthworms and treated for 24 h with different concentrations of BPA. Contrary to expectations, earthworms exposed to BPA presented less compacted brown bodies (BBs *), and with smaller distribution among the segments, mainly in the last five segments close to the anal opening. As images from B and C figures are representative, they were extracted and enlarged from microphotographs of different treatments and also of the control group. For this reason, individualized scales are not presented and their original treatment is not identified.

BPA exposure induced changes in the expression of the *eaTLR* and *AMP1* genes (Figure 6A). *AMP1* was significantly overexpressed in earthworms exposed to BPA for 24 h at all concentrations tested, with a greater intensity in earthworms exposed to a concentration of 3 μM . In contrast, the effect of BPA on *eaTLR* gene expression was greatly reduced. Therefore, BPA triggers an imbalance in the genes directly associated with the immune response.

DISCUSSION

In the present study, red earthworms were used as an experimental model. The results support the hypothesis that a link exists between oxidative stress events and changes in immunocompetence, especially in the inflammatory response triggered by BPA exposure. We chose to carry out an acute effect study based on a previous investigation conducted by Oliveira et al.¹¹ who reported that exposure to BPA for 48 h significantly decreased the survival of *E. fetida*. Acute BPA exposure has a significant impact on the earthworm immune system, mainly at lower concentrations. It is possible that the effect of BPA on the earthworm immune system also occurs in humans. In fact, many components of the innate immune system have been conserved during metazoan evolution, and for this reason, some species, such as the fruit fly *Drosophila melanogaster*²⁶ and the nematode *Caenorhabditis elegans*, have been used as models to study innate immunity²⁷. Some studies performed in the last decade have suggested that the use of *Eisenia* would be relevant to the understanding of invertebrate innate immunity¹².

BPA is considered to be one of the most widely used synthetic compounds in the world, resistant to degradation, and able to bioaccumulate in the environment²⁸. In general, the results showed that BPA affected the analyzed markers, but this effect did not follow a dose-response pattern and was limited to the lowest concentrations (0.1–1 μM). The more intense effect of low BPA doses has been previously described in other studies, suggesting that BPA interacts with and disrupts several signaling pathways²⁹. Considering regulatory resolutions regarding exposure to BPA, the four concentrations tested in this study were lower than the maximum dose recommended by the Brazilian health regulatory agency (Anvisa, Health Ministry)³⁰: 0.1, 0.3, 1.0, and 3.0 μM , which is approximately equal to 0.02, 0.06, 0.3, and 0.6 mg/kg food/day, respectively. Only 10 μM (6 mg/kg food/day) was above the maximum recommended limit. However, this maximum limit is relatively high compared to other regulatory agencies, such as European Food Safety Authority (EFSA)³¹, which lowered the maximum limit to 0.05 mg/Kg food/day in January 2018. Even though the concentrations tested were below the exposure limits recommended by the Ministry of Health in Brazil and other regulatory agencies, such as the Food and Drug Administration (FDA), the effect of BPA on earthworms is worrying. This is because earthworms are highly relevant in the maintenance of soil quality, and the effect of exposure to hormonal switching agents could have unpredictable consequences.

BPA is considered an important risk factor for endocrine, immune, and CNT diseases, including neurological, cardiovascular, reproductive, and oncological conditions²². A large proportion of these illnesses associated with BPA exposure are related to the establishment of low-grade chronic inflammatory states, which ultimately represent an immunocompetence impairment in the resolution of inflammatory responses²³. The data described herein corroborate this assumption. A synthesis of the potential mechanisms underlying the alterations that lead to impaired immunocompetence triggered by BPA in *E. fetida* is presented in Figure 8.

The interpretation of the results obtained is complex and requires speculations based on previous evidence related to oxidative metabolism in the inflammatory response, mainly involving the superoxide anion and NO. After 24h of exposure to BPA, earthworms showed divergent results with respect to the evaluated oxidative markers. Regarding the results involving the superoxide anion and NO, we calculated a ratio index of the superoxide levels divided by the NO levels for the control and BPA-treated earthworms. The results showed a significant increase in these indices in earthworms exposed to all BPA concentrations investigated, indicating that this molecule induced an S-NO imbalance via an increase in the NO levels.

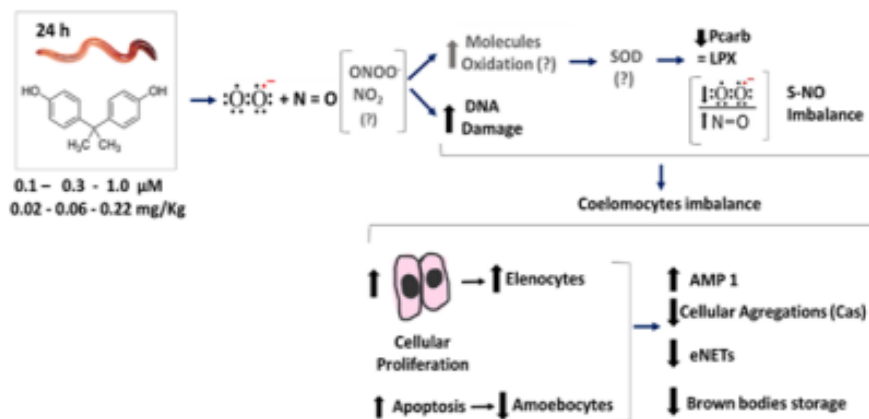


Figure 8 – Putative model of BPA effects on innate metabolism involving oxidate based in data described here using *E. fetida* as experimental model

However, the oxidation of macromolecules, such as lipids and proteins, was not pronounced in earthworms exposed to BPA. In contrast, all the concentrations of this molecule induced a significant decrease in protein carbonylation. These data seem inconsistent when considering the increase in the rate of DNA damage demonstrated by the presence of micronuclei and other chromosomal alterations, as well as the frequency of apoptosis. A previous report on the effect of BPA on earthworms also reported similar toxic effects in this organism²¹⁻²⁴.

Similar to leukocytes, coelomocytes are heterogeneous cells that are generically classified into two groups: amoebocytes and eleocytes, also known as chloragocytes²⁵. Previous studies have shown that amoebocyte immune responses involve phagocytosis, ROS production, and cytotoxic effects against microorganisms. Therefore, ROS molecules are relevant components of earthworm defense against pathogens, including an increase in some oxidant molecules, such as superoxide anions and NO²⁵⁻²⁶. In particular, superoxide plays a strategic role in phagocytic cells, which use this ROS to kill

and digest microorganisms. Therefore, in phagocytic cells, such as coelomocytes, an elevation in the superoxide levels can originate from spontaneous processes or by the mediation of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase enzyme, which is strategically immunocompetent²⁷.

NO also has a relevant role in the inflammatory response, mainly related to phagocytic cells, and has been shown to suppress neutrophil phagocytic activity. In this context, the evidence suggests that superoxide and NO interplay fine-tunes mechanisms regulating the life and death of neutrophils²⁸.

In this context, we postulated that BPA could increase superoxide levels in coelomocytes, inducing spontaneous reactions with NO molecules, which generate reactive nitrogen species (RNS), especially peroxynitrite (ONOO⁻). Peroxynitrite, in turn, forms NO₂ and hydroxyl radicals (OH[•]), which have a high affinity for DNA, causing extensive damage to this molecule²⁸. This could be the main route that explains the impact of BPA in increasing DNA damage, as assessed through micronucleus analysis. Increased genotoxicity is also closely related to the induction of apoptotic events, as observed in the results described here. However, because the ROS levels need to be finely regulated to avoid undesirable effects, it has been well established that coelomocytes have antioxidant defense strategies, including enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (CAT)²⁹. For this reason, it is possible that after 24 h, the oxidation rates of lipids and proteins may have decreased, while the DNA damage rate was assessed through MN and apoptosis rates indicating relevant BPA genotoxic effect.

Genotoxicity triggered by BPA exposure has been previously described in rodents, causing an increase in the frequency of MN in polychromatic erythrocytes (PCEs), structural chromosome aberrations in bone marrow cells, and DNA damage in blood lymphocytes³⁰. BPA also induces micronucleus formation in cultured lymphocytes. As micronucleus tests provide important information about a chemical's ability to interfere with chromosome structure and function, this assay confirms that BPA has genotoxic effects in several species, including earthworms. It is also important to note that MN tests must be performed on actively dividing cells. In our study, we found that BPA induced an increase in the rate of cell proliferation, thus making it possible to perform the test. However, performing these analyses was challenging because the collected coelomocytes present in the coelomic fluid tended to migrate, cluster, and form large polynucleated cytoplasmic masses (Figure 1B). Nevertheless, it was possible to observe the formation of micronuclei in different types of coelomocytes.

The induction of cell proliferation, increasing the amoebocyte concentration, confirmed the action of BPA on the *E. fetida* immune system. Coelomocyte functions are associated with the expression of genes, such as eaTLR²⁰, as well as AMP-like proteins, also known as lumbricin 1⁴¹.

However, exposure to BPA induced an antagonistic response in the two genes studied, as the AMP1 gene was activated and eaTLR did not modify its expression. This result is quite exciting, considering that these genes are highly sensitive to biotic and abiotic environmental factors that pose a danger to earthworm homeostasis. Generally, these genes are overexpressed in the presence of pathogens²⁰⁻⁴²⁻⁴³. Antimicrobial peptides, such as AMP1, are important contributors to non-specific host defense in both vertebrates and invertebrates, and are structurally conserved during phylogenesis⁴⁴. Therefore, it was not surprising that BPA induced an increase in AMP-1 expression.

Immune cells express pattern recognition receptors (PRRs), which are able to detect danger by recognizing specific pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)⁴⁵. However, the non-responsiveness of the eaTLR gene to BPA is an unexpected result, considering that exposure to this pollutant induces DNA damage, apoptosis, and increases the concentration of earthworm amoebocytes. This type of action has been previously observed when earthworms are exposed to other toxic agents, such as rotenone, and previous studies have shown that some pollutants, such as rotenone¹⁵ and titanium dioxide nanoparticles⁴⁶, can induce the downregulation of the eaTLR gene in earthworms.

This antagonistic effect between the expression of AMP1 and eaTLR genes may be related to the decrease in the immunocompetence of earthworms caused by BPA in response to exposure to yeasts. In this way, molecules that decrease or do not induce the upregulation of TLR genes, such as BPA, could impair the earthworm's immune system, with unpredictable consequences for their survival.

However, we must be careful when translating these results to humans. This is because our species has hepatic mechanisms that are highly efficient for BPA clearance⁴⁷. However, there is evidence that BPA is associated with an increased risk of certain types of cancers³². The extent to which this association could be linked to the BPA induction of DNA damage and the kind of "blinding of the immune system" triggers less efficiency in recognizing and killing carcinogenic cells. Although this assumption is speculative, it requires further investigation.

CONCLUSION

The results described here support the hypothesis that BPA induces oxidative stress, causing an imbalance in superoxide and NO levels and DNA damage, which may induce alterations in the earthworm immune response. Despite the inflammatory activation triggered by BPA, the immunocompetence of earthworms in capturing and destroying external agents, such as yeast, is impaired. Therefore, the association between DNA damage and changes in innate immune metabolism could be a relevant part of the action of BPA associated with the risk of developing NCDs, especially cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs). Moreover for the support from the Department of Morphology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil, especially the Marina de Souza Vencato and Professor Marcelo Leite da Veiga.

REFERENCES

- Abraham A, Chakraborty P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health*. 2020 Jun; 25;35(2):201-210.
- Balistrieri A, Hobohm L, Srivastava T, Meier A, Corriden R. Alterations in human neutrophil function caused by bisphenol A. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2018 Nov. 1;315(5):C636-642.
- Nowak K, Jabłońska E, Ratajczak-Wrona W. Neutrophils life under estrogenic and xenoestrogenic control. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Feb.;186:203-211.
- Ratajczak-Wrona W, Rusak M, Nowak K, Dabrowska M, Radziwon P, Jablonska E. Effect of bisphenol A on human neutrophils immunophenotype. *Sci Rep*. 2020 Feb. 20;10(1):3.083.
- Ratajczak-Wrona W, Garley M, Rusak M, Nowak K, Czerniecki J, Wolosewicz K, et al. Sex-dependent dysregulation of human neutrophil responses by bisphenol A. *Environ Health*. 2021 Dec.;20(1):5.
- Hugo Del Rio Araiza V. Bisphenol A, an endocrine-disruptor compound, that modulates the immune response to infections. *Front Biosci*. 2021;26(2):346-362.
- Cimmino I, Oriente F, D'Esposito V, Liguoro D, Liguoro P, Ambrosio MR, et al. Low-dose Bisphenol-A regulates inflammatory cytokines through GPR30 in mammary adipose cells. *J Mol Endocrinol*. 2019 Nov.;63(4):273-283.
- Kimber I. Bisphenol A and immunotoxic potential: A commentary. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017 Nov.;90:358-363.
- Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. 2019 Jul.;25:101084.
- Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2020 Jan. 24;15(1):493-518.

- ²¹ Oliveira KMGD, Carvalho EHDS, Santos Filho RD, Sivek TW, Thá EL, Souza IRD, et al. Single and mixture toxicity evaluation of three phenolic compounds to the terrestrial ecosystem. *J Environ Manage.* 2021 Oct.;296:113226.
- ²² Novo M, Verdú I, Trigo D, Martínez-Guitarte JL. Endocrine disruptors in soil: Effects of bisphenol A on gene expression of the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018 Apr.;150:159-167.
- ²³ Homa J. Earthworm coelomocyte extracellular traps: structural and functional similarities with neutrophil NETs. *Cell Tissue Res.* 2018 Mar.;371(3):407-414.
- ²⁴ Alves ADO, Weis GCC, Unfer TC, Assmann CE, Barbisan F, Azzolin VF, et al. Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. *Food Chem Toxicol.* 2019 Dec.;134:110809.
- ²⁵ Cruz Jung IED, Assmann CE, Mastella MH, Barbisan F, Spillari Ruaro RA, Roggia I, et al. Superoxide-anion triggers impairments of immune efficiency and stress response behaviors of *Eisenia fetida* earthworms. *Chemosphere.* 2021 Apr.;269:128712.
- ²⁶ Pérez S, Rius-Pérez S. Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation: A Redox Perspective. *Antioxidants (Basel).* 2022 Jul. 19;11(7):1.394.
- ²⁷ Wang W, Zhang J, Wu J, Yu R, Zhang Y, Sun L, et al. Acute Toxicity and Ecotoxicological Risk Assessment of Three Volatile Pesticide Additives on the Earthworm-*Eisenia fetida*. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Oct. 26;18(21):11.232.
- ²⁸ Cho JH, Park CB, Yoon YG, Kim SC. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1998 Oct.;1408(1):67-76.
- ²⁹ Mo X, Qiao Y, Sun Z, Sun X, Li Y. Molecular toxicity of earthworms induced by cadmium contaminated soil and biomarkers screening. *J Environ Sci.* 2012 Aug.;24(8):1.504-1.510.
- ³⁰ Škanta F, Roubalová R, Dvořák J, Procházková P, Bilej M. Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Dev Comp Immunol.* 2013 Dec.;41(4):694-702.
- ³¹ Morabito C, Rovetta F, Bizzarri M, Mazzoleni G, Fanò G, Mariggio MA. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med.* 2010 Feb. 15;48(4):579-589.
- ³² Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol.* 2012 Dec.;280(2):164-170.
- ³³ Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* 1996 Jan.;20(2):251-256.
- ³⁴ Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1990 [cited 2023 May. 29]. p. 464-478. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687990086141H>
- ³⁵ Holland N, Bolognesi C, Kirschvolders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res Mutat Res.* 2008 Jul.;659(1-2):93-108.
- ³⁶ Troha K, Buchon N. Methods for the study of innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *WIREs Dev Biol* [Internet]. 2019 Sept. [cited 2023 May. 29];8(5). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wdev.344>
- ³⁷ Kim DH. Signaling in the innate immune response. *WormBook.* 2018 Aug. 16;1-35.
- ³⁸ Ma Y, Liu H, Wu J, Yuan L, Wang Y, Du X, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ Res.* 2019 Sept.;176:108575.
- ³⁹ Jalal N, Surendranath AR, Pathak JL, Yu S, Chung CY. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol Rep.* 2018;5:76-84.
- ⁴⁰ ANVISA. Bisfenol A [Internet]. [cited 2021 Dec 20]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/sectorregulado/regularizacao/alimentos/bisfenol-a>
- ⁴¹ EFSA. Bisphenol A [Internet]. Available from: [https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol#:~:text=Bisphenol%20A%20\(BPA\)%20is%20a,to%20manufacture%20plastics%20and%20resins.&text=EFSA%20published%20a%20comprehensive%20re,to%204%20%2C2%20B5g%2Fkg%20bw](https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol#:~:text=Bisphenol%20A%20(BPA)%20is%20a,to%20manufacture%20plastics%20and%20resins.&text=EFSA%20published%20a%20comprehensive%20re,to%204%20%2C2%20B5g%2Fkg%20bw)
- ⁴² Cimmino I, Fiory F, Perruolo G, Miele C, Beguinot F, Formisano P, et al. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug. 11;21(16):5761.
- ⁴³ Furman D, Campisi J, Verdín E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019 Dec.;25(12):1.822.

- ²⁴ Babić S, Barišić J, Bielen A, Bošnjak I, Sauerborn Klobučar R, Ujević I, et al. Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol A concentrations using the soil invertebrate *Eisenia fetida*. *J Hazard Mater*. 2016 Nov.;318:477-486.
- ²⁵ Bilej M, De Baetselier P, Beschin A. Antimicrobial defense of the earthworm. *Folia Microbiol (Praha)*. 2000 Aug.;45(4):283-300.
- ²⁶ Homa J, Zorska A, Wesolowski D, Chadzinska M. Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. *J Comp Physiol B*. 2013 Apr.;183(3):313-322.
- ²⁷ D. Varela C, Farhana A. *Biochemistry, Superoxides*. Treasure Island (Florida: StatPearls Publishing.
- ²⁸ Galkina SI, Golenkina EA, Viryasova GM, Romanova YM, Sud'ina GF. Nitric Oxide in Life and Death of Neutrophils. *Curr Med Chem*. 2019 Nov. 19;26(31):5.764-5.780.
- ²⁹ Homa J, Ortmann W, Kolaczowska E. Conservative Mechanisms of Extracellular Trap Formation by Annelida *Eisenia andrei*: Serine Protease Activity Requirement. Palaniyar N, editor. *PLOS ONE*. 2016 Jul. 14;11(7):e0159031.
- ³⁰ Tiwari D, Kamble J, Chilgunde S, Patil P, Maru G, Kawle D, et al. Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2012 Mar.;743(1-2):83-90.
- ³¹ Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010 Sept.;1(5):440-464.
- ³² Wang X, Li X, Sun Z. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the earthworm *Eisenia fetida* response to *Escherichia coli* O157:H7. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018 Sep;160:60-66.
- ³³ Mincarelli L, Tiano L, Craft J, Marcheggiani F, Vischetti C. Evaluation of gene expression of different molecular biomarkers of stress response as an effect of copper exposure on the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology*. 2019 Oct.;28(8):938-948.
- ³⁴ Kumar P, Kizhakkedathu J, Straus S. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*. 2018 Jan. 19;8(1):4.
- ³⁵ Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*. 2018 Jun.;59:391-412.
- ³⁶ Navarro Pacheco NI, Roubalova R, Semerad J, Grasserova A, Benada O, Kofronova O, et al. In Vitro Interactions of TiO₂ Nanoparticles with Earthworm Coelomocytes: Immunotoxicity Assessment. *Nanomaterials*. 2021 Jan. 19;11(1):250.
- ³⁷ Collet SH, Picard-Hagen N, Lacroix MZ, Puel S, Viguié C, Bousquet-Melou A, et al. Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 May.;284(3):323-329.

Received: May 30, 2023

Accepted: November 8, 2023

Published: February 21, 2024

Authors' Contributions:

Bárbara Osmarin Turra: Investigation; Writing – original draft; Validation.

Ivana Beatrice Mânica da Cruz: Writing – original draft.

Nathália Cardoso de Afonso Bonotto: Data curation.

Cibele Ferreira Teixeira: Methodology.

Moisés Mastella: Methodology.

Wellington Claudino Ferreira: Methodology.

Ivo Emilio da Cruz Jung: Methodology.

Elize Aparecida Santos Musachio: Visualization.

Marina Prigol: Visualization.

Fernanda Barbisan: Supervision.

All authors have approved the final version of the text.

Conflict of interest: There are no conflicts of interest.



ACUTE BISPHEENOL-A EXPOSURE TRIGGERS SUPEROXIDE-NITRIC OXIDE IMBALANCE
AND IMMUNOCOMPETENCE IMPAIRMENT OF EISENIA FETIDA EARTHWORM
Turra BQ, da Cruz BM, Bonotto NC de A, Teixeira CF, Mastella M, Ferreira WC. et al.

Corresponding Author

Fernanda Barbisan
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.
Av. Roraima nº 1000 Cidade Universitária Bairro – Camobi.
Santa Maria/RS, Brasil. CEP 97105-900
e-mail: fernandabarbisan@gmail.com

Editor: Dr. Matias Nunes Frizzo

Editor-in-chief: Dra. Adriane Cristina Bernat Kolankiewicz

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons license.



4.2 ARTIGO 2 (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)

Os resultados deste artigo, submetido à revista *Brazilian Journal of Biology*, estão descritos na íntegra, a partir da página 97 desta tese.

Full title: Bisphenol A-induced cyto-genotoxicity on retinal pigment epithelial cells is differentially modulated by a multi-supplement containing guarana, selenium, and L-carnitine

Short running title: **Bisphenol A and Multi-supplement in Retinal Cells**

Bárbara Osmarin Turra (<https://orcid.org/0000-0003-4175-9534>)¹, Nathália Cardoso de Afonso Bonotto (<https://orcid.org/0000-0003-3733-3549>)², Cibele Ferreira Teixeira (<https://orcid.org/0000-0003-0058-3827>)³, Maria Eduarda Chelotti (<https://orcid.org/0000-0002-6581-6604>)⁴, Joana Rosa Rodrigues (<https://orcid.org/0000-0001-8931-4345>)⁵, Moisés Henrique Mastella (<https://orcid.org/0000-0001-6990-6079>)⁶, Verônica Farina Azzolin (<https://orcid.org/0000-0002-8191-5450>)⁷, Euler Esteves Ribeiro (<https://orcid.org/0000-0002-2716-7009>)⁸, Fernanda Barbisan (<https://orcid.org/0000-0002-2960-7047>)^{9*} Ivana Beatrice Mânica Cruz (<https://orcid.org/0000-0003-3008-6899>)¹⁰

¹Turra, B.O. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Postgraduate Program in Pharmacology, Department of de morphology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

²Bonotto, N.C.A. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Postgraduate Program in Pharmacology, Department of de morphology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

³Teixeira, C.F. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Postgraduate Program in Pharmacology, Department of de morphology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Chelotti, M.E. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Department of de morphology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

⁵Rodrigues, J. R. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Department of de morphology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

⁶Mastella, M.H. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Postgraduate Program in Pharmacology, Department of de morphology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

⁷Azzolin, V, F. Open University of the Third Age Foundation of Amazonas (FUNATI), Gerontec Laboratory. CEP: 69029-040, Manaus, AM, Brazil.

⁸Ribeiro, E.E. Open University of the Third Age Foundation of Amazonas (FUNATI), Gerontec Laboratory. CEP: 69029-040, Manaus, AM, Brazil.

⁹ Barbisan, F*. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Pathology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

¹⁰ Cruz, I.B.M: Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Pathology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding Author: Fernanda Barbisan. Federal University of Santa Maria (UFSM), Biogenomics Laboratory, Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Pathology, Health Sciences Center. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: fernanda-barbisan.1@ufsm.br

- 6 Figures.

-2 Tables.

Abstract

Bisphenol A (BPA) may adversely affect human health by inducing oxidative stress and irreversible damage to cells. Bioactive compounds found in some functional foods, individually or in combination, can attenuate the negative effects of BPA exposure; an example is the multi-supplement containing guarana (Gua), selenium (Se), and L-carnitine (LC) —GSC— which has already demonstrated antioxidant, genoprotective, and immunomodulatory activities. This study aimed to determine the effect of GSC and its constituents on oxidative and genotoxic alterations triggered by BPA exposure in the retinal epithelial cell line. The cells exposed to BPA (0.001, 0.01, 0.1, 1, 3, and 10 μM) to determine the lowest concentration required to induce cyto-genotoxicity. ARPE-19 cells were then concomitantly exposed to the selected BPA concentration, GSC, and its components (Gua, 1.07 mg/mL; Se, 0.178 $\mu\text{g/mL}$; and LC, 1.43 mg/mL). Flow cytometry, biochemical assays, qRT-PCR, genotoxicity, apoptosis, and cellular proliferation. Based on our results, 10 μM of BPA could induce cyto-genotoxic and oxidative alterations. BPA did not alter the Bcl-2/BAX expression ratio but induced Casp3 and Casp8 overexpression, suggesting that apoptosis was induced mainly via the extrinsic pathway. GSC partially reversed the alterations triggered by BPA in ARPE-19 cells. However, Se had unexpected negative effects on ARPE-19 cells. The multi-supplement GSC may attenuate changes in oxidative and genotoxic markers related to exposure of ARPE-19 cells to BPA. our results revealed that the antioxidant, anti-apoptotic, and genoprotective properties of GSC were not universally shared by its individual, once Se did not exhibit any positive impact.

Keywords: food supplement, apoptosis, ARPE-19 cells, bisphenol -A.

Resumo

A citogenotoxicidade induzida pelo Bisfenol -A em células epiteliais pigmentares da retina é modulada diferencialmente por um multissuplemento contendo guaraná, selênio e L-carnitina

O Bisfenol A (BPA) pode afetar negativamente a saúde humana, induzindo estresse oxidativo e danos irreversíveis às células. Os compostos bioativos encontrados em alguns alimentos funcionais, individualmente ou em combinação, podem atenuar os efeitos negativos da exposição ao BPA; um exemplo é o multissuplemento contendo guaraná (Gua), selênio (Se) e L-carnitina (LC) —GSC— que já demonstrou atividades antioxidantes, genoprotetoras e imunomoduladoras. Este estudo teve como objetivo determinar o efeito do GSC e seus constituintes nas alterações oxidativas e genotóxicas desencadeadas pela exposição ao BPA na linhagem celular epitelial da retina (ARPE-19). Células foram tratadas em diferentes concentrações de BPA (0,001, 0,01, 0,1, 1, 3 e 10 μM) a fim de determinar a concentração mais baixa necessária para induzir citogenotoxicidade. As células ARPE-19 foram então expostas concomitantemente à concentração selecionada de BPA, o GSC e seus componentes (Gua, 1,07 mg/mL; Se, 0,178 $\mu\text{g/mL}$; e LC, 1,43 mg/mL). Ensaios de citometria de fluxo, bioquímicos, qRT-PCR, genotoxicidade, apoptose e proliferação celular foram executados. Com base em nossos resultados, 10 μM de BPA foi capaz de induzir alterações citogenotóxicas e oxidativas. O BPA não alterou a razão de expressão de Bcl-2/BAX, mas induziu a superexpressão de Casp3 e Casp8, sugerindo que a apoptose foi desencadeada principalmente pela via extrínseca. O GSC reverteu parcialmente as alterações desencadeadas pelo BPA nas células ARPE-19. No entanto, o Se teve efeitos negativos inesperados nas células ARPE-19. O GSC multissuplemento pode atenuar alterações nos marcadores oxidativos e genotóxicos relacionados à exposição das células ARPE-19 ao BPA. Nossos resultados revelaram que as propriedades antioxidantes,

antiapoptóticas e genoprotetoras do GSC não foram universalmente compartilhadas pelo seu indivíduo, uma vez que o Se não apresentou nenhum impacto positivo.

Palavras -Chave: Suplemento alimentar, apoptose, células ARPE-19, bisfenol – A.

Introduction

Bisphenol A (BPA), the plastic monomer chemically named 4,4-isopropylidene diphenol (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-propane), is one of the highest-volume chemicals produced worldwide. It is used to manufacture polycarbonate plastics, epoxy resins, food packaging, and household items. Based on epidemiological and experimental investigations, BPA can adversely affect human health because it is an estrogen-like hormone (Abraham and Chakraborty, 2020; Tarafdar et al., 2022). BPA is associated with the risk of carcinogenesis, reproductive toxicity, infertility, and abnormal nervous system development (Murata and Kang, 2018). BPA and its analogs can affect eye function given their ability to accumulate in the aqueous humor (Flieger et al., 2022) exhibiting toxicity at certain stages of neural retinal development (Li et al., 2021).

Some organs, such as the eyes, can be more susceptible to the negative effects of BPA. Experimental studies, such as those conducted by Chiang et al. (2022), have revealed that BPA triggers oxidative stress and apoptotic events in retinal pigment epithelial cells (ARPE-19), which were used as an *in vitro* model of age-related macular degeneration (AMD). AMD affects millions of people and is a leading cause of blindness globally. Oxidative stress is considered a major contributor to the emergence and progression of AMD because it acts directly on retinal pigment epithelial cells by accumulating cellular waste (such as lipofuscin and macromolecule oxidation products) and impairing autophagic processes (Zhang et al., 2020). These events contribute to establishing chronic inflammatory states and vascular alterations related to AMD pathology (Tan et al., 2020).

The effects of BPA can be attenuated by some plant extracts or bioactive molecules that have antioxidant, genoprotective, and anti-inflammatory activities (Nie and Wang, 2022). However, the mechanisms underlying the protective effects of these bioactive compounds

against the adverse effects of BPA exposure require clarification. To determine whether different dietary components with well-known antioxidant and genoprotective activities have similar effects against the alterations caused by BPA, *in vitro* experiments were performed using ARPE-19 cells, a commercially available retinal pigment epithelial cell line (Chiang et al., 2022).

Studies performed by our research team revealed the *in vitro* and *in vivo* antioxidant and immunomodulatory actions of a multi-supplement named GSC, which contains guarana (Gua) (*Paullinia cupana*) extract, selenium (Se), and L-carnitine (LC) (Teixeira et al., 2021). Gua is a natural plant native to the Amazon rainforest in Brazil and has been cultivated since the pre-Columbian period. The seeds are the most crucial part of the Gua plant; they are used to make Gua powder or extracts, which have gained popularity for their potential health benefits. Epidemiological and experimental evidence showed that Gua has antioxidant, anti-fatigue, anti-inflammatory, genoprotective, and other biological effects (Torres et al., 2022). Besides caffeine, Gua also contains other beneficial compounds like theobromine and theophylline, contributing to its stimulatory effects. Given its high caffeine concentration, Gua is widely used worldwide as a raw material in the energy drink industry (Abalo, 2021).

The Se is a trace mineral that is considered an essential nutrient. Hence, it must be supplemented through the diet as it is not produced by the body. The foods richest in Se are nuts and seeds (especially Brazil nuts, *Bertholetia excelsa*), seafood, meat and poultry, grains, dairy products, and some vegetables. In addition to natural dietary sources, Se supplements are available as Se-enriched yeast or synthetic compounds like Se methionine and chelated Se produced with sodium selenate, hydrolyzed rice, and soy protein. These supplements are commonly used to address Se deficiencies or as a preventive measure in regions with low Se levels in the soil and diet (Rayman, 2020; Pecoraro et al., 2022).

LC is a water-soluble compound obtained mainly from red meat, poultry, fish, dairy products, and some vegetables. LC supplements can be produced in association with other molecules, such as LC tartrate, which is obtained from LC and tartaric acid. LC supplementation has been associated with the attenuation of neuroinflammatory states (Traina, 2016).

A previous study described that Gua exerted cytoprotective and genoprotective effects *in vitro* in ARPE-19 cells exposed to paraquat, which increased cellular superoxide anion levels (Bonadiman et al., 2017). Therefore, we investigated the potential mitigating effects of GSC on ARPE-19 cells exposed to BPA. In addition, we examined the impact of each component (Gua, LC, and Se) on ARPE-19 cells exposed to BPA to determine whether they exhibit similar, synergistic, or antagonistic effects. A previous investigation showed that treating ARPE-19 cells with Se nanoparticles attenuated the cytotoxic effects caused by hypoxia (Özkaya et al., 2021). Another study found that selenomethionine (SeMet) induced antioxidant effects mediated by the cystine/glutamate exchanger SLC7A11 in ARPE-19 cells (Ananth et al., 2020). Additionally, one study reported that LC attenuated epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is an important underlying mechanism of proliferative vitreoretinopathy (PVR) in ARPE-19 cells (Li et al., 2021).

These results indicate that GSC or its constituents could attenuate the cytotoxicity induced by BPA in ARPE-19 cells. This hypothesis was tested by analyzing the protective effects of GSC on cytotoxicity, apoptosis induction, cell-proliferation rate modulation, and oxidative marker and DNA damage levels as assessed by a micronucleus assay.

Material and Methods

Experimental design and treatments

An *in vitro* protocol was employed to identify the lowest concentration of BPA that can trigger changes in the viability, proliferation, and expression of oxidative metabolism markers in ARPE-19 cells. Subsequent experiments used BPA concentrations of 0.001, 0.01, 0.1, 1, 3, and 10 μM , corresponding to 0.000228, 0.00228, 0.028, 0.228, 0.68, and 2.28 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

The beneficial effects of GSC and its components in BPA-exposed ARPE-19 cells were determined. The second protocol evaluated the modulatory effects of GSC and its components in the BPA-induced changes in the rate of apoptosis, cell cycle, genotoxicity, and apoptosis-related gene expression.

The tested multi-supplement was developed by the research group, with the aim of being used as an adjuvant to pharmacological treatment in multiple sclerosis. Its conception was based on the premises suggested by studies that evaluated the effects of isolated food supplements in Multiple Sclerosis (MARX et al., 2020) and by studies that have already created a mixture of phytochemicals and nutraceuticals for use in other clinical conditions and obtained potential benefits (BULKU et al., 2010; RAY et al., 2006). The choice of specific combinations of guarana, selenium and L-carnitine was based on an extensive literature review and pilot tests. The GSC multi-supplement was formulated by the researchers and prepared in the form of capsules, in a compounding pharmacy. For the formulation, the maximum daily intake doses of each GSC component, recommended by Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA), were considered: 500 mg of guaraná dry extract, 320 μg of selenium and 2000 mg of L-carnitine. Based on these values and considering a 70 kg adult as a reference (mg GSC/kg), concentrations equivalent to doses 1 to 50 times higher than the maximum recommended doses were calculated. Please note that the multi-supplement is not commercially available.

GSC concentration that exhibited antioxidant and anti-inflammatory effects, as previously described by Teixeira et al. (2021), was considered as a reference. A complementary

study performed by Teixeira et al. (2023) in patients with multiple sclerosis supplemented with GSC for 12 week showed that GSC did not induce any type of adverse effect indicative of toxicity. Rodents treated with the components of GSC showed that Gua had low toxicity (oral lethal dose to kill 50%, $LD_{50} = 825 \text{ g/Kg}$) (Antonelli-Ushirobira et al., 2010). In contrast, sodium selenite had an $LD_{50} = 8.08\text{--}12.11 \text{ mg/Kg}$ and LC (Jacevic et al., 2021). On the other hand, LC is regarded as safe as studies in rodents have confirmed no acute toxicity.

Therefore, in this study, we tested a GSC formulation containing 1.07 mg/mL Gua, 0.178 $\mu\text{g/mL}$ Se, and 1.43 mg/mL LC. A pilot experiment evaluating the potential cytotoxicity of GSC on ARPE-19 cells using half and twice the concentration of GSC used here showed no cytotoxic effect. The cells' exposure time to BPA and its components varied according to the protocols employed, with all *in vitro* assays conducted with at least three replicates.

Since commercially acquired cell lines were used, ethics approval was not required.

Chemicals, reagents, and solutions

Analytical grade chemicals and reagents, which were mainly obtained from Sigma-Aldrich[®], Inc. (St. Louis, MO, USA), were used in this study. Cell culture plasticware and reagents were purchased from Gibco Life Technologies[®], Inc. (Grand Island, New York, USA) and Invitrogen Life Technologies[®] (São Paulo, Brazil). A BPA stock solution (1000–10000 \times) in dimethyl sulfoxide (DMSO) was prepared before 24 h of use to avoid chemical degradation of the substance. The stock solution was stored at $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

Working solutions were prepared by diluting the BPA stock solutions with the culture medium. The final DMSO concentration was 0.1%, owing to the limited solubility of BPA. GSC, Gua powder extract, Se, and LC tartrate were purchased from SM Pharmaceutical Enterprises Ltd. (São Paulo, SP, Brazil) and prepared as described by Teixeira et al. (2021;2022). The Gua supplement was manufactured as a powder dried by seed spraying with

7.79% caffeine and 1.02% tannins. Commercial grade GSC and its components were formulated by a manipulation pharmacy (Nova Derme, Santa Maria, RS, Brazil) with raw material authorized by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) of the Ministry of Health of Brazil as safe for human consumption.

All GSC constituents did not contain heavy metals (lead, copper, antimony) or microorganisms. At the research team's request, a manipulation pharmacy prepared the multi-supplement and encapsulated it. The capsules were then sent to the laboratory, opened under aseptic conditions, and dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) before the experiments.

The multi-supplement preparations were diluted in the cell culture medium Dulbecco's Modified Eagle Medium/Hams Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12). The qRT-PCR reagents were obtained from Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA). The primers were synthesized by Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and a cDNA synthesis kit was obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA-USA). The flow cytometry results were analyzed using FlowJo vX.0.7 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR USA). The samples were stored at -80 °C and analyzed within 20 days of treatment and collection.

Protocols were performed with at least five replicates in 96-well plates and in independent triplicates. As it is impossible to obtain a sample of cells to perform all laboratory analyses simultaneously, the protocols of exposure to BPA, GSC, and its components were repeated in different contexts.

Cell culture conditions

The immortalized cell line ARPE-19 (ATCC[®] CRL-2502) was acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, <https://bcrlj.org.br/>). This nonprofit, nongovernmental organization acquired ARPE-19 cells from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA,

USA). ARPE-19 cells were cultured under standardized conditions at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in DMEM/F-12 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (1% penicillin/streptomycin), and 1% amphotericin B (antifungal). Finally, the cells were cultured in bottles and subcultured for a maximum confluence of 80%.

Cell viability assays

Cellular viability was assessed after 24 h of incubation using spectrophotometric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assays. The MTT assay is a widely used colorimetric assay that measures cell viability and proliferation based on the conversion of the yellow, water-soluble MTT dye into a purple formazan product by metabolically active cells. Mitochondrial dehydrogenases in viable cells reduced MTT into formazan crystals, which are insoluble in water and accumulate inside the cells. The quantification of cell viability using the MTT assay was performed as described by Teixeira et al. (2021). The ATP bioluminescence assay was performed using the firefly luciferin-luciferase system. The resulting luminescence intensity indicates the number of cells with ruptured membranes or increased permeability, which occurs in dead or dying cells. An ATP Assay Kit (Sigma-Aldrich®) was used to perform the assay according to the manufacturer's instructions. A cell density of 1×10^5 cells/mL was used in the cell viability experiments.

Oxidative marker assays

The levels of the following four oxidative markers were spectrophotometrically analyzed: nitric oxide (NO), superoxide anion (SA), lipoperoxidation (LPX), and protein carbonylation (PCarb). A cell density of 1×10^6 cells/mL was used in the experiments. NO levels were indirectly estimated by quantifying nitrate levels using the Griess reagent (Noh et al., 2015).

SA was quantified by analyzing the formazan concentration triggered by the nitroblue tetrazolium (NBT) reaction (Morabito et al., 2010). LPX was measured by quantifying its products, mainly thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), of which malondialdehyde was the primary product (Jentzsch et al., 1996). PCarb was measured by determining the presence of carbonyl groups according to their reaction with dinitrophenylhydrazine, indicating protein oxidation and oxidative stress (Levine et al., 1994). All spectrophotometric analyses were performed within 30 days of performing the experimental protocols.

Effects of BPA exposure on cell proliferation

The proliferation of ARPE-19 cells exposed to different BPA concentrations was evaluated daily for 7 days using a clonogenic assay described previously (Cubillos-Rojas et al., 2014) with some modifications. A total of 1×10^3 cells/well were seeded in triplicate in 6-well plates. Each day, the cells were fixed and stained with crystal violet, and the monolayer filling pattern and morphology of ARPE-19 cells were analyzed using ImageJ software. The effect of BPA on ARPE-19 cell proliferation in 72h cultures was measured using the MTT assay, using the same protocol described previously.

Flow cytometry analysis of apoptosis and the cell cycle

The effects of GSC and its components on the apoptosis rate and cell cycle progression of ARPE-19 cells exposed to BPA were assessed using flow cytometry. The quantification of apoptotic events in ARPE-19 cells was performed using BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^6 cells were seeded per well in 6-well plates containing 2 mL of the different treatment solutions in DMEM/F12 and incubated for 24h. The cells were then trypsinized and resuspended in $1 \times$ binding buffer at a concentration of 1×10^6 cells/mL; 100 μ L of the cell suspension was

transferred to a new tube. The resuspended cells were gently vortexed, stained with 5 μ L of Annexin-V-FITC and 5 μ L of PI, and incubated at room temperature (\pm 24 $^{\circ}$ C) in dark for 15 min. Fluorescence readings were captured after adding 400 μ L of 1 \times binding buffer to the samples.

To quantify the proportion of cells in each stage of the cell cycle, the cells were centrifuged and washed with PBS, pH 7.4. The cells were then suspended in 500 μ L of a solution containing PI dissolved in PBS (50 μ g/mL PI from 50 mg/mL stock solution), 2.5 mg/mL, 0.1 mg/mL RNase A, and 0.05% Triton X-100, and incubated for 40 min at 37 $^{\circ}$ C. Afterward, the cells were washed with 3 mL of PBS, suspended in 500 μ L PBS, and flow cytometry analysis was performed. The cells were sorted based on their forward scatter/side scatter (FSC/SSC) patterns captured using a BD FACSVerseTM system. Data acquisition and cell content analyses were performed using FlowJo vX.0.7 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

Micronucleus (MN) assay

DNA damage was quantified using a protocol described by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, No. 487, 2016) with slight modifications (OECD, 2016). The main modification was performed to avoid monolayer breakage or cell release before analysis. Cell rupture releases many nuclei from the cytoplasm, making analysis difficult. A previous cell proliferation analysis revealed that the cells had a high proliferative rate over 72 h, a mandatory condition for MN analysis. A lower initial cell concentration was used to avoid overlap. Therefore, ARPE-19 cells were transferred to 24-well plates (1 \times 10² cells/well) and treated with BPA for 72 h.

After 72 h, the spent culture medium was removed and the cells were washed with PBS. DAPI (5 mg/mL diluted in deionized water) was then added to each well. A panoptic staining kit was used according to the manufacturer's instructions to evaluate nuclear and cellular

morphologies. Microscopy analysis was performed at 200× magnification using a fluorescence or light microscope, and alterations in 1000 cells per treatment were scored using the established criteria for MN evaluation (Thomas et al.,2009). Digimizer Image Analysis Software (Ostend-Belgium) was used to investigate the presence of MNs and other alterations.

Gene expression analysis using qRT-PCR

Additionally, we determined the expression levels of genes associated with apoptosis triggered by BPA upon interaction with GSC and its components. Cells could undergo the following two apoptotic mechanisms: the intrinsic and extrinsic pathways. Gene expression analysis was performed as previously described by Barbisan et al. (2019). The initial cell concentration used in this experiment was 1×10^6 cells/mL. For RNA extraction, TRIzol reagent was used according to the manufacturer's instructions. Prior to the analysis, the extracted RNA was quantified using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 spectrophotometer at a wavelength of 532 nm. Reverse transcription was performed by adding RNA samples (1 µg/mL) to 0.2 µL of DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 5 min, and then heating the sample at 65 °C for 10 min. cDNA was generated using 1 µL of reverse transcriptase and 4 µL of Master Mix. The following cycling conditions were employed: 25 °C for 5 min, 42 °C for 30 min, and 85 °C for 5 min, followed by incubation at 5 °C for 60 min. qRT-PCR was performed using a 20 µL reaction volume comprising 1 µL of cDNA and 19 µL of GoTaq qPCR Master Mix. The following cycling conditions were employed for qRT-PCR: 95 °C for 3 min, 40 cycles of 95 °C for 5 s, and 60 °C for 30 s, followed by a melting curve analysis at 0.1 °C/min from 40 to 90 °C. β-actin was used as the housekeeping gene. Relative expression was calculated using the comparative Ct method and expressed as the fold change relative to the control. The primer characteristics are listed in Table 1.

Table 1. Gene primers

Gene	Genbank	Primers	
		Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
β-Actin	Gene ID: 60	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA
Bax	Gene ID: 596	CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA	CCCGGAGGAAGTCCAATGT
Bcl-2	Gene ID: 581	GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT
Casp3	Gene ID: 836	TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG	TACCAGTGCGTATGGAGAAATGG
Casp8	Gene ID: 841	AAGGAGCTGCTCTTCCGAATT	CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT

Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism software (version 6.0, 2015) and are presented as a percentage of the control based on data obtained from at least three replicates. Quantitative variables were compared using a one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test or a two-way analysis of variance followed by Bonferroni's *post hoc* test. The chi-square test was used to compare the frequency of MN between treatments, and the data are presented as the relative frequency of MN for every 1000 nuclei analyzed. This statistical procedure followed the OECD report n°. 487 (2016). A *p*-value less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Initially, the acute cytotoxic effect of BPA on 24-h ARPE-19 cell cultures was evaluated after exposure to low BPA concentrations (0.001, 0.01, and 0.1 μM). In both assays, no differences in cell viability were observed compared to the control. However, the results of the two tests were inconsistent at the three highest concentrations of BPA tested (1, 3, and 10 μM).

The MTT assay (Fig. 1A) indicated a significant increase in cell viability for cultures exposed to 1 and 3 μM of BPA compared to controls. Cells exposed to 10 μM of BPA showed similar viability to unexposed cells. However, results from the ATP assay (Fig. 1B) indicated similar viability in ARPE-19 cells exposed to BPA at concentrations up to 3 μM , with a significant decrease in viability observed only after exposure to 10 μM of BPA. However, it is important to highlight that the decrease in cell viability observed in these experiments was less than 10%. Since both protocols assess cell viability by analyzing cellular metabolic activity, the combined results indicated that BPA did not induce considerable cytotoxicity in ARPE-19 cells.

However, depending on the concentration, BPA differentially modulated the levels of oxidative markers. In BPA-exposed cells, NO levels remained significantly higher than those in control cells after 6, 24, and 72h of culture (Fig. 1C). Conversely, exposure to BPA at all tested concentrations significantly decreased the SA levels (Fig. 1D). All concentrations of BPA resulted in higher levels of LPX than those in the controls (Fig. 1E). At 24 hours, ARPE-19 cells had higher PCarb levels than the controls (Fig. 1F).

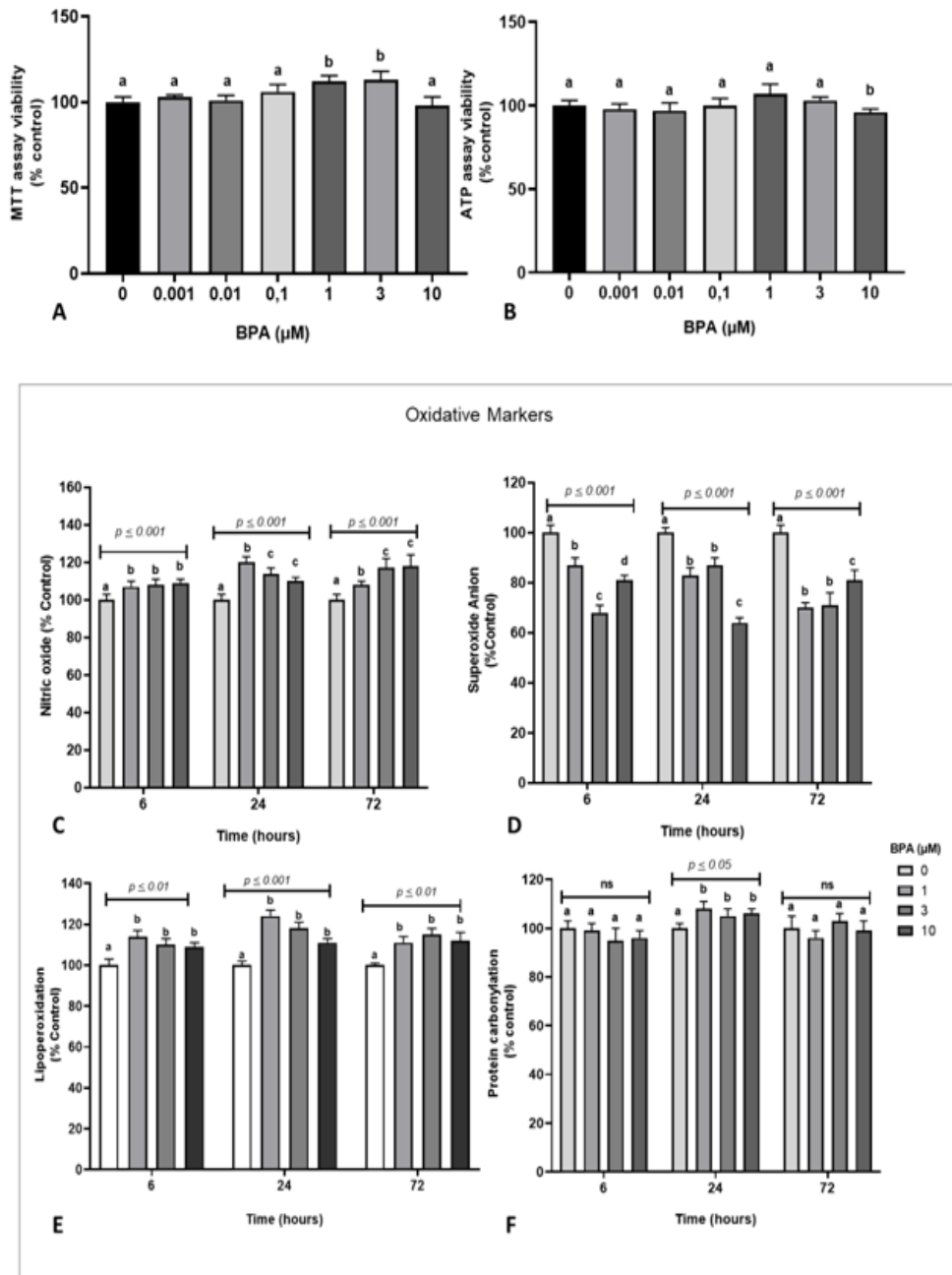


Figure 1. Impact of BPA on ARPE-19 cell viability as determined using the MTT (A) and ATP (B) assays. (C–F) Modulation of oxidative markers in ARPE-19 cells exposed to BPA at different concentrations. Oxidative marker levels were quantified using spectrophotometric assays. A two-way analysis of variance followed by the Bonferroni *post hoc* test was performed. Different letters represent statistically significant differences between treatments at $p < 0.05$.

We then evaluated whether BPA induced changes in the proliferation of ARPE-19 cells. Up to day 3, the proliferation rate was similar between the cells with and without BPA exposure (Fig. 2A, 2B). After this period, all BPA concentrations decreased cell proliferation compared to the control. The highest concentration of BPA (10 μ M) affected the lowest growth rate based on the confluence (%) of the 7d cultures divided by the confluence of the 24h cultures (Fig. 2C).

The potential genotoxic effect of BPA was evaluated through a qualitative and quantitative analysis of MN. The main alterations in the DNA and morphology of ARPE-19 cells caused by exposure to different concentrations of BPA (Fig. 3) were MN, dark condensations potentially due to fragments of genetic materials, rough nuclear edges, and large and irregular nuclei potentially from non-disjunction during cell division. The amount of MN per 1000 nuclei was four times greater in ARPE-19 cells exposed to 3 and 10 μ M of BPA than that in the controls and cells exposed to 1 μ M of BPA (Fig. 2D).

Collectively, these results indicated that a BPA concentration of 3 μ M could induce oxidative and genotoxic alterations on ARPE-19 cells, although it did not show considerable cytotoxicity and alterations in cell proliferation. Therefore, this concentration was used to determine the extent of attenuation of the negative effects of BPA on ARPE-19 cells by GSC and its components.

First, we postulated that oxidative alterations and increased MN frequency in the 72h cultures decrease cell proliferation via apoptosis. We found that treatment with 3 μ M BPA significantly increased the proportion of apoptotic cells compared to that in the control (Fig. 4A–4C). Exposure to GSC significantly decreased the frequency of apoptosis compared to control cultures (Fig. 4D–4F). Although the three components of GSC significantly decreased the apoptosis frequency in combination with BPA (Fig. 4D–4E), cells exposed to Se only had a higher apoptosis rate than control cells (Fig. 4J–4M).

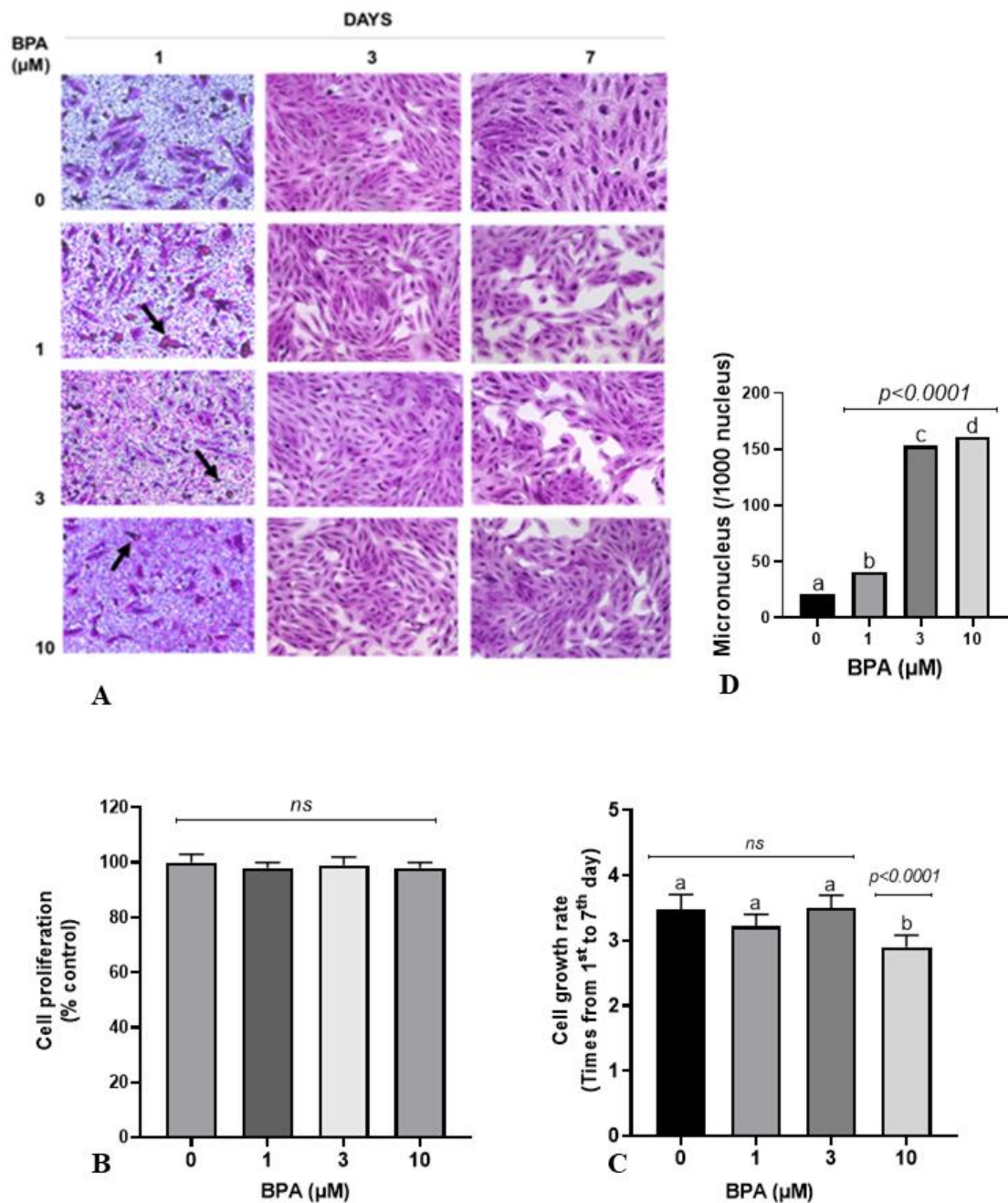


Figure 2. Effect of bisphenol A (BPA) on the proliferation and micronucleus (MN) frequencies in ARPE-19 cells. (A) Microscopy images of the cell cultures (200× magnification) exposed to different concentrations of BPA after 1, 3, and 7 days. Arrows indicate the deposition of residues or dead cells in cultures. (B) Cell proliferation rate of the 72h cultures as determined using the MTT assay. (C) Cell growth rate based on the clonogenic assay and cell doubling rate after 7 d compared to that on the first day of culture. (D) Number of micronuclei (per 1,000 nuclei) was quantified in 72h ARPE-19 cell cultures stained with DAPI. Statistical comparisons of the MTT and clonogenic assay data were performed using a one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test. MN frequency was statistically evaluated using the chi-

square test. Different letters represent statistically significant differences between treatments $p < 0.05$.

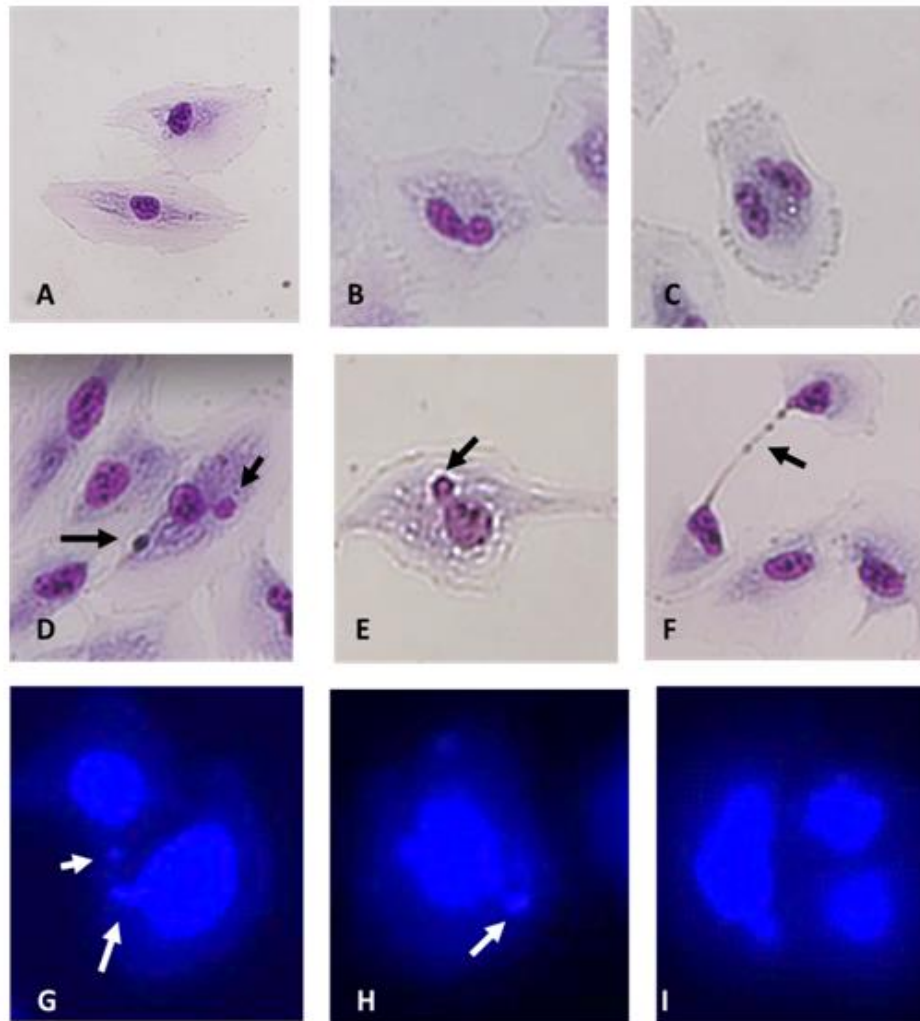


Figure 3. Representative microphotographs of ARPE-19 cells stained with Panopticon, in which nuclear and genetic materials are denoted by a purple color (200× magnification). (A) ARPE-19 cells with eccentric nuclei and poorly stained cytoplasm. (B, C) Binucleated cells undergoing mitotic division. (D) Cells with micronuclei (MN) and dark condensations may be fragments of genetic material (arrow). (E) Cells with visible MN (arrow). (F) Two cells with nuclear bridges (arrow). (G) Nuclei stained with DAPI showing the nuclear button (arrow) and MN (arrow). (H) Cells with MN and rough nuclear edges. (I) Cells with a large and irregular nucleus potentially originating from non-disjunction associated with a binucleated cell in cell division, which also presents nuclei with irregular edges.

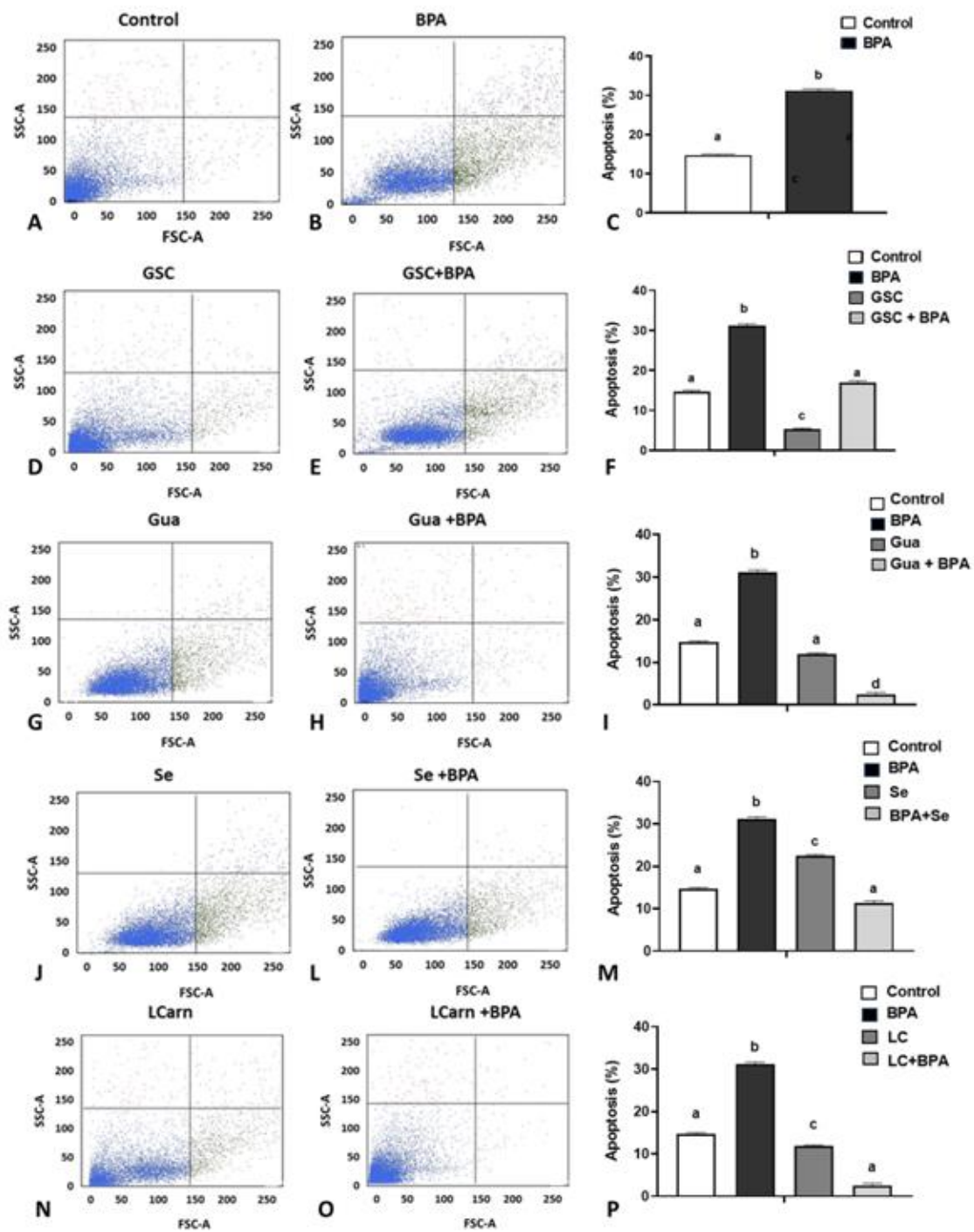


Figure 4. Effect of 3 μM bisphenol A (BPA), GSC, or its individual components (Gua = guarana, Se = selenium, LC = L-carnitine) on the apoptosis rate of ARPE-19 cells cultured for 72h. Cells were stained using an Annexin-V/Propidium Iodide kit and apoptosis was evaluated by flow cytometry. Annexin-V was used to label dead and apoptotic cells. Two representations of flow cytometry and a comparative graph are presented for each treatment: (A–C) controls and BPA, (D–F) GSC and GSC+BPA, (G–I) Gua and Gua+BPA, (J–M) Se and Se+BPA, and (N–P) LC and LC+BPA. As the statistical analysis was bivariate (two-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test), the data for each type of treatment are presented separately to facilitate the interpretation of the interaction effect between BPA and GSC or its individual

components. Different letters represent statistically significant differences between treatments at $p < 0.05$.

Next, we investigated whether the decrease in the proliferation rate of ARPE-19 cells after exposure to 3 μM BPA involved changes in the cell cycle (Fig. 5). All treatments significantly decreased the frequency (%) of S+G2 cells compared to that in the control. However, cells exposed to GSC and GSC+BPA showed a higher frequency than the other treatments, followed by cells exposed to SE+BPA, LC, and LC+BPA. The cells exposed to BPA, Gua, Gua+BPA, and Se showed the lowest frequency of cells in the S+G2 phase.

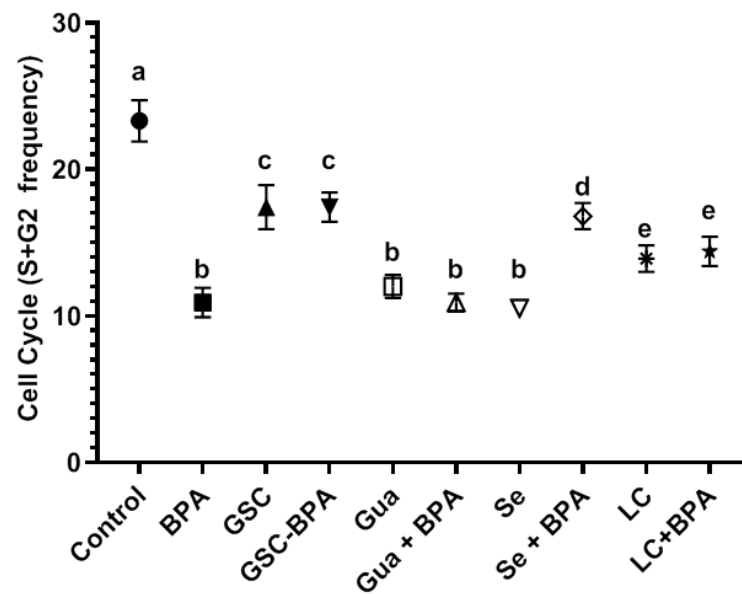


Figure 5. Effect of treatment with the GSC multi-supplement and its individual components (Gua = guarana, Se = selenium, LC = L-carnitine) with or without bisphenol A (BPA) on the frequency (%) of ARPE-19 cells in the S+G2 phase of the cell cycle at 72h. Statistical comparison was performed using two-way ANOVA followed by a *post hoc* Bonferroni test. Different letters represent statistically significant differences between treatments at $p < 0.05$.

The effects of GSC and its individual components on the modulation of oxidative markers and MN frequency, with or without BPA exposure, were analyzed. The data are summarized in Table 2. NO levels were significantly increased in cells exposed to Se+Gua and Se than in the control and other treatments. Exposure to Gua+BPA also significantly increased NO levels compared to those in the control. All other treatments had decreased NO levels compared to the control.

Table 2. Interaction effect of BPA, the GSC multi-supplement, or its individual components on the oxidative stress markers and micronucleus (MN) frequency of ARPE-19 cells at 72 h.

	Oxidative markers (% of control) and MN (%)				
	Media \pm SD				
	NO	SA	LPX	PCarb	MN
Control	100.0 \pm 2 ^a	100.0 \pm 1.9 ^a	100.0 \pm 3.1 ^a	100.0 \pm 3.9 ^a	1.7 \pm 0.5 ^a
BPA	111.2 \pm 3.5 ^b	108.2 \pm 1.6 ^b	118.4 \pm 3.6 ^b	103.6 \pm 1.5 ^a	5.2 \pm 0.9 ^b
GSC	96.1 \pm 2.9 ^b	91.4 \pm 2.7 ^b	96.4 \pm 2.9 ^a	94.9 \pm 3.9 ^b	2.1 \pm 0.3 ^a
GSC+BPA	97.5 \pm 1.2 ^a	85.5 \pm 3.3 ^b	99.7 \pm 1.5 ^a	91.3 \pm 1.2 ^b	2.4 \pm 0.6 ^a
Gua	91 \pm 4.1 ^c	98.2 \pm 7.5 ^a	91.2 \pm 4.1 ^b	105.6 \pm 3.4 ^a	1.2 \pm 0.3 ^a
Gua+BPA	145.2 \pm 4.7 ^d	89.9 \pm 2.5 ^b	145.2 \pm 3.6 ^d	90.9 \pm 1.0 ^b	2.4 \pm 0.2 ^a
Se	303.2 \pm 3.7 ^e	138.2 \pm 2.5 ^c	323.6 \pm 5.3 ^e	116.7 \pm 3.27 ^c	5.1 \pm 0.5 ^b
Se+BPA	304 \pm 4.5 ^e	134.5 \pm 3.6 ^c	297.1 \pm 4.6 ^f	93.5 \pm 2.67 ^a	8.5 \pm 0.9 ^c
LC	94.3 \pm 3.6 ^c	88.2 \pm 2.8 ^b	94.9 \pm 2.0 ^b	92.7 \pm 2.0 ^a	2.2 \pm 0.7 ^a
LC+BPA	94.7 \pm 8.1 ^c	95.9 \pm 3.6 ^b	92.2 \pm 8.1 ^b	92.7 \pm 1.8 ^a	1.4 \pm 0.4 ^a

BPA = Bisphenol A, Gua = guarana (1.07 mg/mL), Se = selenium (0.178 μ g/mL), LC = L-carnitine (1.43 mg/mL), NO = nitric oxide, SA = superoxide anion, LPX = lipoperoxidation, PCar = protein carbonylation. MN = micronucleus frequency determined based on at least 10

replicates. A total of 1000 scores were analyzed for each treatment. Each marker was compared between treatments using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* Bonferroni test. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated by different letters for each of the investigated markers.

Exposure to Se and Se+BPA significantly increased SA levels than the control and other treatments, similar to cells exposed to BPA only. All other treatments had decreased AS levels compared to the untreated controls. Considering LPX levels, some treatments showed an oxidative effect since they increased the levels of these molecules (Se, Se+Gua > Gua+BPA > BPA). However, exposure to GSC and its individual components showed an antioxidant effect by decreasing LPX levels. PCarb levels in cells exposed to BPA, Gua, Se+BPA, LC, and LC+BPA were similar to the control. While exposure to Se increased PCarb levels (indicating an oxidative effect), exposure to GSC, GSC+BPA, and Gua+BPA presented an antioxidant effect through a decrease in the levels of this marker. A genotoxic effect via increased MN frequency was observed in cultures exposed to Se+BPA, Se, and BPA. The other treatments showed an MN frequency similar to the control.

The effects of the GSC multi-supplement and its individual components on the expression of four genes related to apoptosis were evaluated (Fig. 6A). To facilitate the interpretation of the results, the following three possibilities were considered: gene expression similar to the control (1 ± 0.2), upregulation (> 1.2), and downregulation (< 0.8). As apoptosis can be induced by two pathways (intrinsic regulation by the mitochondria and extrinsic regulation by death receptors), we also analyzed the Bcl-2/BAX expression ratio (Fig. 6B).

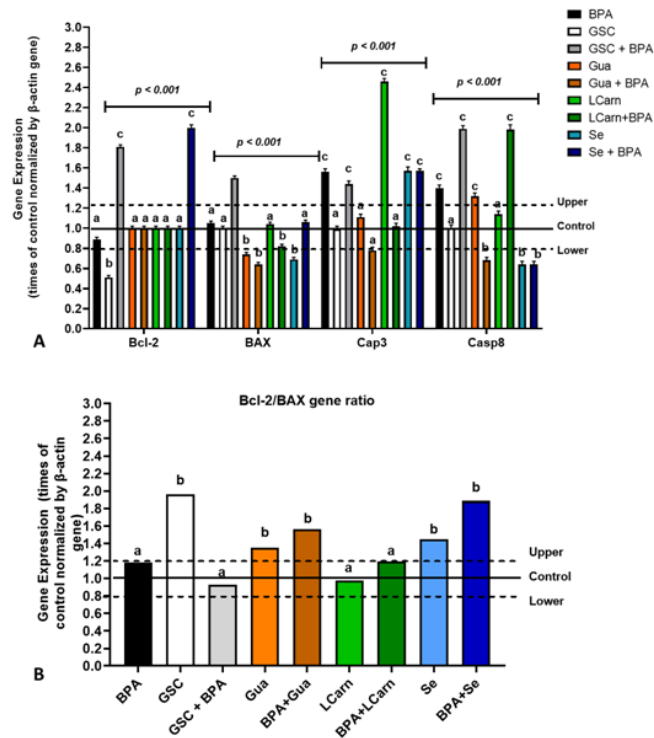


Figure 6. Differential expression of apoptotic genes (Bcl-2, BAX, Casp3, and Casp8) in ARPE-19 cells exposed to BPA, the GSC multi-supplement, and its individual components (Gua = guarana, Se = selenium, LC = L-carnitine). (A) Comparison of gene expression levels of Bcl-2, BAX, Casp3, and Casp8. Values over 1.2 indicate upregulation and those below 0.8 indicate downregulation relative to the control. The solid line represents the value of 1 in control cells, whereas the dotted lines above and below represent the upper and lower limits of gene expression variation. Treatments with values between the two dotted lines were considered to have similar gene expression to the control. (B) Bcl-2/BAX ratio gene expression among ARPE-19 cells exposed to BPA (3 μ M) with or without GSC supplementation or its individual components (LC, Gua, and Se). Differences in gene expression were analyzed using two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test. Different letters indicate significant differences. Gene expression values were normalized to that of β -actin. Values are expressed in relation to the control, which had a reference value of 1.

A decreased Bcl-2/BAX expression ratio, indicated higher BAX gene expression, suggesting the induction of apoptosis via the intrinsic pathway. Overall, BPA did not alter the Bcl-2/BAX ratio but induced the overexpression of the Casp3 and Casp8 genes, suggesting that apoptosis was induced mainly via the extrinsic pathway. GSC treatment increased the Bcl-2/BAX ratio, exhibiting gene expression-like control of Casp3 and Casp8 genes, indicating no modulation of the apoptotic pathways. However, GSC did not modify the effect of BPA on ARPE-19 cells as the Casp3 and Casp8 genes were significantly overexpressed.

Regarding the effects of the individual GSC components, Gua increased the Bcl-2/BAX ratio and slightly increased Casp8 gene expression. In contrast, Gua reversed the BPA-induced overexpression of Casp3 and Casp8. This observation was corroborated by an increased Bcl-2/BAX ratio in the cells exposed to Gua+BPA. Cells exposed only to LC overexpressed Casp8, whereas cells concomitantly exposed to LC+BPA overexpressed Casp3. Exposure to Se with or without BPA induced the overexpression of Casp3, although an increased Bcl-2/BAX ratio was also observed.

Discussion

Adult cross-sectional epidemiological and pre-clinical *in vitro* and *in vivo* studies suggest that BPA, an endocrine-disrupting pollutant, induces oxidative stress and that persistent exposure may cause serious health problems (Santoro et al., 2019). A prior study conducted by Chiang et al. (2022) suggested that, in addition to its negative effects on reproductive cells and tissues, BPA can impact other tissues, including the human retinal pigment epithelium using ARPE-19 cells as *in vitro* experimental model. Their results showed that BPA exposure induced ROS generation and cytotoxicity on ARPE-19 cells, which was reduced when the antioxidant molecule - N-acetyl-L-cysteine - was added to the culture medium.

Indeed, considering the importance of ocular function for autonomy and quality of life, especially in elderly population, assessment of whether dietary components, with antioxidant properties, could attenuate the negative effects induced by BPA on ARPE cells is highly relevant. Based on previous evidence from *in vitro*, *in vivo*, and human studies that GSC presents antioxidant and anti-inflammatory effects (Teixeira et al., 2021; 2022), we postulated that it could also attenuate the negative effects of BPA on ARPE-19 cells. To test this hypothesis, we exposed ARPE-19 cells to BPA with or without the addition of GSC or its individual components. BPA exposure triggered alterations in some oxidative markers, but these effects were mitigated by the exposure to GSC (particularly Gua and LC). However, exposure to Se or Se+BPA exacerbated the oxidative stress induced by BPA. These findings suggest that the relationships between BPA and the antioxidant components of GSC, Gua, Se, and LC are not universally applicable to ARPE-19 cells.

Initially, it is essential to emphasize the need for selecting a representative concentration of BPA to induce oxidative stress and genotoxicity in ARPE-19 cells. This is because *in vitro* protocols may elicit variations in cytotoxic response depending on the culture conditions, even when laboratories follow the guidelines outlined in the Guidance Document on Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) published by the OECD (2016) (Eskes et al., 2017). Furthermore, there are no previous studies involving genotoxicity analysis through the MN assay in ARPE-19 cells.

The MN assay is a widely used genotoxicity test in toxicology and regulatory sciences to evaluate the potential of chemical substances to induce DNA damage and chromosomal abnormalities. This assay is based on detecting micronuclei, small fragments of chromosomes that are not incorporated into the nucleus during cell division. MN can arise from a variety of DNA-damaging events, such as chromosomal breakage, mitotic spindle disruption, or aneuploidy. Due to its relevance in detecting genotoxic states, the OECD has developed

guidelines and recommendations for this assay, providing standardized procedures and best practices for its implementation. The OECD Test Guideline 487 (TG 487) specifically addresses *in vitro* MN tests. The relevance of the MN assay lies in its ability to assess the potential genotoxicity of various substances, including chemicals used in pharmaceuticals, cosmetics, pesticides, and industrial products. This assay is crucial in the safety assessment of these substances to protect human health and the environment. By evaluating the occurrence of MN in cells exposed to a test substance, researchers can identify compounds that may cause genetic damage and chromosomal aberrations, which could lead to adverse health effects, including cancer and birth defects. Therefore, the OECD guidelines ensure that the MN assay is conducted using standardized protocols, enhancing the reliability, reproducibility, and comparability of results across different laboratories and studies (OECD, 2016).

For this reason, we paid special attention in selecting the concentration of BPA to evaluate the antioxidant effects of GSC and its individual components. Our goal was to ensure that the concentration was not too low to prevent oxidative changes or too high to cause acute cytotoxicity, leading to the death of ARPE-19 cells within 24h. By carefully choosing an appropriate concentration range, we balanced the induction of oxidative stress and maintenance of cell viability for an adequate experimental duration. This approach allowed us to effectively assess the potential protective effects of GSC and its individual components against the oxidative impact of BPA on ARPE-19 cells.

The results from two viability assays did not demonstrate acute cytotoxicity (24h cultures) in ARPE-19 cells exposed to BPA in the 0.001 to 3 μ M concentration range. However, the findings from cells exposed to 10 μ M of BPA were contradictory. Although the MTT assay showed no significant decrease in ARPE-19 cell viability, the ATP assay revealed a significant reduction in viability compared to the controls.

Although the MTT assay is widely used for cytotoxicity testing in *in vitro* models, it has some limitations due to potential interference from certain molecules, such as polyphenols (Bruggisser et al., 2022). In our study, in addition to the maximum concentration of BPA (10 μ M) that did not reduce cell viability, concentrations of 1 and 3 μ M showed a significant increase in viable cells compared to that in the control, albeit small (<10%). These results differed from those published by Chiang et al. (2022), who observed a cytotoxic effect when ARPE-19 cells were exposed to 10 μ M BPA. As this was the lowest concentration tested by the authors, and we found this inconsistency regarding BPA cytotoxicity, we cannot confirm whether BPA might have affected the MTT assay results. As a result, we excluded this concentration from the protocols used to test the antioxidant and genoprotective effects of GSC and its components. This ensured that any observed effects were not compromised by confounding factors related to the MTT assay, maintaining the integrity and reliability of our experimental approach.

This decision was reinforced by analyzing the effect of the three highest concentrations of BPA (1, 3, and 10 μ M) on the levels of four oxidative markers. We observed an increase in NO and LPX levels compared to those in the controls in the 24, 48, and 72h cultures. PCarb levels were also higher in 48-h cultures treated with BPA only, suggesting a transient oxidative effect on cellular proteins. This was possibly regulated by the endogenous antioxidant components of ARPE-19 cells.

One intriguing result that requires further discussion is the decrease in SA levels in cells exposed to BPA compared to the control. In the study by Chiang et al. (2022), they observed a reduction in the concentrations of the enzymes - superoxide dismutase (SOD) and catalase - in ARPE-19 cells exposed to BPA. They also noted an increase in lipid peroxidation (MDA) levels in the cells; however, they did not quantify the levels of NO. The SA has a high affinity for NO, and the reaction of these two molecules generates a reactive nitrogen species (peroxynitrite)

that leads to extensive lipid peroxidation of membranes. Since the levels of superoxide were significantly reduced in ARPE-19 cells exposed to BPA, it is possible that BPA induces a substantial increase in the concentration of NO, with a large portion of it reacting with the SA, consequently elevating lipid peroxidation levels. This condition could potentially explain why Chiang et al (2022) observed a decrease in the expression of SOD. The interplay between the SA and NO may be a crucial factor contributing to the observed alterations in oxidative stress markers and antioxidant enzyme levels in response to BPA exposure. Further investigation into the relationship between these reactive species is warranted to fully comprehend the mechanisms underlying BPA-induced oxidative stress in ARPE-19 cells.

This assumption is supported by previous studies. One study described an increase in the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO levels in the testicles of mice exposed to BPA (Chouhan et al., 2015). The authors suggested that the modulatory effect of BPA on NO metabolism could contribute to a decline in male steroidogenesis. Other investigations also described an increase in iNOS and/or NO levels in chicken embryo kidney (CEK) cells (Chen et al., 2022) and in the human hepatoma Hep3B cell line (Nakamura et al., 2018). A study by Wang et al. (2019) described that BPA induced neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells due to increased iNOS and nNOS enzymatic activity. Another *in vitro* investigation revealed that BPA induced cytotoxic NO and caspase-8 levels in SHSY-5Y neuron-like cells (Ayazgök and Tüylü Küçükkılınc, 2018). The results of these studies confirm the possibility of BPA inducing elevated NO levels, leading to potential interactions with SA and subsequent alterations in the levels of oxidative stress markers and enzymes.

Although the rate of cell proliferation was not impacted by exposure to BPA, the DNA quality of cells decreased, as shown in the results of the MN assay. We were unable to identify previous studies involving MN analysis in ARPE-19 cells, indicating that this approach in this

type of *in vitro* model is novel and can serve as a reference for future studies that evaluate the genotoxicity of substances against retinal epithelial cells. Our results showed that the MN frequency in cells exposed to BPA at a concentration of 3 μM was approximately four times greater than that of cells exposed to a concentration of 1 μM . Along with the results of the other analyses on cell viability and oxidative marker levels, the best concentration of BPA to test the cytoprotective effect of GSC and its components is 3 μM .

Our results confirmed that BPA can increase the rate of apoptosis and decrease cell proliferation in 72h cultures of ARPE-19 cells. However, apoptosis rates were reversed in ARPE-19 cells exposed to GSC and its individual components, indicating a cytoprotective effect; in contrast, Se-exposed cells showed a higher apoptosis rate than the controls. Se is an essential trace mineral that plays a crucial role in various biological processes. However, Se supplementation has both risks and benefits, depending on the intake levels. While Se is beneficial in small amounts, excessive intake can lead to toxicity (selenosis). In humans, the recommended daily intake of Se varies depending on age, sex, and life stage. For most adults, the recommended daily intake is approximately 55–70 $\mu\text{g}/\text{day}$.

Se is usually attainable through a balanced diet that includes Se-rich foods, such as fish, shellfish, nuts, seeds, and whole grains (Gore et al., 2010). Although we tested a Se concentration lower than the recommended dose (40 μM) in this study, it is possible that this concentration is toxic to ARPE-19 cells, considering that there is no clearance mechanism in cell cultures and exposure to Se at this concentration was continuous.

Another possible explanation for these results lies in the chemical formulation of Se used in this study. Supplements are found in different formulations to facilitate their absorption by the body. Some of the more common types of Se formulations used in supplements include selenomethionines, selenide and selenate, selenium yeast, and other special formulations. In Brazil, the most common commercial form of Se is 0.5% chelated selenium bis-glycinate,

which was used in the present study. ARPE-19 cells are probably more sensitive to this chemical compound of Se than selenomethionine, which is also widely used. Complementary studies in ARPE-19 cells comparing different Se formulations in different concentrations could be conducted to clarify this.

Similar results on the pro-apoptotic effect of BPA have already been described in the literature, including that in immortalized mouse myoblast C2C12 cells by Liu et al. (2021). They described that the pro-apoptotic effect of BPA was attenuated by supplementation with coenzyme Q10 (CoQ10), a powerful antioxidant, which can improve the integrity of the lysosomal membrane, lysosomal degradation function, and promote autophagy. Despite the anti-apoptotic effect of GSC and its individual components observed in this study, MN assay confirmed the anti-apoptotic effect of GSC and its individual components and how the oxidative state and frequency of DNA damage are affected by GSC in this context. In fact, the genotoxic effect of BPA might be organ and cell type-dependent, similar to that for human blood cells (Ruberto et al., 2022; Santovito et al., 2018) and some cell lines, such as human hepatoma (HepG2) cells (Kober et al., 2016; Yu and Liu, 2023), where the frequency of MN and other types of genomic damage increased in the presence of BPA.

Analyzing the effect of each individual component of GSC revealed some surprising results. First, GSC did not show additive or synergistic effects with those of its individual components. Second, a cyto-genotoxic effect was triggered by exposure to Se, which was not observed with the GSC multi-supplement. However, before further highlighting the action of Se on ARPE-19 cells, the beneficial effects of Gua and LC must first be elucidated. Gua powder is consumed by pre-Columbian people living in the Amazon and is currently widely used as a raw material to produce energy drinks given its high caffeine content. The functional properties of Gua are well established (Algarve et al., 2019; Cadoná et al., 2017; De Araujo et al., 2021; Felin et al., 2022; Hack et al., 2023; Kober et al., 2016).

In one of our previous studies, Gua decreased apoptosis and necrosis and differentially modulated the mRNA and protein expression levels of caspases 1, 3, and 8 in ARPE-19 cells (Bonadiman et al., 2017). Thus, the cytoprotective effects of Gua against BPA are biologically plausible.

LC is an endogenous molecule involved in fatty acid metabolism and is biosynthesized within the human body using the amino acids L-lysine and L-methionine as substrates. LC can also be obtained from many foods, with red meat being the best choice followed by fish, poultry, and milk (Knottnerus et al., 2019). The therapeutic potential of LC has been examined in terms of its neuroprotective effects in some disease conditions (Ribas et al., 2014). Some data suggest that LC can be used as a food supplement to treat age-related macular degeneration associated with mitochondrial dysfunction (Moss et al., 2022). A study performed by Li et al. in ARPE-19 cells (Li et al., 2021) suggested that LC could attenuate EMT, an important underlying mechanism of proliferative vitreoretinopathy induced by TGF- β 1 by inhibiting the Erk1/2 and JNK pathways and upregulating PPAR γ expression. Therefore, our results corroborate prior findings regarding the functional role of LC in Retinal Pigment Epithelium.

In this study, Se was found to have an unexpected effect on ARPE-19 cells. Although Se is a metabolically relevant element and its deficiency is potentially harmful, the relationship between Se and human health is complex. Se has hormetic effects in humans. Moreover, the toxicological effects of Se can be related to its form (speciation). Previous studies on Se nanocapsules (Özkaya et al., 2021) and Selenomethionine (Ananth et al., 2020) revealed the antioxidant effects of Se on oxidative stress markers triggered by BPA exposure. However, in the present study, ARPE-19 cells were supplemented with an inorganic form of Se (Se bis-glycinate, 0.5%). Thus, the chemical form of Se and its corresponding concentration can influence its effects on ARPE-19 cells.

Conclusion

Despite the methodological limitations inherent to *in vitro* studies, our results suggest that the multi-supplement GSC can attenuate the changes in the oxidative and genotoxic markers related to the exposure of ARPE-19 cells to BPA. However, our results revealed that the antioxidant, anti-apoptotic, and genoprotective properties of GSC were not universally shared by its individual components; only Gua and LC proved to be beneficial. Se did not exhibit any positive impact probably because the range of Se concentration that is beneficial to organisms is narrow.

Acknowledgments

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their support. We also thank the Biorep Laboratory, especially technician Bruno Tomazele Rovani. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

References

- ABALO, R., 2021. Coffee and caffeine consumption for human health. *Nutrients*, vol.13, no. 9: p. 2918. doi: 10.3390/nu13092918.
- ABDULHUSSEIN, K et al., 2021. Apoptosis in health and diseases of the eye and brain. *Adv Protein Chem Struct Biol*, vol.121, sn, pp. 279-306. doi: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.008.
- ABRAHAM, A. and CHAKRABORTY, P., 2020. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health*, vol.35, sn, p.p 201-210. doi:10.1515/reveh-2019-0034.
- ALGARVE, T.D, et al., 2019. Guarana improves behavior and inflammatory alterations triggered by methylmercury exposure: an *in vivo* fruit fly and *in vitro* neural cells study. *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 26, no.15, p.p 15069-15083. doi: 10.1007/s11356-019-04881-0.
- ANANTH, S. et al., 2020. Selenomethionine (Se-Met) induces the cystine/glutamate exchanger SLC7A11 in cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells: implications for antioxidant therapy in aging retina. *Antioxidants (Basel)*, vol.10, no.1, p.p 9. doi: 10.3390/antiox10010009.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M et al., 2010. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food Chem Toxicol*, vol.48, no. 7, p.p 1817-20. doi: 10.1016/j.fct.2010.04.013.
- AYAZGÖK, B and TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ, T, 2018. Low-dose bisphenol A induces RIPK1-mediated necroptosis in SH-SY5Y cells: effects on TNF- α and acetylcholinesterase. *J Biochem Mol Toxicol*, vol.21, no. e22233. doi: 10.1002/jbt.22233.
- BARBISAN, F. et al., 2014. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p.p: e107299. doi: 10.1371/journal.pone.0107299.
- BITTENCOURT, L. S. et al., 2013. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food Chem Toxicol*, vol. 53, sno., p.p 119-125. doi: 10.1016/j.fct.2012.11.041.

- BONADIMAN, B.S. et al., 2017. Guarana (*Paullinia cupana*): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. *J Funct Foods*, vol. 2017, no.36, p.p375-386. doi:10.1016/j.jff.2017.07.027.
- BRUGGISSER, R. et al., 2022. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med*, vol.68, no.5, p.p. 445-448. doi: 10.1055/s-2002-32073.
- BULKU, E. et al, 2010. A novel dietary supplement containing multiple phytochemicals and vitamins elevates hepatorenal and cardiac antioxidant enzymes in the absence of significant serum chemistry and genomic changes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 3, n. 2, p.p. 129-144. doi:10.4161/oxim.3.2.11157
- CADONÁ, F.C. et al., 2017. Guaraná, a highly caffeinated food, presents *in vitro* antitumor activity in colorectal and breast cancer cell lines by inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs Pathways. *Nutr Cancer*, vol.69, no.5, p.p.800-810. doi: 10.1080/01635581.2017.1324994.
- CAI, Z. et al., 2019. Selenium, aging and aging-related diseases. *Aging Clin Exp Res*, vol.31, no.8, p.p.1035-1047. doi: 10.1007/s40520-018-1086-7.
- CHEN, H. et al., 2022. Selenium deficiency aggravates bisphenol A-induced autophagy in chicken kidney through regulation of nitric oxide and adenosine monophosphate activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Environ Toxicol*, vol.37, no.10, p.p 2503-2514. doi: 10.1002/tox.23613.
- CHIANG, Y.W. et al., 2022. Bisphenol A induced apoptosis via oxidative stress generation involved Nrf2/HO-1 pathway and mitochondrial dependent pathways in human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells. *Environ Toxicol*, vol.37, sno., p.p. 131-141. doi:10.1002/tox.23384.
- CHOUHAN, S. et al., 2015. Increase in the expression of inducible nitric oxide synthase on exposure to bisphenol A: a possible cause for decline in steroidogenesis in male mice. *Environ Toxicol Pharmacol*, vol.39, no.1, p.p. 405-416. doi: 10.1016/j.etap.2014.09.014.
- CUBILLOS-ROJAS, M. et al., 2014. The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization. *J Biol Chem*, vol. 289, no.21, p.p. 14782-14795. doi: 10.1074/jbc.M113.527978.
- DE ARAUJO, D.P. et al., 2021. The use of guarana (*Paullinia cupana*) as a dietary supplement for fatigue in cancer patients: a systematic review with a meta-analysis. *Support Care Cancer*, vol.29, no.12, p.p. 7171-7182. doi: 10.1007/s00520-021-06242-5.
- ESKES, C. et al., 2017. Good cell culture practices & *in vitro* toxicology. *Toxicol In Vitro*, vol.45, no.3, p.p. 272-277. doi: 10.1016/j.tiv.2017.04.022.
- FELIN, F.D. et al., 2022. Amazonian guarana- and açai-conjugated extracts improve scratched fibroblast healing and *Eisenia fetida* surgical tail amputation by modulating oxidative metabolism. *Oxid Med Cell Longev*, vol.2022, sno, p.p. 3094362. doi: 10.1155/2022/3094362.

- FLIEGER, J. et al., 2022. The first evidence on the occurrence of bisphenol analogues in the aqueous humor of patients undergoing cataract surgery. *J Clin Med*, vol.11, no.21, p.p. 6402. doi:10.3390/jcm11216402.
- GORE, F. et al., 2010. Too much or too little? A review of the conundrum of selenium. *J Water Health*, vol.3, sno., p.p 405-416. doi: 10.2166/wh.2009.060.
- HACK, B. et al., 2023. Effect of guarana (*Paullinia cupana*) on cognitive performance: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, vol. 15, no.2, p.p 434. doi: 10.3390/nu15020434.
- JACEVIC, V. et al., 2021. Acute toxicity of sodium selenite in rodents: pathomorphological study. *Mil Med Sci Lett*, vol. 80, no.3, p.p. 90-96. doi: 10.31482/mmsl.2011.015.
- JENTZSCH, A.M. et al., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*, vol.20, no.2, p.p 251-256. doi: 10.1016/0891-5849(95)02043-8.
- KNOTTNERUS, S.J.G. et al., 2018. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle. *Rev Endocr Metab Disord*, vol.19, no.1, p.p: 93-106. doi: 10.1007/s11154-018-9448-1.
- KOBER, H. et al., 2016. Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Drug Chem Toxicol*, vol.39, no.1, p. 48-52. doi: 10.3109/01480545.2015.1020546.
- LEVINE, R.L. et al., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, vol. 233, sno, p.p 346-357. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9.
- LI, M. et al., 2021. L-carnitine attenuates TGF- β 1-induced EMT in retinal pigment epithelial cells via a PPAR γ -dependent mechanism. *Int J Mol Med*, p.p. 47: 110. doi:10.3892/ijmm.2021.4943.
- LIU, Y. et al., 2021. Coenzyme Q10 ameliorates BPA-induced apoptosis by regulating autophagy-related lysosomal pathways. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 221, sno., p.112450. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112450.
- MACHADO, A.K. et al., 2015. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Res Int*, vol. 67, sno., p.p. 426-433. doi:10.1016/j.foodres.2014.11.056.
- MARX, W. et al, 2020. The effect of emerging nutraceutical interventions for clinical and biological outcomes in multiple sclerosis: A systematic review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, vol.37. doi: 10.1016/j.msard.2019.101486.
- MODANLOO, M. and SHOKRZADEH, M., 2019. Analyzing mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis: potential role of L-carnitine. *Iran J Kidney Dis*, vol.13, n.2, p.p.74-86. PMID: 30988244.

MOOS, W.H. et al., 2022. Treatment and prevention of pathological mitochondrial dysfunction in retinal degeneration and in photoreceptor injury. *Biochem Pharmacol*, vol.203, sno., p.p. 115168. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115168.

MORABITO, C. et al., 2010. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med*, vol.48, no.4, p.p 579-589. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.005.

MURATA, M. et al., 2018. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnol Adv*, vol.36, no.1, p.p. 311-327. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.002.

NAKAMURA, M. et al., 2018. Bisphenol A induces Nrf2-dependent drug-metabolizing enzymes through nitrosylation of Keap1. *Drug Metab Pharmacokinet*, vol.33, no.4, p.p. 194-202. doi: 10.1016/j.dmpk.2018.04.003.

NIE, X and WANG, L, 2022. Plant species compositions alleviate toxicological effects of bisphenol A by enhancing growth, antioxidant defense system, and detoxification. *Environ Sci Pollut Res Int*, vol.29, sno., p.p. 65755-65770. doi:10.1007/s11356-022-20402-y.

NOH, H.J. et al., 2015. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*. *J Ethnopharmacol*, vol.163, sno., p.p. 106-112. doi: 10.1016/j.jep.2015.01.024.

OECD (2016), Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. doi:10.1787/9789264264861-en.

ÖZKAYA, D et al., 2021. Involvement of TRPM2 channel on hypoxia-induced oxidative injury, inflammation, and cell death in retinal pigment epithelial cells: modulator action of selenium nanoparticles. *Biol Trace Elem Res*, vol.199, sno.4, p.p.1356-1369. doi: 10.1007/s12011-020-02556-3.

PECORARO, B.M. et al., 2022. The health benefits of selenium in food animals: a review. *J Anim Sci Biotechnol*, vol.13, no.1, p.p. 58. doi: 10.1186/s40104-022-00706-2.

RAYMAN, M, 2020. Selenium intake, status, and health: a complex relationship. *Hormones (Athens)*, vol.19, sno.1, p.p. 9-14. doi: 10.1007/s42000-019-00125-5.

RIBAS, G.S. et al., 2014. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene*, vol.533, no. 2, p.p. 469-476. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.017.

RUBERTO, S. et al., 2022. Bisphenols induce human genomic damage and modulate HERVs/env expression. *Environ Mol Mutagen*, vol.63, no.6, p.p. 275-285. doi: 10.1002/em.22499.

- SANTORO, A. et al., 2019. Neuro-toxic and reproductive effects of BPA. *Curr Neuropharmacol*, vol.17, n.12, p.1109-1132. doi: 10.2174/1570159X17666190726112101.
- SANTOVITO, A. et al., 2018. Clastogenic effects of bisphenol A on human cultured lymphocytes. *Hum Exp Toxicol*, vol.37, n.1, p.p. 69-77. doi: 10.1177/0960327117693069.
- SEEN, S. and TONG, L., 2018. Dry eye disease and oxidative stress. *Acta Ophthalmol*, vol.96, n.4, p.p. e412-e420. doi: 10.1111/aos.13526.
- SULEIMAN L., et al., 2016. Guarana supplementation modulates triglycerides and some metabolic blood biomarkers in overweight subjects. *Ann Obes Disord*, vol.1, no.1., p.p. 1004.
- TAN, W .et.al., 2020. The role of inflammation in age-related macular degeneration. *Int J Biol Sci*, vol.16, n.15, p.p. 2989-3001. doi:10.7150/ijbs.49890.
- TARAFDAR, A. et al., 2022. The hazardous threat of bisphenol A: toxicity, detection and remediation. *J Hazard Mater*, vol.423, no.A, p.p. 127097. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127097.
- Teixeira, C.F. et al., 2023. A coffee enriched with guarana, selenium, and L-carnitine (GSC) has nutrigenomic effects on oxi-inflammatory markers of relapsing-remitting multiple sclerosis patients: a pilot study. *Mult Scler Relat Disord*, vol.71, p.p. 104515. doi: 10.1016/j.msard.2023.104515.
- Teixeira, C.F. et al., 2021. Safety indicators of a novel multi supplement based on guarana, selenium, and L-carnitine: evidence from human and red earthworm immune cells. *Food Chem Toxicol*, vol.2021, no.150, p.p. 112066. doi:10.1016/j.fct.2021.112066.
- THOMAS, P. et al., 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*, vol.4, no.6, p.p. 825-837. doi: 10.1038/nprot.2009.53.
- TORRES, E.A.F.S, et al., 2022. Effects of the consumption of guarana on human health: a narrative review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol.21, no.1, p.p. 272-295. doi: 10.1111/1541-4337.12862.
- TRAINA, G., 2016. The neurobiology of acetyl-L-carnitine. *Front Biosci (Landmark Ed)*, vol.21, no.7, p.p. 1314-1329. doi: 10.2741/4459.
- VELOSO, C.F. et al., 2018. Neuroprotective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) against vincristine *in vitro* exposure. *J Prev Alzheimers Dis*, vol.5, no.1, p.p.65-70. doi: 10.14283/jpad.2017.45.
- WANG, H. et al., 2019. Bisphenol-A exposure induced neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells. *Environ Int*, vol.127, p.p. 324-332. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.059.
- YONEKURA, L. et al., 2016. Bioavailability of catechins from guaraná (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. *Food Funct*, vol. 7, no.7, p.p. 2970-2978. doi: 10.1039/c6fo00513f.

YU, H and LIU, Y., 2023. Impact of extended and combined exposure of bisphenol compounds on their chromosome-damaging effect—increased potency and shifted mode of action. *Environ Sci Technol*, vol.57, no.1, p.p.498-508. doi:10.1021/acs.est.2c06064.

ZHANG, Z.Y. et al., 2020. Autophagy in age-related macular degeneration: a regulatory mechanism of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*, vol.2020, no.2896036. doi:10.1155/2020/2896036.

5 DISCUSSÃO

Os resultados aqui obtidos suportam a hipótese de que a exposição ao BPA desencadeia um desbalanço oxidativo o que contribui para a ocorrência de alterações na imunocompetência, especialmente envolvendo o sistema imune inato, inflamação crônica de baixo grau, e estados de genotoxicidade.

Neste caso, o desbalanço oxidativo provocado pelo BPA não necessariamente induz estados clássicos de estresse oxidativo. Isto porque, o estresse oxidativo é considerado uma situação em que ocorre excesso de EROs causando um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (BARBISAN et al., 2017). Dada à relevância dos resultados, eles serão posteriormente discutidos com maior profundidade.

O BPA é um dos compostos sintéticos mais utilizados no mundo, resistente à degradação e, é capaz de bioacumular no meio ambiente (MA et al., 2019). Assim, outra questão relevante a ser considerada é que os resultados *in vivo* aqui descritos foram obtidos via exposição aguda. De fato, optamos por realizar um estudo de efeito agudo com base em uma investigação prévia (OLIVERA et al., 2021) que relatou a diminuição da sobrevivência das *E. fetida* em 48 horas de exposição ao BPA. É possível que este efeito tóxico do BPA na espécie envolva a diminuição na imunocompetência deste animal, já que a espécie está adaptada a um meio com grandes quantidades de patógenos e outros componentes potencialmente tóxicos (HOMA, 2018). A exposição aguda ao BPA teve um impacto significativo no sistema imunológico das minhocas, principalmente em concentrações mais baixas. Assim, é possível que este efeito também ocorra em humanos, não sendo necessária a exposição crônica para o efeito negativo nas células e tecidos.

A importância destes dados para o ser humano está subsidiada em evidências publicadas, que sugerem que muitos componentes do sistema imunológico inato foram conservados durante a evolução dos metazoários. Por esse motivo, algumas espécies, como a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* (TROHA; BUCHON, 2019) e o nematoide *Caenorhabditis elegans*, têm sido usadas como modelos experimentais imunológicos (KIM; EWBANK, 2018). Estudos realizados na última década sugeriram que o uso da minhoca californiana vermelha (espécies *E.fetida* e *E.andrei*) também seria relevante para o entendimento da imunidade inata de invertebrados e vertebrados, incluindo o ser humano (HOMA, 2018).

Apesar de o BPA agir sobre o metabolismo oxidativo e imune das minhocas, em geral, os resultados mostraram que o BPA afetou os marcadores analisados, mas esse efeito não seguiu um padrão concentração-resposta e foi limitado às concentrações mais baixas (0,1–1 μM). Os efeitos mais relevantes das baixas concentrações de BPA também foram descritos anteriormente em outros estudos, sugerindo que há uma interação, seguida da inibição das várias vias de sinalização (JALAL et al., 2018).

Outro aspecto a ser destacado diz respeito às regulamentações relativas à exposição ao BPA. Neste estudo, as quatro concentrações testadas foram inferiores à dose máxima recomendada pela ANVISA (2021): 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 μM , que é aproximadamente igual a 0,02, 0,06, 0,3 e 0,6 mg/kg de alimento/dia, respectivamente. Apenas a concentração de 10 μM estava acima do limite máximo recomendado. Apesar das concentrações testadas estarem abaixo dos limites de exposição recomendados, o efeito do BPA sobre as minhocas é preocupante. Isso ocorre porque estes invertebrados são altamente relevantes na manutenção da qualidade do solo, e o efeito da exposição a agente de trocas hormonais pode ter consequências imprevisíveis (HOMA, 20018).

O BPA é considerado um importante fator de risco para doenças endócrinas, imunes e DCNTs, incluindo condições neurológicas, cardiovasculares, reprodutivas e oncológicas (CIMMINO et al., 2020). Uma grande proporção dessas doenças associadas à exposição ao BPA está relacionada ao estabelecimento de estados inflamatórios crônicos de baixo grau, que acabam por representar um comprometimento da imunocompetência na resolução das respostas inflamatórias (FURMAN et al., 2019). Os dados aqui descritos corroboram essa suposição.

Semelhante aos leucócitos, os celomócitos são células heterogêneas que são classificadas genericamente em dois grupos: amebócitos e eleócitos, também conhecidos como cloragócitos (BILEJ et al., 2000). Estudos anteriores mostraram que as respostas imunes de amebócitos envolvem fagocitose, produção de EROs e efeitos citotóxicos contra microrganismos. Portanto, as moléculas de EROs são componentes relevantes da defesa da minhoca contra patógenos (BILEJ et al., 2000; HOMA et al., 2013).

Com foi anteriormente comentado, neste estudo o principal desbalanço oxidativo observado foi entre o O_2^- e ON que são moléculas chaves na resposta inflamatória. No desbalanço gerado pelo BPA observou-se um grande impacto

genotóxico desta molécula, o que implica no potencial aumento das taxas de apoptose e na imunocompetência.

Em particular, o O_2^- desempenha um papel estratégico nas células fagocitárias, que usam essas EROs para matar e digerir microrganismos. Deste modo, em células fagocíticas, como os celomócitos, a elevação dos níveis de O_2^- pode ser originada por processos espontâneos ou pela mediação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), que é estrategicamente imunocompetente (VARELA-CHINCHILLA et al., 2021).

O ON também tem um papel relevante na resposta inflamatória, principalmente relacionada às células fagocitárias, e demonstrou suprimir a atividade fagocitária dos neutrófilos. Nesse contexto, as evidências sugerem que o O_2^- e o ON interagem com os mecanismos de sintonia fina que regulam a vida e a morte de neutrófilos (GALKINA et al., 2019).

Assim, postulamos que o BPA poderia aumentar os níveis de O_2^- em celomócitos, induzindo reações espontâneas com moléculas de ON, que geram espécies reativas de nitrogênio (ERNs), especialmente peroxinitrito (ONOO⁻). O peroxinitrito, por sua vez, forma dióxido de nitrogênio (NO_2) e OH^- , que possuem alta afinidade pelo DNA, causando extensos danos a essa molécula (GALKINA et al., 2019). Esta pode ser a principal via que explica o impacto do BPA no aumento do dano ao DNA, avaliado através da análise de MN.

O aumento da genotoxicidade também está intimamente relacionado à indução de eventos apoptóticos, conforme observado nos resultados aqui descritos. No entanto, como os níveis de EROs precisam ser regulados para evitar efeitos indesejáveis, está bem estabelecido que os celomócitos têm estratégias de defesa antioxidante, incluindo enzimas, como SOD, glutathiona peroxidase (GPX) e CAT (HOMA et al., 2016). Por esse motivo, é possível que após 24 horas as taxas de oxidação de lipídios e proteínas tenham diminuído, enquanto a taxa de dano ao DNA foi avaliada por meio de análise de MN e níveis de apoptose.

A genotoxicidade desencadeada pela exposição ao BPA foi descrita anteriormente em roedores, causando um aumento na frequência de MN em eritrócitos policromáticos (EPCs), aberrações cromossômicas estruturais em células da medula óssea e danos ao DNA em linfócitos (TIWARI et al., 2012). Como os testes de MN fornecem informações importantes sobre a capacidade de um produto químico de interferir na estrutura e função cromossômica, este ensaio confirma que o BPA tem

efeitos genotóxicos em várias espécies, incluindo minhocas. Também é importante notar que os testes de MN devem ser realizados em células em divisão ativa. Em nosso estudo, verificamos que o BPA induziu um aumento na taxa de proliferação celular, possibilitando a realização do teste. No entanto, realizar essas análises foi um desafio porque os celomócitos coletados presentes no fluido celômico tendiam a migrar, agrupar e formar grandes massas citoplasmáticas polinucleadas. Apesar disso, foi possível observar a formação de MN em diferentes tipos de celomócitos.

A indução da proliferação celular, aumentando a concentração de amebócitos, confirmou a ação do BPA no sistema imune de *E. fetida*. As funções dos celomócitos estão associadas à expressão de genes, como eaTLR (SKANTA et al., 2013), bem como proteínas AMP-like, também conhecidas como lumbricina 1 (WIESNER E VILCINSKAS, 2010).

Porém, a exposição ao BPA induziu uma resposta antagônica nos dois genes estudados, pois o gene AMP-1 foi ativado e eaTLR não modificou sua expressão. Esse resultado é bastante interessante, considerando que esses genes são altamente sensíveis a fatores ambientais bióticos e abióticos que representam um perigo para a homeostase das minhocas. Geralmente, esses genes são superexpressos na presença de patógenos (SKANTA et al., 2013; WANG et al., 2018; MINCARELLI et al., 2019). Peptídeos antimicrobianos, como o AMP-1, são importantes contribuintes para a defesa não específica do hospedeiro em vertebrados e invertebrados, e são estruturalmente conservados durante a filogênese (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Portanto, não foi surpreendente que o BPA induzisse um aumento na expressão de AMP-1.

As células imunes expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são capazes de detectar o perigo ao reconhecer padrões moleculares associados a patógenos específicos (PAMPs) (VIJAY, 2018). De tal modo que, a não responsividade do gene eaTLR ao BPA é um resultado inesperado, considerando que a exposição a esse poluente induz danos no DNA, apoptose e aumenta a concentração de amebócitos de minhocas. Esse tipo de ação foi observado anteriormente quando as minhocas foram expostas a outros agentes tóxicos, como rotenona (JUNG et al., 2021) e nanopartículas de dióxido de titânio (NAVARRO PACHECO et al., 2021).

Esse efeito antagônico entre a expressão dos genes AMP-1 e eaTLR pode estar relacionado à diminuição da imunocompetência das minhocas causada pelo

BPA em resposta à exposição a leveduras. Dessa forma, moléculas que diminuem ou não induzem o aumento de expressão de genes eaTLR, como o BPA, podem prejudicar o sistema imunológico da minhoca, com consequências imprevisíveis para sua sobrevivência.

Mesmo assim, devemos ter cuidado ao transferir esses resultados para humanos. Isso ocorre porque nossa espécie possui mecanismos hepáticos altamente eficientes para a depuração do BPA (COLLET et al., 2015), mas, há evidências de que o BPA está associado a um risco aumentado de certos tipos de câncer (CIMMINO et al., 2020). Essa associação pode estar ligada à indução de danos no DNA pelo BPA ao tipo de “cegueira do sistema imunológico”, o qual desencadeia menos eficiência no reconhecimento e morte de células cancerígenas.

Os resultados aqui descritos suportam a hipótese de que o BPA induz estresse oxidativo, causando um desequilíbrio nos níveis de O_2^- e ON e danos no DNA, o que pode contribuir para a resposta imune da minhoca. Apesar da ativação inflamatória desencadeada pelo BPA, a imunocompetência das minhocas na captura e destruição de agentes externos, como leveduras, é prejudicada. Portanto, a associação entre danos no DNA e alterações no metabolismo imune inato pode ser parte relevante da ação do BPA associada ao risco de desenvolvimento de DCNTs, especialmente câncer.

Assim, considerando o estudo de Chiang et al. (2022) onde é sugerido que além de seus efeitos negativos nas células e tecidos reprodutivos, o BPA pode impactar outros tipos de tecidos e desenvolver DCNTs, analisamos um segundo modelo experimental *in vitro*, formado pelo epitélio pigmentar da retina (ARPE-19). Vale ressaltar a importância da função ocular para a autonomia e qualidade de vida, especialmente na população idosa, a qual tem sido notavelmente discutida em função do aumento da expectativa de vida e a inversão da pirâmide dos grupos populacionais.

A investigação sobre componentes dietéticos com propriedades antioxidantes, e seus efeitos sob aqueles induzidos pelo BPA nas células ARPE-19 é altamente relevante. Com base em evidências anteriores de estudos *in vitro*, *in vivo* e em humanos em que o GSC apresentou efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (TEIXEIRA et al, 2021;2023) postulamos que ele também poderia atenuar os efeitos negativos do BPA nas células ARPE-19. Para testar esta hipótese, expusemos as células ARPE-19 ao BPA com ou sem adição de GSC e seus componentes isolados. A exposição ao BPA desencadeou alterações em alguns marcadores oxidativos, mas

estes efeitos foram atenuados pela exposição ao GSC (particularmente Gua e L-car). No entanto, a exposição ao Se ou Se+BPA exacerbou o estresse oxidativo. Estas descobertas sugerem que as relações entre o BPA e os componentes antioxidantes de GSC, Gua, Se e L-car não são universalmente aplicáveis às células ARPE-19.

É fundamental enfatizar a necessidade de determinar uma concentração representativa de BPA capaz de induzir o estresse oxidativo e quadros de genotoxicidade em células ARPE-19. Isto ocorre porque os protocolos *in vitro* podem provocar variações na resposta citotóxica dependendo das condições de cultura, mesmo quando os laboratórios seguem as diretrizes descritas no Documento de Orientação sobre Boas Práticas de Métodos *In Vitro* (GIVIMP) publicado pela OCDE (OECD, 2016; ESKES et al., 2017). Além disso, não existem estudos anteriores envolvendo análise de genotoxicidade através do ensaio MN em células ARPE-19.

Por esta razão, fomos criteriosos na seleção da concentração de BPA para avaliar os efeitos antioxidantes do GSC e de seus componentes. Nosso objetivo era garantir que a concentração não fosse muito baixa para evitar alterações oxidativas ou muito alta para causar citotoxicidade aguda, levando à morte das células (ARPE-19) em 24 horas. Ao escolher uma faixa de concentração apropriada, equilibramos a indução do estresse oxidativo e a manutenção da viabilidade celular por uma duração experimental adequada. Esta abordagem permitiu-nos avaliar eficazmente os potenciais efeitos protetores do GSC e dos seus componentes contra o impacto oxidativo do BPA nas células ARPE-19.

Os resultados de dois ensaios de viabilidade não demonstraram citotoxicidade aguda (culturas de 24h) em células ARPE-19 expostas ao BPA na faixa de concentração de 0,001 a 3 μM . No entanto, os resultados das células expostas a 10 μM de BPA foram contraditórios. Embora o ensaio MTT não tenha mostrado nenhuma diminuição significativa na viabilidade das células ARPE-19, o ensaio ATP revelou uma redução significativa na viabilidade em comparação com os controles.

Ainda que o ensaio MTT seja amplamente utilizado para testes de citotoxicidade em modelos *in vitro*, ele apresenta algumas limitações devido à interferência potencial de certas moléculas, como os polifenóis (BRUGGISSER et al., 2002). Em nosso estudo, além da concentração máxima de BPA (10 μM) que não reduziu a viabilidade celular, as concentrações de 1 e 3 μM mostraram um aumento significativo de células viáveis em comparação com o controle, embora pequeno (<10%). Esses resultados diferiram daqueles publicados por Chiang et al. (2022) que

observaram um efeito citotóxico quando células ARPE-19 foram expostas a 10 μM de BPA. Como esta foi a concentração mais baixa testada pelos autores, e encontramos esta inconsistência em relação à citotoxicidade do BPA, não podemos confirmar se o BPA pode ter afetado os resultados do ensaio MTT. Como resultado, excluímos esta concentração dos protocolos utilizados para testar os efeitos antioxidantes e genoprotetores do GSC e seus componentes. Isto garantiu que quaisquer efeitos observados não fossem comprometidos por fatores limitantes relacionados ao ensaio MTT, mantendo a integridade e confiabilidade da nossa abordagem experimental.

Esta decisão foi reforçada pela análise do efeito das três concentrações mais elevadas de BPA (1, 3 e 10 μM) nos níveis de quatro marcadores oxidativos. Observamos um aumento nos níveis de ON e LPX em comparação aos controles nas culturas de 24, 48 e 72h. Os níveis de PCarb também foram maiores em culturas de 48 horas tratadas apenas com BPA, sugerindo um efeito oxidativo transitório nas proteínas celulares. Isto foi possivelmente regulado pelos componentes antioxidantes endógenos das células ARPE-19.

Um resultado intrigante que requer discussão mais aprofundada é a diminuição dos níveis de O_2^- nas células expostas ao BPA em comparação com o controle. No estudo de Chiang et al. (2022) eles observaram a redução nas concentrações das enzimas - superóxido dismutase (SOD) e catalase - em células ARPE-19 expostas ao BPA. Eles também observaram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica nas células; entretanto, não quantificaram os níveis de ON. O O_2^- tem alta afinidade pelo ON, e a reação dessas duas moléculas gera uma espécie reativa de nitrogênio (peroxinitrito) que leva à extensa peroxidação lipídica das membranas. Como os níveis de superóxido foram significativamente reduzidos nas células ARPE-19 expostas ao BPA, é possível que o BPA induza um aumento substancial na concentração de ON, com grande parte dele reagindo com o O_2^- , elevando conseqüentemente os níveis de peroxidação lipídica. Esta condição poderia explicar pela diminuição na expressão de SOD. A interação entre O_2^- e ON pode ser um fator crucial que contribui para as alterações observadas nos marcadores de estresse oxidativo e nos níveis de enzimas antioxidantes em resposta à exposição ao BPA.

Investigações adicionais sobre a relação entre essas espécies reativas são necessárias para compreender completamente os mecanismos subjacentes ao estresse oxidativo induzido pelo BPA nas células ARPE-19 -esta suposição é apoiada por estudos anteriores -. Um estudo descreveu um aumento na expressão da óxido

nítrico sintase induzível (iNOS) e nos níveis de ON nos testículos de camundongos expostos ao BPA (CHOUHAN et al., 2015). Os autores sugeriram que o efeito modulador do BPA no metabolismo do ON poderia contribuir para um declínio na esteroidogênese masculina. Outras investigações também descreveram um aumento nos níveis de iNOS e/ou ON em células de rim embrionário de galinha (CHEN et al., 2002) e na linhagem celular Hep3B de hepatoma humano (NAKAMURA et al., 2018).

Ainda, um estudo de Wang et al. (2019) postulou que o BPA fora capaz de induzir neurotoxicidade em neurônios glutamatérgicos derivados de células-tronco embrionárias humanas, devido ao aumento da atividade enzimática de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e nNos (óxido nítrico sintase neuronal). Outra investigação *in vitro* revelou que o BPA induziu níveis citotóxicos de ON e caspase-8 em células semelhantes a neurônios (AYAZGÖK; TÜYLÜ, 2018). Os resultados destes estudos confirmam a possibilidade de o BPA induzir níveis elevados de ON, levando a potenciais interações com O_2^- .

Embora a taxa de proliferação celular não tenha sido afetada pela exposição ao BPA, a qualidade do DNA das células diminuiu, como mostrado nos resultados do ensaio MN. Não foi possível identificar estudos anteriores envolvendo análise de MN em células ARPE-19, indicando que esta abordagem neste tipo de modelo *in vitro* é inovadora e pode servir de referência para estudos futuros que avaliem a genotoxicidade de substâncias contra células epiteliais da retina. Nossos resultados mostraram que a frequência de MN em células expostas ao BPA na concentração de 3 μ M foi aproximadamente quatro vezes maior que a das células expostas a uma concentração de 1 μ M. Juntamente com os resultados das outras análises sobre a viabilidade celular e os níveis de marcadores oxidativos, a melhor concentração de BPA para testar o efeito citoprotetor do GSC e seus componentes é de 3 μ M.

Nossas análises confirmaram que o BPA pode aumentar a taxa de apoptose e diminuir a proliferação celular em culturas de 72h de células ARPE-19. No entanto, as taxas de apoptose foram revertidas nas células ARPE-19 expostas ao GSC e aos seus componentes individuais, indicando um efeito citoprotetor; em contraste, as células expostas ao Se apresentaram uma taxa de apoptose maior que os controles. O Se é um mineral essencial que desempenha um papel crucial em vários processos biológicos, porém a sua suplementação apresenta riscos e benefícios, dependendo dos níveis de ingestão. Em pequenas quantidades mostra-se benéfico, já a sua ingestão excessiva pode causar toxicidade (selenose).

Em humanos, a ingestão diária recomendada de Se varia dependendo da idade, sexo e fase da vida. Para a maioria dos adultos, a ingestão diária recomendada é de aproximadamente 55–70 µg/dia. O Se geralmente é obtido através de uma dieta balanceada que inclui alimentos como peixes, mariscos, nozes, sementes e grãos integrais (GORE; FAWELL; BARTRAM, 2010). Embora tenhamos testado uma concentração de Se inferior à dose recomendada (40 µM) neste estudo, é possível que esta concentração seja tóxica para as ARPE-19, considerando que não há mecanismo de depuração em culturas celulares e a exposição ao Se nesta concentração foi contínua.

Outra possível explicação para esses resultados está na formulação química do Se utilizada neste estudo. Os suplementos são encontrados em diferentes formulações para facilitar sua absorção pelo organismo. Alguns dos tipos mais comuns de formulações de Se usadas em suplementos incluem selenometioninas, seleneto e selenato, levedura de selênio e outras formulações especiais. No Brasil, a forma comercial mais comum de Se é o bisglicinato de selênio quelado a 0,5%, utilizado no presente estudo. As células ARPE-19 são provavelmente mais sensíveis a este composto químico de Se do que a selenometionina, que também é amplamente utilizada.

Resultados semelhantes sobre o efeito pró-apoptótico do BPA já foram descritos na literatura, incluindo aqueles em células C2C12 de mioblastos de camundongo imortalizadas por Liu et al. (2021), nesse estudo o efeito pró-apoptótico do BPA foi atenuado pela suplementação com coenzima Q10 (CoQ10), um poderoso antioxidante, que pode melhorar a integridade da membrana lisossomal, a função de degradação lisossomal e promover a autofagia. O efeito anti-apoptótico do GSC e dos seus componentes individuais foram observados neste estudo. Na verdade, o efeito genotóxico do BPA pode ser dependente de órgãos e tipos de células, semelhante ao das células sanguíneas humanas (SANTOVITO et al., 2018; RUBERTO et al., 2022) e de algumas linhagens celulares, como células de hepatoma humano (HepG2) (KOBBER et al., 2016; YU; LIU, 2023), onde a frequência de MN e outros tipos de danos genômicos aumentam na presença de BPA.

A análise do efeito de cada componente individual do GSC revelou alguns resultados surpreendentes: (1) O GSC não apresentou efeitos aditivos ou sinérgicos com os dos seus componentes individuais. (2), um efeito citogenotóxico foi desencadeado pela exposição ao Se, o que não foi observado com o

multissuplemento. Porém, antes de destacar ainda mais a ação do Se nas células ARPE-19, os (3) efeitos benéficos do Gua e do L-car devem primeiro ser elucidados.

O pó de Gua é consumido pelos povos pré-colombianos que vivem na Amazônia e, atualmente é amplamente utilizado como matéria-prima para a produção de bebidas energéticas devido ao seu alto teor de cafeína. As propriedades funcionais do Gua estão bem estabelecidas (KOBBER et al., 2016; FELIN et al., 2022; YU; LIU, 2023; ALGARVE et al., 2019; CADONÁ et al., 2017; DE ARAUJO et al., 2021; HACK et al., 2023). Em um de nossos estudos anteriores, o Gua diminuiu a apoptose e a necrose e modulou diferencialmente os níveis de expressão de mRNA e proteína das caspases 1, 3 e 8 em células ARPE-19 (BONADIMAN, 2017). Assim, os efeitos citoprotetores do Gua contra o BPA são biologicamente plausíveis.

A L- car é uma molécula endógena envolvida no metabolismo dos ácidos graxos e é biossintetizada no corpo humano usando os aminoácidos L-lisina e L-metionina como substratos. A L- car também pode ser obtida de muitos alimentos, sendo a maior fonte a carne vermelha, seguida de peixe, aves e leite (KNOTTNERUS et al., 2018). O potencial terapêutico da L-car foi examinado em termos de seus efeitos neuroprotetores em algumas condições de doença (RIBAS; VARGAS; WAJNER, 2014). Alguns dados sugerem que ela pode ser usada como suplemento alimentar para tratar a degeneração macular relacionada à idade associada à disfunção mitocondrial (MOOS et al., 2022). Um estudo realizado por Li et al (2021) em células ARPE-19 sugeriram que a L-car poderia atenuar a transição epitelial-mesenquimal (EMT), um importante mecanismo subjacente da vitreorretinopatia proliferativa induzida por fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), inibindo as vias quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (JNK) e regulando positivamente a expressão de PPAR γ . Portanto, nossos resultados corroboram achados anteriores sobre o papel funcional da molécula no epitélio pigmentar da retina.

Como já mencionado o Se não apresentou os resultados esperados. Embora o Se seja um elemento metabolicamente relevante e sua deficiência seja potencialmente prejudicial, a relação entre o Se e a saúde humana é complexa. Se tem efeitos horméticos em humanos. Além disso, os efeitos toxicológicos do Se podem estar relacionados à sua forma (especificação). Estudos anteriores sobre nanocápsulas de Se (Özkaya et al., 2021) e Selenometionina (ANANTH et al., 2020) revelaram os efeitos antioxidantes do Se nos marcadores de estresse oxidativo

desencadeados pela exposição ao BPA. No entanto, no presente estudo, as células ARPE-19 foram suplementadas com uma forma inorgânica de Se (bis-glicinato de Se, 0,5%). Assim, a forma química do Se e sua concentração correspondente podem influenciar seus efeitos nas células ARPE-19.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui descritos apoiam as hipóteses de que o BPA induz estresse oxidativo, causando um desequilíbrio nos níveis de O_2^- e ON e danos no DNA, o que pode causar alterações na resposta imune das minhocas. Apesar da ativação inflamatória desencadeada pelo BPA, a imunocompetência das minhocas em capturar e destruir agentes externos, foi prejudicada. Portanto, a associação entre danos no DNA e alterações no metabolismo imunológico inato poderia ser mecanismo a ser considerado para a ação do BPA associada ao risco de DCNTs. Ainda, apesar das limitações metodológicas inerentes aos estudos *in vitro*, nossos resultados sugeriram que o GSC multissuplemento pode atenuar as alterações nos marcadores oxidativos e genotóxicos relacionados à exposição das células ARPE-19 ao BPA. No entanto, nossos resultados revelaram que as propriedades antioxidantes, antiapoptóticas e genoprotetoras do GSC não foram universalmente compartilhadas pelos seus componentes quando analisados isoladamente; apenas Gua e L-car provaram ser benéficos. O Se não exibiu nenhum impacto positivo, provavelmente porque a faixa de concentração de Se que é benéfica para os organismos é estreita. Mais estudos precisam ser realizados para que nossas hipóteses sejam confirmadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. **Inflammatory bowel disease**. N Engl J Med, v. 361, n. 21, p. 2066-2078, 2009. doi: 10.1056/NEJMra0804647.
- ACCONCIA, F.; PALLOTTINI, V.; MARINO, M. **Molecular Mechanisms of Action of BPA**. Dose Response, v.13, n. 4, p. 1-9, 2015. doi:10.1177/1559325815610582
- ALGARVE, T.D. et al. **Guarana improves behavior and inflammatory alterations triggered by methylmercury exposure: an *in vivo* fruit fly and *in vitro* neural cells study**. Environ Sci Pollut Res Int, v.26, n.15, p.15069-15083, 2019; doi: 10.1007/s11356-019-04881-0.
- ALLARD, P. COLAIÁCOVO, M.P. **Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities**. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 107, n.47, p. 20405-20410, 2010. doi: 10.1073/pnas.1010386107
- ALVES, A. et al. **Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells**. Food Chem. Toxicol, v.134, n.110809, p.1 -12, 2019. doi: 10.1016/j.fct.2019.110809.
- ALVES, A. O. et al. **Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells**. Food and Chemical Toxicology, England, v. 134, 110809, 2019. doi: 10.1016/j.fct.2019.110809.
- ANANTH, S. et al. **Selenomethionine (Se-Met) induces the cystine/glutamate exchanger SLC7A11 in cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells: implications for antioxidant therapy in aging retina**. Antioxidants (Basel), v. 10, n.1, p.9, 2020. doi: 10.3390/antiox10010009.
- ANGLE, B. M. et al. **Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation**. Reprod Toxicol, v. 2013, n. 42, p. 256-268, 2013. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.07.01
- ARAIZA, V.H.D.R. et al. **Bisphenol A, an endocrine-disruptor compound, that modulates the immune response to infections**. Front Biosci (Landmark Ed), v. 1, n. 26, p. 346-362, 2021. doi: 10.2741/4897.
- AYAZGÖK, B.; TÜYLÜ, K. T. **Low-dose bisphenol A induces RIPK1-mediated necroptosis in SH-SY5Y cells: effects on TNF- α and acetylcholinesterase**. J Biochem Mol Toxicol, v. 21, n. e22233, 2018. doi: 10.1002/jbt.22233.
- AYUSO, J. M. et al. **Effect of Acute and Chronic Oral L-Carnitine Supplementation on Exercise Performance Based on the Exercise Intensity: A**

Systematic Review. *Nutrients*, v. 13, n. 12, p. 4359, 2021. doi: 10.3390/nu13124359.

BABIĆ, S. **Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol A concentrations using the soil invertebrate *Eisenia fetida*.** *J Hazard Mater*, v. 15, n. 318, p. 477-486. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.017.

BADAWY, M.M. et al. **Potential Effects of Bisphenol A on the Heart and Coronary Artery of Adult Male Rats and the Possible Role of L-Carnitine.** *J Toxicol*, v. 2022, n. 7760594, 2022. doi: 10.1155/2022/7760594

BARBISAN, F. et al. **Methotrexate – related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism.** *Plos One*, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0107299

BEN-JONATHAN, N.; HUGO, E. R.; BRANDEBOURG, D. T. **Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome.** *Mol Cell Endocrinol*, v. 304, n. 1-2, p. 49-54, 2009. doi: 10.1016/j.mce.2009.02.022.

BERNARDO, P.E.M. et al. **Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade – Uma Revisão.** *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 74, n.1, p. 1-11, 2015.

BILEJ, M. et al., 2000. **Antimicrobial defense of the earthworm.** *Folia Microbiol. Praha*, v. 45, n. 283, p. 283–300. doi: 10.1007/BF02817549.

BONADIMAN, B.S.R. **Evaluation of the effect of guarana (*Paullinia cupana*) on age-associated eye disorders: a translational study,** Federal University of Santa Maria, Santa Maria - Brazil, 2017. Available at: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/13759/DIS_PPGFARMACOLOGIA_2017_BONADIMAN_BEATRIZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

BONTEMPO, P. et al. **Molecular analysis of the apoptotic effects of BPA in acute myeloid leukemia cells.** *J Transl Med*, v. 2009, p. 7-48, 2009. doi: 10.1186/1479-5876-7-48

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008.** Dispõe sobre regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 mar. 2008. Seção 1, p. 43-51, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa – IN nº 28, de 26 de julho de 2018.** *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, ed. 144, s. 1, p. 141, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/KujrW0TZC2Mb/content/id/34380639/do1-2018-07-27-

instrucaonormativa-in-n-28-de-26-de-julho-de-2018-34380550. Acesso em: 12 mai. 2022.

BRIONESA, M.J.I.; ÁLVAREZ-OTERO, R. **Body wall thickness as a potential functional trait for assigning earthworm species to ecological categories.** *Pedobiologia*, v. 67, p. 26-34, 2018. doi: 10.1016/j.pedobi.2018.02.001

BROMER, J.G. et al. **Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response.** *FASEB J*, v. 24, n. 7, p. 2273-2280, 2010 doi: 10.1096/fj.09-140533.

BRUGGISSER, R. et al. **Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay.** *Planta Med*, v.68, n.5, p. 445-448, 2002. doi: 10.1055/s-2002-32073.

BUCKLEY, J. P. et al. **Ultra-processed food consumption and exposure to phthalates and bisphenols in the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2013–2014.** *Environ Int*, v. 131, n.105057, p. 1-24, 2019. doi: 10.1016/j.envint.2019.105057

CADONÁ, F.C. et al. **Guaraná, a highly caffeinated food, presents *in vitro* antitumor activity in colorectal and breast cancer cell lines by inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs Pathways.** *Nutr Cancer*, v.69, n.5, p.800-810, 2017. doi: 10.1080/01635581.2017.1324994.

CALAFAT, A.M. et al. **Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004.** *Environ Health Perspect*, v. 116, n.1, p. 39-44, 2008. doi: 10.1289/ehp.10753

CALAFAT, M. A. et al. **Exposure to bis]phenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants.** *Environ Health Perspect*, v. 117, n. 4, p. 639-644, 2009. doi: 10.1289/ehp.0800265.

CAMPESI, I. et al. **Sex Differences in Estrogen Receptor α and β Levels and Activation Status in LPS-Stimulated Human Macrophages.** *J Cell Physiol*, v. 232, n.2, p. 340-345, 2017. doi: 10.1002/jcp.25425.

CAO, X; CORRIVEAU, J; POPOVIC, S. **Levels of bisphenol A in canned soft drink products in Canadian markets.** *J Agric Food Chem*, v. 57, n. 4, p. 1307-1311, 2009. doi: 10.1021/jf803213g.

CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G. **Is bisphenol A a weak carcinogen like the natural estrogens and diethylstilbestrol?.** *IUBMB Life*, v. 62, n.10, p. 746-751. doi: 10.1002/iub.376.

CHEN, H. et al. **Selenium deficiency aggravates bisphenol A-induced autophagy in chicken kidney through regulation of nitric oxide and adenosine monophosphate activated protein kinase/mammalian target of rapamycin**

signaling pathway. Environ Toxicol, v. 37, n.10, p.2503-2514, 2022. doi: 10.1002/tox.23613.

CHIANG, Y. et al. **Bisphenol A induced apoptosis via oxidative stress generation involved Nrf2/HO-1 pathway and mitochondrial dependent pathways in human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells.** Environ Toxicol, v. 37, n. 1, p. 131-141, 2022. doi: 10.1002/tox.23384.

CHO, J.H. et al. **Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: Purification, cDNA cloning and molecular characterization.** Biochim. Biophys. Acta, v.1408, n.1, p.67–76, 1998. doi: 10.1016/s0925-4439(98)00058-1.

CHOI, W.S. et al. **The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells.** Cell. Immunol, v.280, p.164–170, 2012. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.12.007.

CHOUHAN, S. et al. **Increase in the expression of inducible nitric oxide synthase on exposure to bisphenol A: a possible cause for decline in steroidogenesis in male mice.** Environ Toxicol Pharmacol, v.39, n.1, p. 405-416, 2015 doi: 10.1016/j.etap.2014.09.014.

CIMMINO, I. et al. **Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease.** Int J Mol Sci, v. 21, n. 16, p. 57-61, 2020. doi: 10.3390/ijms21165761.

CLINE, S. D. **Mitochondrial DNA damage and its consequences for mitochondrial gene expression.** Biochim Biophys Acta, v.1819, n. 9-10, p. 979-991, 2012. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.

COLLET, S.H. et al. **Allometric scaling for predicting human clearance of bisphenol A.** Toxicol. Appl. Pharmacol, v. 284, p. 323–329, 2015. doi: 10.1016/j.taap.2015.02.024.

CONSTANTINESCU-ARUXANDEI, D. et al. **Selenium analysis and speciation in dietary supplements based on next-generation selenium ingredients.** Nutrients, Switzerland, v. 10, n. 10, 1466, 2018. doi: 10.3390/nu10101466

CUBILLOS – ROJAS, M. et al. **The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization.** J Biol Chem, v.289, n.21, p. 14782-14795, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.527978.

COUSINS, I. T. et al. **A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A.** Hum. Ecol. Avaliação de risco, v. 8, p. 1107-1135, 2002. doi: 10.1080 / 1080-700291905846.

CRUVINEL, W. M. et al. **Sistema Imunitário: Parte I – Fundamentos da Imunidade Inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Revista Brasileira de Reumatologia, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010. doi: 10.1590/S0482-50042010000400008

CSANÁDY, G. et al. **Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein.** *Toxicokinetics and Metabolism*, v.76, n. 5-6, p. 299–305, 2002. doi: 10.1007/s00204-002-0339-5.

CSS. **Recommandations nutritionnelles pour la Belgique.** Publication du conseil supérieur de la santé. N° 8309. Available online: http://www.health.belgium.be/internet2Prd/groups/public/@public/@shc/documents/ie2divers/12352470_fr.pdf (accessed on 30 April 2012).

DAIRKEE, S. H. et al. **Bisphenol-A-induced inactivation of the p53 axis underlying deregulation of proliferation kinetics, and cell death in non-malignant human breast epithelial cells.** *Carcinogenesis*, v. 34, n. 3, p. 703-712, 2013. doi: 10.1093/carcin/bgs379

DE ARAUJO, D.P. et al. **The use of guarana (*Paullinia cupana*) as a dietary supplement for fatigue in cancer patients: a systematic review with a meta-analysis.** *Support Care Cancer*, v. 29, n.12, p. 7171-7182, 2021. doi: 10.1007/s00520-021-06242-5.

DEAVALL, D. G. et al. **Drug-induced oxidative stress and toxicity.** *J Toxicol*, v. 2012, n. 645460, p. 1-13, 2012. doi: 10.1155/2012/645460.

DEB, P. **Endocrine disrupting chemical, bisphenol-A, induces breast cancer associated gene HOXB9 expression in vitro and in vivo.** *Gene*, v. 590, n. 2, p. 234-243, 2016. doi: 10.1016/j.gene.2016.05.009.

DEBENEDICTIS, B.; GUAN, H.; KAIPING, Y. **Prenatal Exposure to Bisphenol A Disrupts Mouse Fetal Liver Maturation in a Sex-Specific Manner.** *J Cell Biochem*, v. 117, n.2, p. 344-350, 2016. doi: 10.1002/jcb.25276.

DINICOLANTONIO J.J et al. **L- carnitine in the secondary prevention of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis.** *Proc. Mayo Clin. Proc*, v. 2013, n.88, p. 544–551, 2013. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.02.007.

DOMINIAK, A. et al. **Selenium in the therapy of neurological diseases. Where is it going?.** *Current Neuropharmacology, United Arab Emirates*, v. 14, n. 3, p. 282-299, 2016. doi: 10.2174/1570159X14666151223100011

DOUGLAS, D. E. **Retine revisited.** *J Pharm Pharmacol*, v. 54, n. 10, p. 1429-1431, 2002. doi:10.1211/002235702760345545.

DURAZZO, A. et al. **The nutraceutical value of carnitine and its use in dietary supplements.** *Molecules, Switzerland*, v. 25, n. 9, p.2127, 2020. doi: 10.3390/molecules25092127.

ELMORE, S. **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007. doi: 10.1080/01926230701320337.

ESKES, C. et al. **Good cell culture practices & *in vitro* toxicology**. *Toxicol In Vitro*, v. 45, n.3, p. 272-277, 2017. doi: 10.1016/j.tiv.2017.04.022.

EU. European Union Risk Assessment Report. **Bisphenol A**, CAS Nº:80-05-7. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission Joint Research Centre, 3rd Priority List, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2011. Acesso em: 14 dez 2021. Disponível em:< http://www.oehha.org/prop65/cnrn_notices/state_listing/data_callin/pdf/EU_bisphenolareport325.pdf>

EVANS, A.M.; FORNASINI, G. **Pharmacokinetics of L-carnitine**. *Clin Pharmacokinet*, v. 42, n. 11, p. 941-967, 2003. doi: 10.2165/00003088-200342110-00002.

FELIN, F.D. et al. **Amazonian guarana- and açai-conjugated extracts improve scratched fibroblast healing and *Eisenia fetida* surgical tail amputation by modulating oxidative metabolism**. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2022, n. 3094362, 2022. doi: 10.1155/2022/3094362.

FERNANDEZ, S. V. et al. **Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure**. *Int J Oncol*, v. 41, n.1, p. 369-377, 2012. doi: 10.3892/ijo.2012.1444.

FIELDING, R. et al. **L-carnitine supplementation in recovery after exercise**. *Nutrients*, Switzerland, v. 10, n. 3, p.349, 2018. doi: 10.3390/nu10030349

FLANAGAN, J. L. et al. **Role of carnitine in disease**. *Nutr Metab (Lond)*, v. 16, n. 30, p. 30, 2010. doi: 10.1186/1743-7075-7-30.

FLEISCH, A. F. et al. **Bisphenol A and related compounds in dental materials**. *Pediatrics*, v. 126, n. 4, p. 760-768, 2010. doi: 10.1542/peds.2009-2693.

FLINT, S. et al. **Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective**. *J Environ Manage*, v. 15, n. 104, p. 19-34, 2012. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.03.021.

FREIRE, C. et al. **Concentrations of bisphenol A and parabens in socks for infants and young children in Spain and their hormone-like activities**. *Environ Int*, v. 2019, n. 127, p. 592-600, 2019. doi: 10.1016/j.envint.2019.04.013. Epub 2019 Apr 12.

FUKUI M. et al. **Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo***. *Eur J Cancer*, v. 46, p. 1882–1891, 2010. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.004.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. **Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier**. *Nature Reviews. Drug. Discovery*, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016. doi: 10.1038/nrd.2016.39.

FURMAN, D. et al. **Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span.** Nat. Med, v. 25, p.1822–1832, 2019. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0.

GALKINA, S.I. et al. **Nitric oxide in life and death of neutrophils.** Curr. Med. Chem, v.26, n.31, p.5764–5780, 2019. doi:10.2174/0929867326666181213093152

GAO, Y. et al. **Combined subacute toxicity of copper and antiparasitic albendazole to the earthworm (*Eisenia fetida*).** Environ Sci Pollut Res Int, v. 23, n.5, p. 4387- 4396, 2016. doi: 10.1007/s11356-015-5979-0.

GARCÍA-AREVALO, M. et al. **Exposure to bisphenol-A during pregnancy partially mimics the effects of a high-fat diet altering glucose homeostasis and gene expression in adult male mice.** PLoS One, v. 9, n. 6, p. 1-13, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0100214.

GASSMAN, N.R. et al. **Bisphenol a promotes cell survival following oxidative DNA damage in mouse fibroblasts.** PLoS One, v. 10, n. 2, p. 1-14, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0118819.

GASSMAN, N.R. **Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects.** Environ Mol Mutagen, v. 58, n.2, p. 60-71, 2017. doi: 10.1002/em.22072.

GEENS, T. et al. **A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A.** Food Chem Toxicol, v. 50, n. 10, p. 3725-3740, 2012. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.059.

GENUIS, J. S. et al. **Human excretion of bisphenol A: blood, urine, and sweat (BUS) study.** J Environ Public Health, v. 2012, n. 185731, 2012. doi: 10.1155/2012/185731

GORE, F.; FAWELL, J.; BARTRAM, J. **Too much or too little? A review of the conundrum of selenium.** J Water Health, v. 8, n.3, p. 405-416, 2010. doi: 10.2166/wh.2009.060.

GRAHAM, T. W. **Trace Element Deficiencies in Cattle Beef Cattle Nutrition.** Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 7, n.1, p. 153-215, 1991. doi.org: 10.1016/S0749-0720(15)30816-1

HACK, B et al. **Effect of guarana (*Paullinia cupana*) on cognitive performance: a systematic review and meta-analysis.** Nutrients, v.15, n.2, p. 434, 2023. doi: 10.3390/nu15020434.

HARIHARAN, S.; DHARMARAJ, S. **Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation.** Inflammopharmacology, Switzerland, v. 28, n. 3, p. 667- 695, 2020. doi: 10.1007/s10787-020-00690-x.

HATHCOCK, J.N.; SHAO, A. **Risk assessment for carnitine.** Regul Toxicol Pharmacol, v. 46, n.1, p. 23 – 28, 2006. doi: 10.1016/j.yrtph.2006.06.007.

HENMAN, A. R. **Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): Ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin.** Journal of Ethnopharmacology, v.6, n.3, p. 311–338, 1982. doi: 10.1016/0378-8741(82)90054-X

HOMA, J. **Earthworm coelomocyte extracellular traps: Structural and functional similarities with neutrophil NETs.** Cell Tissue, v.371, n. 3, p. 407–414, 2018. doi: 10.1007/s00441-018-2787-0

HOMA, J. et al. **Conservative mechanisms of extracellular trap formation by Annelida *Eisenia andrei*: Serine protease activity requirement.** PLOS ONE, v. 11, n. e0159031, p. 1-25, 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0159031

HOMA, J. et al. **Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*.** J. Comp. Physiol, v. 183, n.3, p. 313–322. doi: 10.1007/s00360-012-0710-7.

HU, W. et al. **Food sources of selenium and its relationship with chronic diseases.** Nutrients, Switzerland, v. 13, n. 5, p. 1739, 2021. doi: 10.3390/nu13051739.

HUANG, C. et al. **Role of biochar and *Eisenia fetida* on metal bioavailability and biochar effects on earthworm fitness.** Environ Pollut, v. 263, n. 114586, p. 1-8, 2020. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114586.

HUANG, F. et al. **Bisphenol A exhibits cytotoxic or genotoxic potential via oxidative stress-associated mitochondrial apoptotic pathway in murine macrophages.** Food Chem Toxicol, v. 122, p. 215-224, 2018. doi: 10.1016/j.fct.2018.09.078.

HUSSAIN, I. et al. **Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer.** Biochim Biophys Acta, v.1849, n. 6, p. 697-708. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.02.003.

IRIBARNE-DURÁN, L. M. et al. **Presence of Bisphenol A and Parabens in a Neonatal Intensive Care Unit: An Exploratory Study of Potential Sources of Exposure.** Environ Health Perspect, v. 127, n. 11, p. 1-13, 2019. doi: 10.1289/EHP5564.

JALAL, N. et al. **Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic.** Toxicol. Rep, v. 5, n. 2018, p. 76–84, 2018. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.12.013

JENTZSCH, A.M. et al. **Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids.** Free Radic. Biol. Med, v. 20, p. 251–256, 1996. doi: 10.1016/0891-5849(95)02043-8.

JUNG, I.E.D. et al. **Superoxide-anion triggers impairments of immune efficiency and stress response behaviors of *Eisenia fetida* earthworms.** Chemosphere, v. 269, n. 128712, p. 1-52, 2021. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128712

KAUPPINEN, A. et al. **Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells--implications for age-related macular degeneration (AMD).** Immunol Lett, v. 147, n. 1-2, p. 29-33, 2012. doi: 10.1016/j.imlet.2012.05.005.

KAUR, S. et al. **Selenium attenuates bisphenol A incurred damage and apoptosis in mice testes by regulating mitogen-activated protein kinase signalling.** Andrologia, v. 53, n. 3, p. 13975, 2021. doi: 10.1111/and.13975.

KE, Z. et al. **Bisphenol A Exposure May Induce Hepatic Lipid Accumulation via Reprogramming the DNA Methylation Patterns of Genes Involved in Lipid Metabolism.** Sci Rep, v. 9, n. 6, p. 1- 13, 2016. doi: 10.1038/srep31331.

KELEL, E. et al. **Effect of chronic L-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of adult Wistar rats.** Food and Chemical Toxicology, v. 134, n. 110851, p.1-7, 2019. doi:10.1016/j.fct.2019.110851

KHALAF, A. A. et al. **Protective effects of selenium and nano-selenium on bisphenol-induced reproductive toxicity in male rats.** Hum Exp Toxicol, v. 38, n. 4, p. 398 – 408, 2019. doi: 10.1177/0960327118816134

KIELISZEK, M. **Selenium–fascinating microelement, properties and sources in food.** Molecules, Switzerland, v. 24, n. 7, 1298, 2019. doi: 10.3390/molecules24071298

KIM, D.H., EWBANK, J.J. **Signaling in the innate immune response.** WormBook, v. 2018, p.1–35, 2018. doi: 10.1895/wormbook.1.83.2.

KLEIN, L. S.; FLANAGAN, K. L. **Sex differences in immune responses.** Nat Rev Immunol, v.16,n.10, p. 626-638, 2016. doi: 10.1038/nri.2016.90.

KLINGE, C. M. **Estrogen Regulation of MicroRNA Expression.** Curr Genomics, v. 10, n.3, p. 169-183, 2009. doi: 10.2174/138920209788185289.

KNOTTNERUS, S.J.G. et al. **Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle.** Rev Endocr Metab Disord, v.19, n.1, p. 93-106, 2018. doi: 10.1007/s11154-018-9448-1.

KOBER, H. et al. **Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced liver damage in rats.** Drug Chem Toxicol, v. 39, n.1, p. 48-52, 2016; doi: 10.3109/01480545.2015.1020546.

KOJIMA, H. et al. **Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors.** *Toxicology*, v. 1, n. 413, p. 48-55, 2019. doi: 10.1016/j.tox.2018.12.001.

KREWER, C. C. et al. **Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols.** *European Food Research and Technology*, Germany, v. 239, p. 49-57, 2014. doi: 10.1007/s00217-014-2182-3

KUAN, Y. et al. **Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF κ B activation via PI3K/Akt pathway.** *Food Chem Toxicol*, v. 50, n. 11, p. 4003-4009, 2012. doi:10.1016/j.fct.2012.08.019.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J.N.; STRAUS, S.K. **Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo.** *Biomolecules*, v. 8, n.1, p. 4, 2018. doi: 10.3390/biom8010004.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. **Regulation of metabolism by the innate immune system.** *Nature Reviews Endocrinology*, v. 12, n. 1, p.15- 28, 2015. doi: 10.1038/nrendo.2015.189.

LAPPIN, T.R.J. et al. **HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms.** *Ulster Med J*, v. 75, n.1, p. 23-31, 2006.

LEVINE, R.L. et al. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** *Methods Enzymol*, v.186, p. 464–478, 1990. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-h.

LI, G. et al. **F0 maternal BPA exposure induced glucose intolerance of F2 generation through DNA methylation change in Gck.** *Toxicol Lett*, v. 117, n.3, p. 192-199, 2014. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.04.012

LI, M. et al. **L-carnitine attenuates TGF- β 1-induced EMT in retinal pigment epithelial cells via a PPAR γ -dependent mechanism.** *Int J Mol Med*, v. 2021, n.47, p. 110, 2021. doi:10.3892/ijmm.2021.4943.

LI, Q. et al. **Chronic Exposure to Bisphenol A Affects Uterine Function During Early Pregnancy in Mice.** *Endocrinology*, v. 157, n. 5, p. 1764-1774, 2016. doi: 10.1210/en.2015-2031.

LIANG, X. et al. **Bisphenol A and several derivatives exert neural toxicity in human neuron-like cells by decreasing neurite length.** *Food Chem Toxicol*, v. 135, n. 111015, p.1-12, 2020. doi: 10.1016/j.fct.2019.111015.

LIU, J; MARTIN, W. J. Prolonged **Exposure to Bisphenol A from Single Dermal Contact Events**. Environ Sci Technol, v. 51, n.17, p. 9940-9949, 2017. doi: 10.1021/acs.est.7b03093.

LIU, S. et al. **Identification of novel long non-coding RNAs involved in bisphenol A induced immunotoxicity in fish primary macrophages**. Fish Shellfish Immunol, v.100, p. 152-160, 2020. doi: 10.1016/j.fsi.2020.03.006.

LIU, Y et al. **Coenzyme Q10 ameliorates BPA-induced apoptosis by regulating autophagy-related lysosomal pathways**. Ecotoxicol Environ Saf, v. 221, n. 112450, 2021. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112450.

LIU, Y. et al. **Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A**. Biochem Biophys Res Commun, v. 51, n. 4, p. 592-598, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.031.

LOMBÓ, M. et al. **Cardiogenesis impairment promoted by bisphenol A exposure is successfully counteracted by epigallocatechin gallate**. Environ Pollut, v. 246, p. 1008-1019, 2019. doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.004.

LU, X. et al. **Bisphenol A promotes macrophage proinflammatory subtype polarization via upregulation of IRF5 expression in vitro**. Toxicol In Vitro, v.60, p. 97-106, 2019. doi: 10.1016/j.tiv.2019.05.013.

MA, Q. **Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity** Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 2015, n. 53, p. 401-426, 2013. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.

MA, Y. et al. **The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms**. Environ. Res, v.1 76, n.108575, p. 1-17, 2019. doi: 10.1016/j.envres.2019.108575.

MACHADO, K.N. et al. **A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana Kunth.*)** Food Chemistry, v. 15,n. 239, p. 180-188, 2018. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.089.

MALLO, M. **Reassessing the Role of Hox Genes during Vertebrate Development and Evolution**. Trends Genet, v. 34, n.3, p. 209-217, 2018.

MANFO, F. P. T. et al. **Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function**. Rev Environ Contam Toxicol, v. 2014, n. 228, p. 57-82, 2014. doi: 10.1007/978-3-319-01619-1_3.

MÁRQUEZ-LÁZARO, J. et al. **Fluoroquinolone antibiotics and organophosphate pesticides induce carbonylation on *Eisenia fetida* muscle proteins**. Sci Total Environ, v. 758, n. 143954, p. 1-9, 2021. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143954.

MASTRODONATO, M. et al. **Histochemical and ultrastructural analysis of the epidermal gland cells of *Branchiomma luctuosum* (Polychaeta, Sabellidae)**.

Invertebrate Biology, v.124, n.4, p. 303-309, 2005. doi:10.1111/j.1744-7410.2005.00028.x

MEHDI, Y. et al. **Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions**. Molecules, v.18, n.3, p. 3292-3311, 2013. doi: 10.3390/molecules18033292

MELONE, M.A.B et al. **The carnitine system and cancer metabolic plasticity**. Cell Death Dis, v. 2018, n.9, p.1–12, 2018. doi: 10.1038/s41419-018-0313-7.

MICHAŁOWICZ, J. **Bisphenol A-sources, toxicity and biotransformation**. Environ Toxicol Pharmacol, v.37, n.2, p.738-58, 2014. doi: 10.1016/j.etap.2014.02.003. Epub 2014 Feb 8.

MIDORO-HORIUTI, T. et al. **Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups**. Environ Health Perspect, v.118, n. 2, p. 273-277, 2010. doi: 10.1289/ehp.0901259.

MINCARELLI, L. et al. **Evaluation of gene expression of different molecular biomarkers of stress response as an effect of copper exposure on the earthworm *Eisenia andrei***. Ecotoxicology, v.28, n.8, p. 938–948, 2019. doi: 10.1007/s10646-019-02093-3.

MOLINA-MOLINA, J. M. et al. **Determination of bisphenol A and bisphenol S concentrations and assessment of estrogen- and anti-androgen-like activities in thermal paper receipts from Brazil, France, and Spain**. Environ Res, v. 170, p. 406-415, 2019. doi: 10.1016/j.envres.2018.12.046.

MOON, M. K. **Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin resistance**. J Endocrinol, v. 226, n. 1, p. 35-42, 2015. doi: 10.1530/JOE-14-0714

MOOS, W.H. et al. **Treatment and prevention of pathological mitochondrial dysfunction in retinal degeneration and in photoreceptor injury**. Biochem Pharmacol, v.203, n.115168, 2022. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115168.

MORABITO, C. et al. **Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach**. Free Radic. Biol. Med, v. 48, p. 579–589, 2010. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.005.

MORGAN, M. K. et al. **Distribution, variability, and predictors of urinary bisphenol A levels in 50 North Carolina adults over a six-week monitoring period**. Environ Int, v. 2018, n. 112, p. 85-99, 2018. doi: 10.1016/j.envint.2017.12.014. Epub 2017 Dec 18.

MURATA, M.; KANG, J. H. **Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways.** *Biotechnol Adv*, v. 36, n.1, p. 311-327, 2018. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.002.

MUSTIELES, V. et al. **Bisphenol A and its analogues: A comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring.** *Environment International*, v.144, n.105811, p. 1-22, 2020. doi: 10.1016/j.envint.2020.10581.1

NAKAGAWA, Y.; TAYAMA, S. **Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes.** *Arch Toxicol*, v. 74, n.2, p. 99-105, 2000. doi: 10.1007/s002040050659.
Nature Reviews Immunology, v.16, p. 626–638, 2016. doi: 10.1016/j.tig.2017.11.007.

NAKAMURA, M. et al. **Bisphenol A induces Nrf2-dependent drug-metabolizing enzymes through nitrosylation of Keap1.** *Drug Metab Pharmacokinet*, v.33, n.4, p. 194-202, 2018. doi: 10.1016/j.dmpk.2018.04.003.

NAVARRO - PACHECO, N.I. et al. ***In vitro* interactions of TiO₂ Nanoparticles with Earthworm Coelomocytes: Immunotoxicity Assessment.** *Nanomaterials (Basel)*, v. 11, n. 1, p. 250, 2021. doi: 10.3390/nano11010250.

NOVO, M. et al. **Endocrine disruptors in soil: Effects of bisphenol A on gene expression of the earthworm *Eisenia fetida*.** *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 15, n.150, p. 159-167, 2018. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.030.

O'BRIEN, E.; DOLINOY, D.C.; MANCUSO, P. **Perinatal Bisphenol A Exposures Increase Production of Pro-inflammatory Mediators in Bone Marrow-derived Mast Cells of Adult Mice.** *J Immunotoxicol*, v. 11, n.3, p. 205-212, 2014. doi: 10.3109/1547691X.2013.822036

OBENG, E. **Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review.** *Braz J Biol*, v. 81, n.4, p. 1133-1143, 2021. doi: 10.1590/1519-6984.228437.

OECD (2016), **Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.

OLCUM, M. et al. **Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis.** *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, v. 119, p. 247-308, 2019.

OLIVEIRA, K.M.G. et al. **Single and mixture toxicity evaluation of three phenolic compounds to the terrestrial ecosystem.** *J. Environ. Manage*, v. 296, n. 113226, p. 1-10, 2021. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113226.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B. **Cell death mechanisms and their implications in toxicology.** *Toxicol Sci*, v. 119, n. 1, p. 3-19, 2011. doi:10.1093/toxsci/kfq268.

ÖZKAYA, D et al. **Involvement of TRPM2 channel on hypoxia-induced oxidative injury, inflammation, and cell death in retinal pigment epithelial cells: modulator action of selenium nanoparticles.** *Biol Trace Elem Res*, v.199, n.4, p.1356-1369, 2021. doi: 10.1007/s12011-020-02556-3.

PATRICK, M. et al. **Safety of guarana seed as a dietary ingredient: a review.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry, United States*, v. 67, n. 41, p. 11281-11287, 2019. doi: 10.1021/acs.jafc.9b03781

PERL, A. **Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lúpus erythematosus.** *Nature Reviews Rheumatology*, v. 9, n. 11, p. 674–686, 2013. doi: 10.1038/nrrheum.2013.147.

PHRAKONKHAM, P. et al. **Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis.** *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 110, n. 1-2, p. 95-103, 2008. doi:10.1016/j.jsbmb.2008.02.006

PORRECA, I. et al. **"Stockpile" of Slight Transcriptomic Changes Determines the Indirect Genotoxicity of Low-Dose BPA in Thyroid Cells.** *PLoS One*, v. 11, n.3, p. 1-19, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0151618.

PTAK, A.; GREGORASZCZUK, E. L. **Bisphenol A induces leptin receptor expression, creating more binding sites for leptin, and activates the JAK/Stat, MAPK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways in human ovarian cancer cell.** *Toxicol Lett*, v. 210, n. 3, p. 332-337, 2012. doi:10.1016/j.toxlet.2012.02.003.

REPPETO, G. et al. **Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity.** *Nature Protocols*, v.3, n.7, p. 1125-1131, 2008. doi: 10.1038/nprot.2008.75.

RIBAS, G. S. et al. **L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders.** *Gene*, v. 533, n.2, p. 469-476, 2013. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.017.

ROCHESTER, J. R. **Bisphenol A and human health: a review of the literature.** *Reprod Toxicol*, v. 2013, n. 42, p. 135-155, 2013. doi:10.1016/j.reprotox.2013.08.008.

ROGERS, J. A.; METZ, L.; YONG, V. W. **Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms.** *Mol Immunol*, v. 53, n.4, p. 421-430, 2013. doi: 10.1016/j.molimm.2012.09.013.

ROGGIA, I. et al. **Protective effect of guarana-loaded liposomes on hemolytic activity.** *Colloids Surf B Biointerfaces*, v.187, n. 110636, p.1-10, 2020. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110636

ROITT, I.M. et al. **Fundamentos de Imunologia.** 12. ed. Guanabara Koogan, 2014.

- ROUBALOVÁ, R. et al. **The role of earthworm defense mechanisms in ecotoxicity studies.** Archives, v. 12, n.1, p. 203-313, 2015.
- RUBERTO, S. et al. **Bisphenols induce human genomic damage and modulate HERVs/env expression.** Environ Mol Mutagen, v. 63, n.6, p.275-285, 2022. doi: 10.1002/em.22499.
- RUBIN, B. S. **Perinatal BPA exposure alters body weight and composition in a dose specific and sex specific manner: The addition of peripubertal exposure exacerbates adverse effects in female mice.** Reprod Toxicol, v. 2017, n. 68, p. 130-144, 2017. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.07.020
- SAHEBARI, M.; REZAEYAZDI, Z.; KHODASHAHI, M. **Selenium and Autoimmune Diseases: A Review Article.** Correntes Rheumatology Reviews, v.15, n. 2, p. 123 - 134, 2018. doi:10.2174/1573397114666181016112342
- SANTOVITO, A et al. **Clastogenic effects of bisphenol A on human cultured lymphocytes.** Hum Exp Toxicol, v.3, n.1, p. 69-77, 2018. doi: 10.1177/0960327117693069.
- SHANG, R.; SUN Z.; LI, H. **Effective dosing of L-carnitine in the secondary prevention of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis.** BMC Cardiovasc Disord, v. 14, n. 88, 2014. doi: 10.1186/1471-2261-14-88.
- SHARMA, S. et al. **Potentiality of earthworms for waste management and in other uses—A review.** The Journal of American Science, v. 1, n. 1, p. 4- 16, 2005.
- SHINJE, M. et al. **Urinary bisphenol A concentrations and the risk of obesity in Korean adults.** Sci Rep, v. 11, n. 1, p. 1603, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-80980-8.
- SINGH, S.; LI, S.S. **Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates.** Int J Mol Sci, v. 13, n.8, p. 10143-10153, 2012. doi: 10.3390/ijms130810143.
- SIVAKUMAR, S. **Effects of metals on earthworm life cycles: a review.** Environ Monit Assess,v.187, n. 8, p. 1-16, 2015. doi: 10.1007/s10661-015-4742-9.
- ŠKANTA, F. et al. **Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm.** Dev. Comp. Immunol, v. 41, p.694–702, 2013. doi: 10.1016/j.dci.2013.08.009.
- SMITH, N.; ATROCH, A. L. (2010). **Guarana's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 7, n.3,p. 279– 282, 2010. doi: 10.1093/ecam/nem162
- SOMM, E. et al. **Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat.** Environ Health Perspect, v. 117, n. 10, p. 1549-1555, 2009. doi: 10.1289/ehp.11342.

- SONG, H. et al. **Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR α signals.** *Toxicol In Vitro*, v. 30, n. 1ptB, p. 521-528, 2015. doi: 10.1016/j.tiv.2015.09.009.
- SUTTLE, N.F. **Mineral Nutrition of Livestock**, 4th ed.; MPG Books Group: London, UK, 2010; p. 565.
- TARAFDAR, A. et al. **The hazardous threat of Bisphenol A: Toxicity, detection and remediation.** *J Hazard Mater*, v. 5, n.423, p., 2021. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127097.
- TEEGUARDEN, J. G. **Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women.** *Food Chem Toxicol*, v. 2016, n. 92, p. 129-42,2016. doi: 10.1016/j.fct.2016.03.023. Epub 2016 Mar 30.
- TEIXEIRA, C.F. et al., 2021. **Safety indicators of a novel multi supplement based on guarana, selenium, and L-carnitine: Evidence from human and red earthworm immune cells.** *Food Chem. Toxicol*, v. 150, n. 112066, p. 1-13, 2021. doi: 10.1016/j.fct.2021.112066.
- TIWARI, D. et al., 2012. **Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor.** *Mutat. Res*, v.743, n. 1-2, p.83–90. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.023.
- TORRES, E. A. F. S. et al. **Effects of the consumption of guarana on human health: A narrative review.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, United States, v. 21, n. 1, p. 272-295, 2022. doi: 10.1111/1541-4337.12862
- TROHA, K.; BUCHON, N. **Methods for the study of innate immunity in *Drosophila melanogaster*.** *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol*, v.8, n. e344, p. 1-25, 2019. doi: 10.1002/wdev.344.
- UPADHYAY, S; DIXIT, M. **Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, n.504253, p. 1- 15, 2015. doi: 10.1155/2015/504253
- VANDENBERG, L. N. et al. **The male mammary gland: a target for the xenoestrogen bisphenol A.** *Reprod Toxicol*, v. 2013, n. 37, p. 15-23, 2013. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.01.002.
- VANDENBERG, L. N. et al. **Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A.** *Cien Saude Colet*, v. 17, n. 2, p. 407-434, 2012. doi: 10.1590/s1413-81232012000200015.
- VANDENBERG, L.N. et al. **Human Exposure to Bisphenol A (BPA).** *Reproductive Toxicology*, v. 24, p. 139-177, 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>

VARELA-CHINCHILLA, C.D. et al. **Biochemistry, superoxides**. Feb 16, in: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (Florida). PMID. Free Books & Documents. Review. 32310442, 2021.

VERMES, I. et al. **A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V**. J Immunol Methods, v. 184, n.1, p. 39-51, 1995. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-i.

VIJAY, K. **Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future**. Int. Immunopharmacol, v. 59, p.391–412, 2018. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.002.

VITALE, G.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C. **Oxidative stress and the ageing endocrine system**. Nature Reviews Endocrinology, v. 9, p. 228-240, 2013.

VON GOETZ, N. et al. **Including non-dietary sources into an exposure assessment of the European Food Safety Authority: The challenge of multi-sector chemicals such as Bisphenol A**. Regul Toxicol Pharmacol, v. 2017, n. 85, p. 70-78, 2017. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.02.004. Epub 2017 Feb

WANG, C. et al. **Function of mucilaginous secretions in the antibacterial immunity system of Eisenia fetida**. Pedobiologia, v.54, p. 57-62, 2011. doi: 10.1016/j.pedobi.2011.07.012.

WANG, C. et al. **Low concentration of BPA induces mice spermatocytes apoptosis via GPR30**. Oncotarget, v. 8, n. 30, p. 49005-49015, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.16923.

WANG, H. et al. **Bisphenol-A exposure induced neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells**. Environ Int, v.127, p.324-332, 2019. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.059.

WANG, K.; ZHAO, Z.; JIA, W. **Bisphenol A induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner**. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 117, n. 109182, p. 1-8, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109182.

WANG, X. et al., 2018. **iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the earthworm Eisenia fetida response to Escherichia coli O157:H7**. Ecotoxicol. Environ. Saf, v.160, p. 60–66. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.007.

WATANABE, H. et al. **Triphenyltin enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells**. Biochem Biophys Res Commun, v. 306, n.1, p. 26-31. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00914-8.

WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. **Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system**. Virulence, v. 1, n. 5, p. 440–464, 2010. doi:10.4161/viru.1.5.12983.

XIAOYUN, Y. et al. **Potential external contamination with bisphenol A and other ubiquitous organic environmental chemicals during biomonitoring analysis: an elusive laboratory challenge.** *Environ Health Perspect*, v. 1221, n. 3, p. 283-286, 2013. doi: 10.1289/ehp.1206093.

XU, D. et al. **The Role of Nrf2 in Liver Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches.** *Front Pharmacol*, v. 9, n. 1428, p. 1-7, 2019. doi: 10.3389/fphar.2018.01428.

XU, J. et al. **Deficiency in Nrf2 transcription factor decreases adipose tissue mass and hepatic lipid accumulation in leptin-deficient mice.** *Obesity*, v. 23, n. 2, p. 335-344, 2015. doi: 10.1002/oby.20929.

XU, Y et al. **L-carnitine treatment of insulin resistance: A systematic review and meta-analysis.** *Adv. Clin. Exper. Med*, v. 2017, n. 26, p.333–338, 2017. doi: 10.17219/acem/61609.

YALCIN, B. E. et al. **Bisphenol A sulfonation is impaired in metabolic and liver disease.** *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 1, n. 292, p. 75-84, 2016. doi: 10.1016/j.taap.2015.12.009.

YAMASHITA, U. et al. **Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro.** *J UOEH*, v. 27, n.1, p. 1-10, 2005. doi:10.7888/juoeh.27.1_1

YANG, M. et al. **The in vitro immune modulatory effect of bisphenol A on fish macrophages via estrogen receptor α and nuclear factor- κ B signaling.** *Environ Sci Technol*, v. 49, n.3, p. 1888-1895, 2015. doi: 10.1021/es505163v

YANG, X.; LI, Y.; WANG, X. **Effects of ciprofloxacin exposure on the earthworm *Eisenia fetida*.** *Environ Pollut*, v. 262, n. 114287, p. 1-9, 2020. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114287.

YAO, X. et al. **Toxicity of thifluzamide doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109880. in earthworm (*Eisenia fetida*).** *Ecotoxicol Environ Saf*, v.188, n. 109880, p. 1-10, 2020. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109880.

YONEKURA, L. et al. **Bioavailability of catechins from guaraná (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects.** *Food & Function*, v. 2016, n.7, p. 2970–2978, 2016. doi: 10.1039/c6fo00513f

YU, H.; LIU, Y. **Impact of extended and combined exposure of bisphenol compounds on their chromosome-damaging effect—increased potency and shifted mode of action.** *Environ Sci Technol*, v.57, n.1, p.498-508, 2023. doi.org: 10.1021/acs.est.2c06064.

ZAKI, M.S.A. et al. **Role of dietary selenium in alleviating bisphenol A toxicity of liver albino rats: Histological, ultrastructural, and biomarker assessments.** J Food Biochem, v. 45, n. 5, p. 13725, 2021. doi: 10.1111/jfbc.13725.

ZHANG, D. et al. **Earthworm epidermal mucus: Rheological behavior reveals drag-reducing characteristics in soil.** Soil and Tillage Research, v. 158, p. 57-66, 2015. doi: 10.1016/j.still.2015.12.001

ZHANG, D. **L-carnitine regulated Nrf2/Keap1 activation in vitro and in vivo and protected oxidized fish oil-induced inflammation response by inhibiting the NF- κ B signaling pathway in *Rhynchocypris lagowski* Dybowski.** Fish & Shellfish Immunology, v. 93, p.1100-1110, 2019. doi:10.1016/j.fsi.2019.08.041

ZHU, L. et al. **BPA's transgenerational disturbance to transcription of ovarian steroidogenic genes in rare minnow *Gobiocypris rarus* via DNA and histone methylation.** Sci Total Environ, v. 25, n. 762, p. 1-45, 2021. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143055.

ANEXO A – ACEITE PARA A PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 2

30/04/2024, 11:02

Osmarin Turra et al. | Bisphenol A-induced cyto-genotoxicity on retinal pigment epithelial cells is differentially modulated by a...

Notificações

x

[BJB] Decisão editorial

2024-04-30 08:07 AM

Bárbara Osmarin Turra , Nathália Cardoso de Afonso Bonotto , Cibele Ferreira Teixeira , Maria Eduarda Chelotti , Joana Rosa Rodrigues , Moisés Henrique Mastella , Verônica Farina Azzolin , Euler Esteves Ribeiro , Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Chegamos a uma decisão sobre a sua submissão do artigo intitulado "Bisphenol A-induced cyto-genotoxicity on retinal pigment epithelial cells is differentially modulated by a multi-supplement containing guarana, selenium, and L-carnitine: Bisphenol A and Multi-supplement in Retinal Cells" ao Brazilian Journal of Biology.

A decisão é: ACEITO

Brazilian Journal of Biology

Rua Bento Carlos, 750

13560-660 São Carlos / SP - Brasil