



EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO BISFENOL NAS CÉLULAS DA TIREOIDE HUMANA

Palavras-Chave: CÂNCER DE TIREOIDE, DESREGULADOR ENDOCRINO, BISFENOL A

Autores(as):

**Julia Raiane Galvão Pereira, FCM-UNICAMP
Sabrina Matsuda, FCM-UNICAMP
Sabrina Luiza Paz de Souza, FCM- UNICAMP
Me. Elisângela de Souza Teixeira, FCM-UNICAMP
Prof^ª. Dr^ª. Laura Sterian Ward (orientadora), FCM-UNICAMP**

INTRODUÇÃO:

A incidência de câncer de tireoide (CT) aumentou significativamente nas últimas décadas em todo o mundo, inclusive em países em desenvolvimento (1). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 16.660 novos casos anuais no Brasil para o triênio 2023-2025 (2). Aproximadamente 90% dos tipos de câncer estão associados a fatores ambientais (biológicos, físicos e químicos) que interagem com as características genéticas de cada indivíduo (3-4). Nosso grupo tem contribuído para o entendimento dessa interação, demonstrando a importância dos fatores ambientais no câncer de tireoide (5-7). A exposição a desreguladores endócrinos (DEs) pode alterar a função da tireoide e aumentar o risco de vários eventos adversos à saúde, incluindo distúrbios da tireoide e câncer (8-10).

O bisfenol A (BPA, 2,2-bis(4-hidroxifenil) propano) é um xenoestrogênio, um composto sintético, amplamente utilizado na produção de plásticos, como policarbonato, poliéster e resinas epóxi (11). É usado em uma ampla variedade de produtos como garrafas, revestimentos de latas de bebidas, lentes oftálmicas, suprimentos médicos e odontológicos e tubulações de água (12). No Brasil, o uso do BPA é regulamentado pela ANVISA por meio da Resolução RDC 17/2008. Esta resolução estabelece como Limite de Migração Específica (LME) 0,6 mg de BPA por Kg de alimento, pois ele pode migrar em pequenas quantidades para alimentos e bebidas, fazendo com que os humanos e os animais sejam frequentemente expostos (11).

O BPA é um desregulador endócrino (DE). Uma particularidade dos DEs é que eles não seguem o paradigma toxicológico clássico de dose-resposta linear, que sugere que os efeitos aumentam com a dose, permitindo calcular uma dose "segura." No entanto, os DEs podem causar efeitos significativos mesmo em baixas concentrações, com respostas variáveis

dependendo da dose (13, 14). Portanto, é crucial determinar os efeitos dos DEs em diferentes concentrações, pois esses podem variar entre células normais e células com alterações genéticas. Nódulos de tireoide são comuns e frequentemente contêm várias alterações genéticas. (15). Assim, objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da exposição a baixas concentrações de BPA tanto em células normais como em células tumorais da tireoide.

METODOLOGIA:

Cultura celular e Exposição ao BPA

Os modelos experimentais utilizados foram três linhagens de tireoide humana: TPC-1 (carcinoma papilífero com translocação RET/PTC), BCPAP (mutação BRAF V600E), 8505c (carcinoma anaplásico de tireoide) e Nthy-ori 3-1 (células foliculares tireoidianas normais, como controle). As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina-Streptamicina e 250 mg/ml de fungizone, mantidas a 37°C com 5% de CO₂. As células foram plaqueadas e cultivadas por 24 horas antes dos ensaios para garantir boa aderência.

As linhagens celulares tireoidianas foram expostas ao BPA (CAS No: 80-05-7) (Sigma–Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Aproximadamente 5x10⁵ células/ml de meio de cultura foram incubadas com BPA em placa de 24 poços e expostas as concentrações finais de 0,1 a 1,0 µg/mL por períodos de 24 e 48 horas.

Análise de viabilidade e citotoxicidade celular

O ensaio por azul de tripan, foi utilizado para analisar a viabilidade celular. Células não viáveis absorvem o corante, enquanto células viáveis permanecem não coradas. As células foram cultivadas em triplicata em placas de 24 poços e expostas ao BPA. Após a exposição, 10 µl de suspensão celular foi misturado com 10 µl de azul de tripan 0,4%, e 10 µl da solução foi colocado em lâmina descartável para contagem usando o Countess® II FL. E o ensaio CCK-8 avaliou a citotoxicidade celular. Em uma placa de 96 poços, cerca de 5.000 células por poço foram pré-incubadas, após 24 horas foram expostas ao BPA. Após 24 e 48 horas de exposição, adicionou-se 10 µl de solução CCK-8 a cada poço e a placa foi incubada por 3 horas. Os resultados foram lidos com absorbância a 450 nm no leitor de microplacas ELx808.

Ensaio de migração e invasão em ensaio de lesão em monocamada

Para o ensaio de migração e invasão, as linhagens tireoidianas foram semeadas em placas de 24 poços (1,1x10⁶/poço) e incubadas por 24 horas. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 10 µl, foi realizada uma lesão horizontal em cada poço. O processo de

cicatrização de migração e invasão foi registrado com uma câmera acoplada ao Zeiss Axio Observer A1 nos tempos 0, 24 e 48 horas. As imagens de cada poço foram analisadas com o software ImageJ® para medir a distância das lesões em diferentes tempos. Os valores das distâncias em pixels foram utilizados para análises estatísticas. O ensaio foi realizado junto com células controle para comparações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Até o momento, foram concluídas as análises das linhagens Nthy-ori-3-1 e 8505-C. Os resultados das linhagens TPC1 e BCPAP estão em fase de análise estatística.

A dose de 1,0 µg/ml utilizada em nossos ensaios corresponde à dose máxima admitida como segura para humanos pela ANVISA considerando o Limite de Migração Específica (LME) 0,6 mg de bisfenol A por Kg de alimento.

A exposição ao BPA em diferentes linhagens de células da tireoide apresentou efeitos variados. Na linhagem Nthy-ori-3-1, doses de 0,8 e 0,4 µg/ml não afetaram significativamente a viabilidade celular pelo azul de tripan, após 24 horas, mas a dose de 1,0 µg/ml reduziu a viabilidade em quase 70%. Na linhagem 8505-C, a exposição por 24 horas a 1,0 µg/ml resultou em 60% de inviabilidade celular, e mais de 80% após 48 horas em todas as concentrações testadas, conforme demonstrado na figura 1-A.

Os testes de citotoxicidade com BPA mostraram que a linhagem Nthy-ori-3-1 é menos afetada do que a 8505-C. Após 24 horas com 1,0 µg/ml de BPA, 37% das células Nthy-ori-3-1 ainda estavam viáveis, enquanto a linhagem 8505-C apresentou 33% de viabilidade após 24 horas e 39% após 48 horas (Figura 1-B).

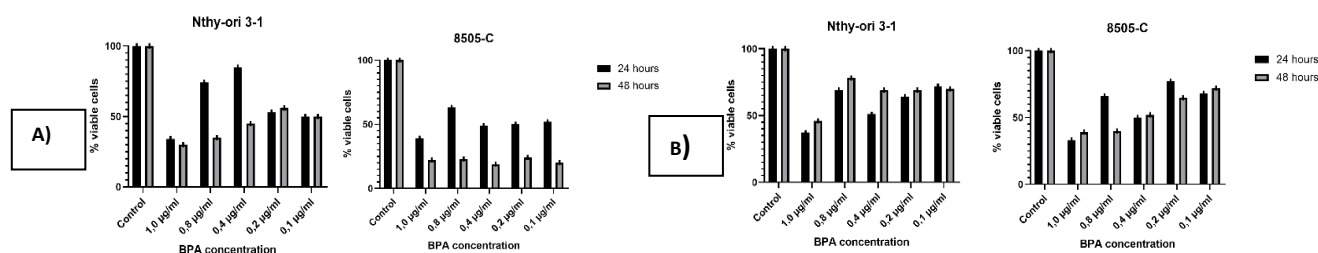


Figura 1: A) Efeitos do BPA na viabilidade celular utilizando azul de tripan. B) Citotoxicidade do BPA avaliada pelo ensaio CCK-8.

Além disso, os ensaios de invasão e migração mostraram que o tratamento com BPA aumentou a capacidade de migração da linhagem 8505-C nas doses de 0,8 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$ após 24 horas de exposição (Figura 2). Sugerimos que os efeitos pleiotrópicos do BPA sobre as células da tireoide, particularmente nas células derivadas de carcinomas anaplásicos, podem estar relacionados à incidência e às características clínicas do câncer de tireoide.

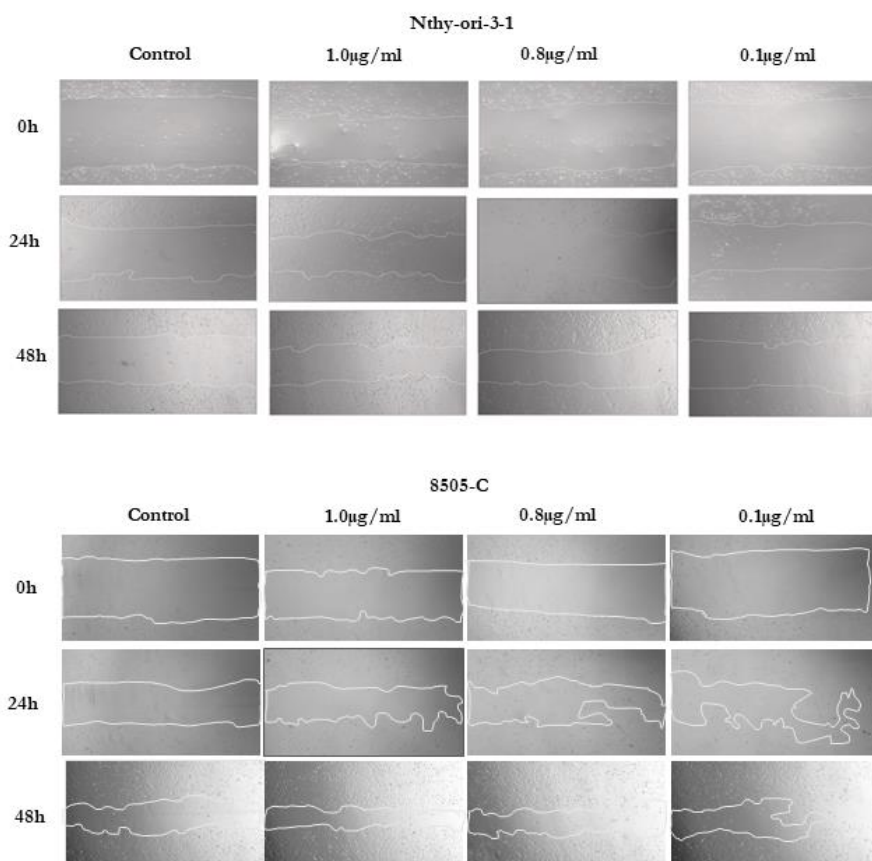


Figura 2: Efeitos do BPA na migração celular da linhagem Nthy-ori-3-1 e 8505-C. O tratamento com BPA aumentou significativamente a capacidade de migração celular.

CONCLUSÕES:

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade e migração indicam que o Bisfenol A (BPA) tem efeitos adversos significativos na viabilidade e capacidade invasiva das células da tireoide, variando conforme o tipo celular e a concentração de BPA. Esses resultados sugerem que o BPA pode influenciar o aparecimento e a progressão do câncer de tireoide, especialmente de carcinomas anaplásicos, destacando a necessidade de maior compreensão dos mecanismos envolvidos e consideração dos riscos ambientais e de saúde pública associados ao BPA.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Pentheroudakis G, Group EGW. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012
- 2-INCA. Estimativa 2024: Incidência de Câncer no Brasil. 2024.
- 3-. Peres f. Moreira, jc., and dubois, gs. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F., and MOREIRA, JC., orgs. *É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.
- 4-Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019.
- 5- Marcello MA, Malandrino P, Almeida JF, Martins MB, Cunha LL, Bufalo NE, et al. The influence of the environment on the development of thyroid tumors: a new appraisal. *Endocr Relat Cancer*. 2014.
- 6- Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer letters*. 2004.
- 7- Granja F, Morari EC, Assumpcao LV, Ward LS. GSTO polymorphism analysis in thyroid nodules suggest that GSTO1 variants do not influence the risk for malignancy. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation*. 2005;14(3):277-80.
- 8-Heindel JJ, Skalla LA, Joubert BR, Dilworth CH, Gray KA. Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology. *Reproductive toxicology*. 2017.
- 9.Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, Barcelo D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental research*. 2016.
- 10.Deichmann WB, Henschler D, Holmstedt B, Keil G. What is there that is not poison? A study of the Third Defense by Paracelsus. *Archives of toxicology*. 1986.
- 11-Ho SM, Rao R, To S, Schoch E, Tarapore P. Bisphenol A and its analogues disrupt centrosome cycle and microtubule dynamics in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017.
- 12- Pellerin E, Caneparo C, Chabaud S, Bolduc S, Pelletier M. Endocrine-disrupting effects of bisphenols on urological cancers. *Environ Res*. 2021.
- 13.Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2007.
- 14.Renaud L, Huff M, da Silveira WA, Angert M, Haas M, Hardiman G. Genome-Wide Analysis of Low Dose Bisphenol-A (BPA) Exposure in Human Prostate Cells. *Curr Genomics*. 2019.
15. Grussendorf M, Ruschenburg I, Brabant G. Malignancy rates in thyroid nodules: a long-term cohort study of 17,592 patients. *Eur Thyroid J*. 2022;11(4).