



## **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**

**Maria Eduarda de Ávila Leite, FCM-UNICAMP**

**Sabrina Matsuda, FCM-UNICAMP**

**Sabrina Luiza Paz de Souza, FCM- UNICAMP**

**Me. Larissa Teodoro Rabi, FCM- UNICAMP**

**Me. Elisângela de Souza Teixeira, FCM-UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 a ocorrência de 16.660 novos casos para cada ano do triênio 2023-2025 no Brasil (2). De fato, sugere-se que 90% de todos os tipos de câncer estejam associados a fatores ambientais (agentes biológicos, físicos e químicos) que interagem com as características herdadas e adquiridas de cada indivíduo (3-4). Nosso grupo vem contribuindo para o entendimento dessa interação com diversas publicações que demonstram que fatores ambientais são importantes também no câncer de tireoide (5-7). A exposição a certos produtos químicos, conhecidos como desreguladores endócrinos (DEs), alteram a função da tireoide e podem estar associados a um risco aumentado de vários eventos adversos à saúde, incluindo alterações no desenvolvimento, distúrbios da tireoide e vários tipos de câncer (8-10).

O bisfenol A (BPA, 2,2-bis(4-hidroxifenil) propano) é um xenoestrogênio, um composto sintético produzido pela reação entre dois fenóis e uma molécula de acetona, amplamente utilizado como precursor 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, aparelhos eletrônicos e elétricos, tubulações de água e alimentos à base de metal (12). No Brasil, o uso do BPA é regulamentado pela ANVISA por meio da Resolução RDC no 105/1999 e da Resolução RDC

17/2008. Esta resolução estabelece como Limite de Migração Específica (LME) 0,6 mg de bisfenol A por Kg de alimento, pois o BPA pode migrar em pequenas quantidades para alimentos e bebidas armazenados nesses materiais, fazendo com que os humanos e os animais sejam frequentemente expostos (11). No entanto, dentre as diversas particularidades dos DEs, a mais conhecida é que seus efeitos não obedecem ao paradigma toxicológico clássico da relação linear de dose-resposta. Esse paradigma clássico sustenta que um efeito será mais expressivo quanto maior for a dose de exposição, permitindo calcular a dose “segura” de exposição que não afetará a saúde humana e é com base nesse paradigma que as agências regulatórias calculam as doses máximas permitidas em produtos e alimentos. Entretanto, os DEs não obedecem ao paradigma toxicológico clássico da relação linear de dose-resposta. O sistema endócrino, em particular, responde a baixas concentrações de DEs e pode responder de maneiras distintas a diferentes concentrações (13, 14). Portanto, é imprescindível determinar os efeitos dessas substâncias em diferentes concentrações. Mais ainda, esses efeitos podem ser diferentes em células normais e em células que já possuem alterações genéticas. Sabemos que nódulos de tireoide são muito frequentes e podem albergar 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***

Os modelos experimentais utilizados foram três linhagens derivadas de tireoide humana: TPC-1, proveniente de carcinoma papilífero com translocação RET/PTC; BCPAP com mutação BRAF v600E; 8505c derivada de carcinoma anaplásico de tireoide e a Nthy-ori 3-1 que funcionou como um controle, já que se trata de uma linhagem derivada de células foliculares tireoidianas normais. As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina-Streptamicina e 250mg/ml de fungizone (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), sendo mantidas em estufa a 37°C, com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). As células foram plaqueadas e cultivadas por período de 24 horas antes de cada ensaio visando garantir uma boa aderência para início do tratamento.

### ***Exposição ao BPA***

As linhagens celulares tireoidianas foram expostas ao BPA (CAS No: 80-05-7) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Aproximadamente 5x10<sup>5</sup> 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 é um método amplamente utilizado para analisar a viabilidade celular. Células não viáveis perdem a integridade da membrana e absorvem o corante, enquanto células viáveis permanecem não coradas graças à membrana celular intacta. As células foram cultivadas em triplicata em placas de cultura de 24 poços ( $5 \times 10^5$ ) e expostas as concentrações de BPA por 24 e 48 horas. Após esta exposição, foram retirados 10  $\mu$ l de ressuspensão celular e adicionados em um microtubo contendo 10  $\mu$ l de Azul de Tripan 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e, desta solução, 10  $\mu$ l foi colocados em lâmina descartável para contagem de células utilizando o Countess® II FL (Thermo Fisher Scientific).

O ensaio CCK-8 foi utilizado para avaliar a citotoxicidade celular. Em uma placa de 96 poços, foram distribuídas cerca de 5.000 células/poço pré-incubadas por 24 horas. As células foram expostas as cinco concentrações de BPA por período de 24 e 48 horas. Depois da incubação, foi adicionado 10  $\mu$ l de solução CCK-8 em cada poço da placa que foi incubada por 3 horas. Em seguida, a placa foi analisada em um leitor de microplacas (ELx808, Biotek, Winooski, VT, USA) com absorvância a 450nm para leitura dos resultados.

### ***Ensaio de migração e invasão em ensaio de lesão em monocamada***

Os ensaios de migração e invasão celular são cruciais para entender processos fisiológicos e patológicos, como desenvolvimento embrionário, resposta imunológica, inflamação e tumorigênese. As linhagens tireoidianas foram semeadas em placas de 24 poços ( $1,1 \times 10^6$ /poço) e incubadas por 24 horas. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira estéril de 10  $\mu$ l, foi realizada uma lesão em linha na monocamada celular no centro de cada poço. O processo de cicatrização de invasão e migração 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. Cada imagem foi medida em três pontos diferentes, e 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  $\mu$ g/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  $\mu\text{g/ml}$  não afetaram significativamente a viabilidade celular pelo azul de tripan, após 24 horas, mas a dose de 1,0  $\mu\text{g/ml}$  reduziu a viabilidade em quase 70%. Na linhagem 8505-C, a exposição por 24 horas a 1,0  $\mu\text{g/ml}$  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 estudos de citotoxicidade do BPA foram avaliados pela capacidade das células vivas de converter o sal de tetrazólio (CCK-8) em um produto colorido, onde a quantidade de produto formado indica maior viabilidade celular e metabolismo ativo. Observou-se diferenças nas respostas entre as linhagens celulares e nos tempos de exposição ao BPA. As linhagens Nthy-ori-3-1 demonstrou ser menos afetada pelo BPA em comparação com a 8505-C. Na Nthy-ori-3-1, após 24 horas de exposição a uma dose de 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , cerca de 37% das células permaneceram viáveis. Já na linhagem 8505-C, os efeitos mostraram um padrão quase de dose-resposta, onde doses maiores resultaram em maior dano à viabilidade celular. Na dose de 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , a viabilidade celular foi de apenas 33% após 24 horas e 39% após 48 horas de exposição (Figura 1-B).

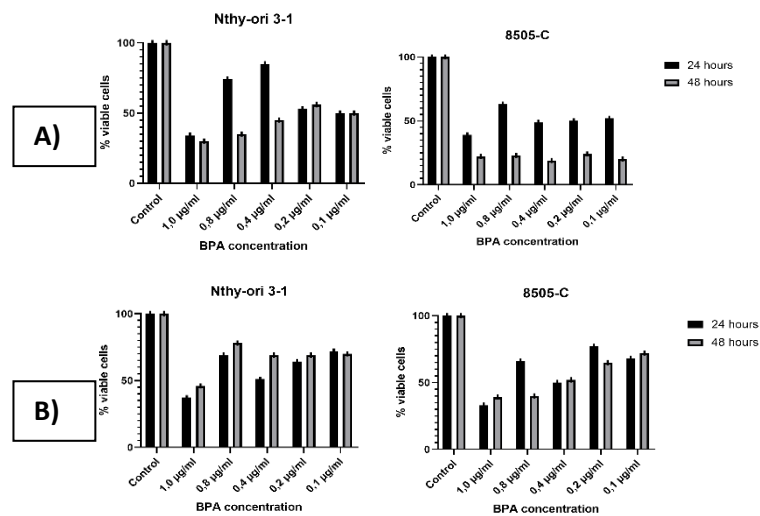


Figura 1: A) Efeitos do BPA na viabilidade celular utilizando azul de tripan. B) Citotoxicidade do BPA avaliada pelo ensaio CCK-8.

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.

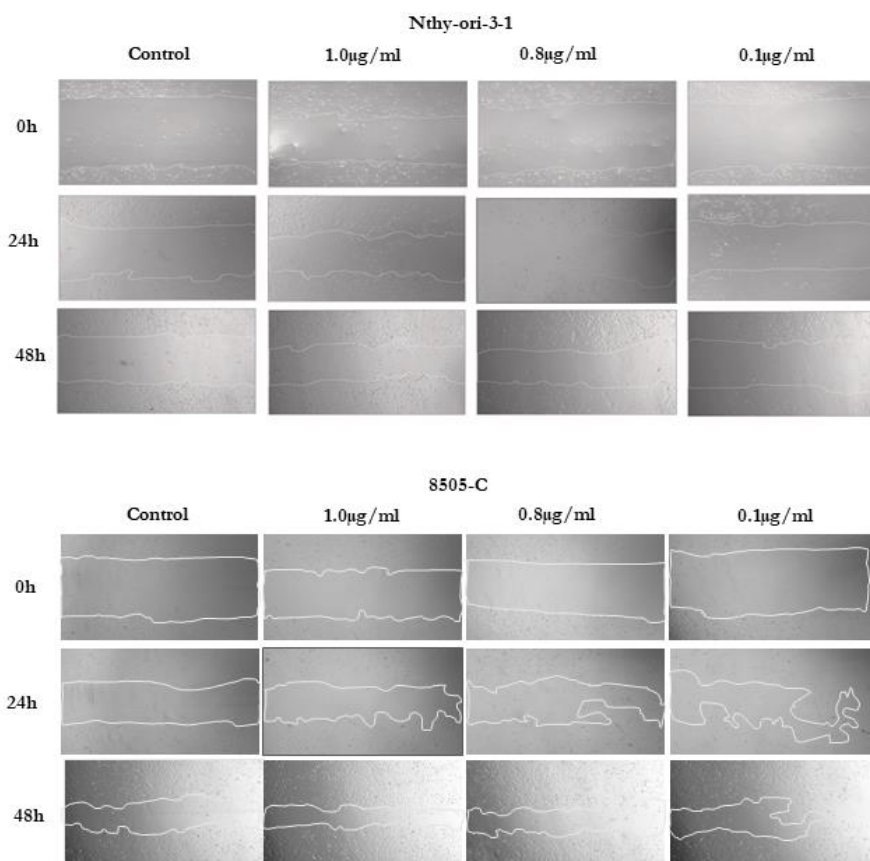


Figura 2: Efeitos do BPA na migração celular da linhagem Nthy-ori-3-1 e 8505-C. O tratamento com BPA aumentou significativamente a capacidade de migração celular.

## 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.