



IMPACTO DO BISFENOL A NA VIABILIDADE E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS TIREOIDIANAS.

Palavras-Chave: BPA, câncer de tireoide, citotoxicidade

Autores:

Sophia de Alcantara Rodrigues, FCM - UNICAMP

Larissa Teodoro Rabi, FCM – UNICAMP

Natassia Elena Bufalo, FCM – UNICAMP

Elisângela de Souza Teixeira (coorientadora), FCM - UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Laura Sterian Ward (orientadora), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Nas últimas décadas, a incidência de câncer de tireoide (CT) aumentou significativamente em todo o mundo (1-2). Para cada ano do triênio 2023 a 2025, são esperados aproximadamente 16.660 novos casos (3). Esse aumento na incidência pode ser atribuído a diversos fatores, incluindo fatores ambientais, como a exposição a substâncias conhecidas como desreguladores endócrinos, como o bisfenol A (BPA) (4). O BPA é um agente químico sintético, análogo aos hormônios estrogênicos, amplamente utilizado na produção de plásticos e está presente em diversos produtos de uso cotidiano (5,6). Dada a capacidade de migração do BPA para alimentos e bebidas armazenados nesses materiais, ampliando a exposição dos humanos e animais a esse composto, no Brasil, o uso de BPA é regulamentado pela Resolução RDC n°18/2008, onde estabelece o Limite de Migração Específica (LME) de 0,6 mg de BPA/kg de alimento (5).

Devido à semelhança estrutural com os hormônios naturais, o BPA pode se ligar ao receptor do hormônio tireoidiano ($TR\beta$), atuando como agonista ou antagonista hormonal (7), assim mimetizando ou bloqueando ação hormonal. Investigações prévias associaram a exposição ao BPA a alterações da função tireoidiana, à desregulação dos níveis hormonais e à indução de proliferação e migração de células cancerígenas em diversos tipos de câncer como ovário, mamas e na própria tireoide (8-13). Portanto, a exposição a esse composto pode influenciar no desenvolvimento e na progressão do câncer.

Uma característica amplamente conhecida dos desreguladores endócrinos, como o BPA, é que seus efeitos não seguem o paradigma toxicológico clássico da relação dose-resposta linear, o que dificulta a determinação de uma dose “segura”, cuja exposição não afete a saúde humana. Além disso, o sistema

endócrino, mais especificamente, responde a baixas doses (14,15). Assim, o objetivo do estudo foi investigar os efeitos da exposição às baixas doses de BPA nas células tireoidianas.

METODOLOGIA:

Cultura celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares provenientes de tireoide humana. A TPC-1, derivada de carcinoma papilífero com translocação RET/PTC e a Nthy-ori 3-1 atuou como grupo controle, pois 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). Serão mantidas em estufa a 37°C, com 5% de dióxido de carbono (CO₂) (16-18). Para a exposição, o bisfenol A (BPA, CAS No: 80-05-7) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações (0,1 a 1,0 µg/mL). As células foram expostas ao BPA por 24 e 48 horas.

Ensaio de viabilidade e citotoxicidade.

O teste de exclusão por azul de tripan foi utilizado para avaliar a viabilidade celular, conforme protocolos anteriores (19,20). Após o tempo de cada exposição, uma alíquota de 10 µL da ressuspensão das células em 500 µL de meio de cultura foi misturada com 10 µL de azul de tripan 0,4% (1:1). Após incubação por 3 minutos em temperatura ambiente, 10 µL da solução foi analisada em lâmina descartável pelo Countess® II FL (Thermo Fisher Scientific). As células coradas foram consideradas não viáveis; e as não coradas, viáveis. Além disso, o experimento foi feito em triplicata técnica e biológica.

Ensaio de migração horizontal (Scratch Assay)

O ensaio de migração horizontal avalia a migração celular *in vitro*. Seguindo esse método, primeiramente, as células de ambas as linhagens foram tripsinizadas, contadas em uma concentração de 5×10^5 e dispostas em placas de 24 poços. Após 24 horas de incubação a 37°C, as linhagens celulares foram expostas ao BPA, exceto aquelas que atuaram como grupo controle. Em seguida, as monocamadas foram arranhadas, criando uma fenda sem células (“ferida”), utilizando uma ponta de micropipeta estéril de 10 µL para manter a largura da fenda limitada. O meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS para remover as células no sobrenadante. Depois, os poços foram fotografados logo após a lavagem com meio e em intervalos de tempo de 24 e 48h. Assim, foi acompanhado o fechamento da “ferida” pela movimentação das células encontradas nas extremidades em direção à abertura, obtendo a taxa de migração celular (21). As diferenças na área de fechamento da ferida ao longo do tempo em células vivas incubadas com exposição ao BPA ou controle foram avaliadas usando ANOVA de duas vias, tendo o tempo e a concentração de BPA como variáveis independentes.

ASPECTOS ÉTICOS:

O projeto recebeu dispensa de avaliação ética do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A exposição ao BPA reduziu a viabilidade celular, não apresentando linearidade entre dose-resposta. No comparativo entre as duas linhagens, a N-thyr-ori 3-1 apresentou maiores porcentagens de viabilidade celular em relação à TPC-1. Na dose LME (1µg/mL), o BPA resultou em morte em 50% da N-thyr 3-1 em 24 horas e em 48 horas, enquanto a mesma dose na TPC-1 resultou em 75% de morte em 24 horas e 85% em 48 horas. De modo geral, ambas as linhagens apresentaram redução na viabilidade após exposição de 48 horas ao BPA.

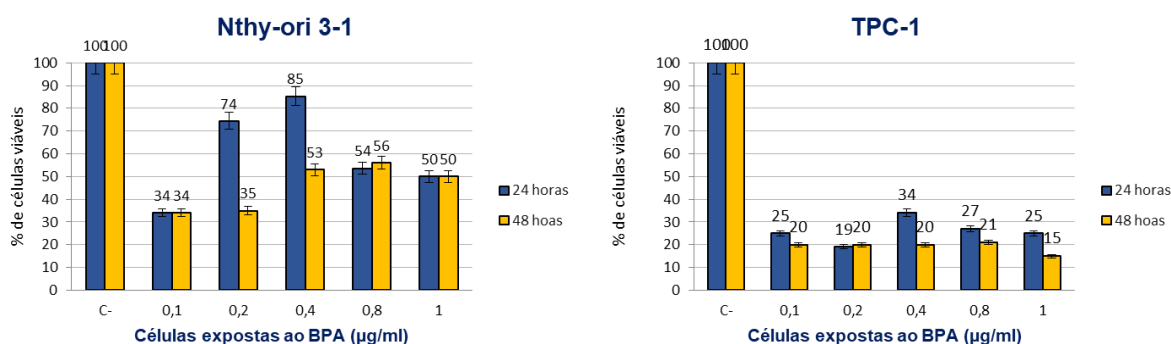


Figura 1. Efeitos da exposição ao bisfenol A em linhagens celulares de tireoide: a linhagem TPC1 apresentou maior dano celular em comparação com a linhagem Nthy-ori 3-1.

No ensaio de migração, na linhagem N-thyr-ori 3-1, as concentrações de BPA utilizadas impactaram a taxa de migração celular ($p=0,013596$), assim como os diferentes períodos de tempo de exposição ao composto ($p=0,000317$). Nesta linhagem celular, a maior taxa de migração (representada pela menor área de “ferida” após o intervalo de tempo determinado) foi observada nas amostras expostas à concentração de BPA correspondente ao LME (1µg/mL) em ambos os períodos analisados (24h e 48h). A exposição a essa concentração provocou a redução de 27,2% da área original da ferida após 24h e de 35,1% após 48h. Por sua vez, na linhagem celular TPC-1, observou-se uma influência da exposição às baixas doses de BPA ($p=0,046623$) e dos intervalos de tempo analisados ($p=0,000006$) sobre as taxas de migração celular. Nas amostras desta linhagem, constatou-se a maior taxa de migração celular nas amostras expostas a 0,1µg/ml em ambos os períodos analisados, sendo responsável pela diminuição de 26,9% da área original após 24h e de 39,8% após 48h. Nesta mesma linhagem celular, a concentração referente ao LME foi responsável pela segunda maior taxa de migração celular após o período de 48h, provocando a diminuição de 39,6% da área original da ferida. Portanto, o tempo de exposição e a dose de BPA utilizada impactam na capacidade de migração das células tireoidianas normais e neoplásicas, sendo os resultados muito mais expressivos em células cancerígenas.

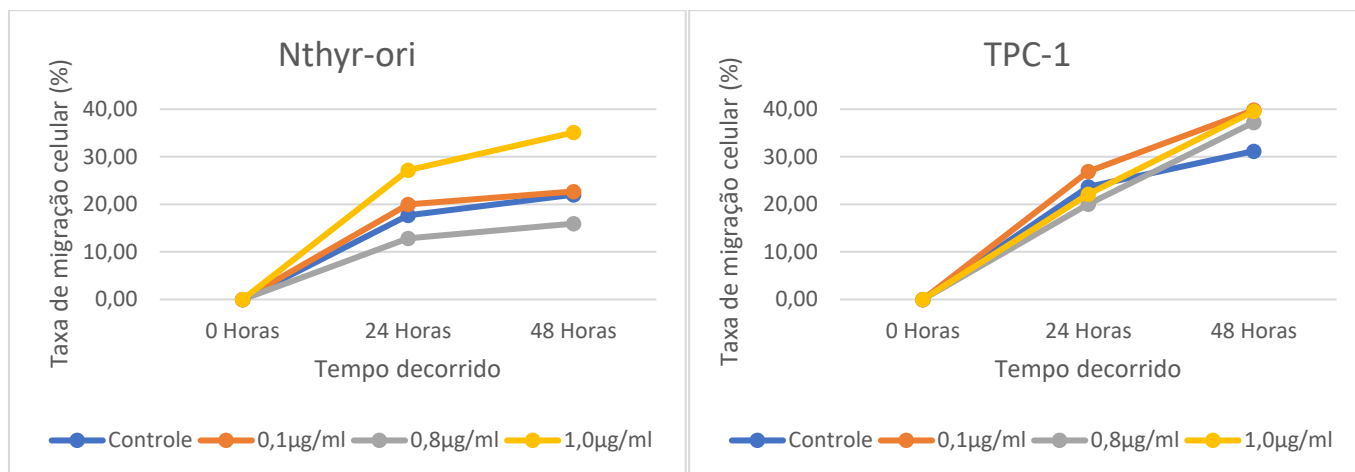


Figura 2. Taxas de migração celular da linhagem Nthy-ori e TPC-1.

CONCLUSÕES:

Os dados obtidos sugerem que a exposição a baixas doses de BPA durante os intervalos de tempo de 24 e 48 horas impactam a viabilidade e a migração de células normais e neoplásicas de tireoide humana. Os resultados observados não apresentaram linearidade entre dose-resposta e foram mais expressivos em células cancerígenas. Dessa forma, os resultados do presente estudo indicam que mesmo baixas doses de exposição ao BPA podem apresentar riscos à saúde humana, podendo influenciar no desenvolvimento e progressão de câncer de tireoide.

BIBLIOGRAFIA

1. Lortet-Tieulent J, Franceschi S, Dal Maso L, Vaccarella S. Thyroid cancer "epidemic" also occurs in low- and middle-income countries. *Int J Cancer*. 2019;144(9):2082-7.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
3. INCA. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. 2023.
4. 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;21(5):T235-54.
5. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006;226(2-3):79-89.
6. Yilmaz B, Terekeci H, Sandal S, Kelestimur F. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(1):127-47.
7. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5185-90.
8. Fernandez MO, Bourguignon NS, Arocena P, Rosa M, Libertun C, Lux-Lantos V. Neonatal exposure to bisphenol A alters the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in female rats. *Toxicol Lett*. 2018;285:81-6.

9. Axelstad M, Boberg J, Vinggaard AM, Christiansen S, Hass U. Triclosan exposure reduces thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. *Food Chem Toxicol.* 2013;59:534-40.
10. Zhang Y, Wei F, Zhang J, Hao L, Jiang J, Dang L, et al. Bisphenol A and estrogen induce proliferation of human thyroid tumor cells via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Arch Biochem Biophys.* 2017;633:29-39.
11. Song H, Zhang T, Yang P, Li M, Yang Y, Wang Y, et al. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR γ signals. *Toxicol In Vitro.*2015;30(1 Pt B):521-8.
12. Sang C, Song Y, Jin TW, Zhang S, Fu L, Zhao Y, et al. Bisphenol A induces ovarian cancer cell proliferation and metastasis through estrogen receptor- α pathways. *Environ Sci Pollut Res Int.*2021;28(27):36060-8.
13. Bredhult C, Bäcklin BM, Olovsson M. Effects of some endocrine disruptors on the proliferation and viability of human endometrial endothelial cells in vitro. *Reprod Toxicol.*2007;23(4):550-9.
14. Aghajanzpour-Mir SM, Zabihi E, Akhavan-Niaki H, Keyhani E, Bagherizadeh I, Biglari S, et al. The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes. *International journal of molecular and cellular medicine.* 2016;5(1):19-29.
15. Bello A. Faller A.L.K, Nutrição E Destoxificação - Bases Moleculares Para A Prática Clínica. . Editora: Rubio. 2016;1:66-8.
16. van Staveren WC, Solís DW, Delys L, Duprez L, Andry G, Franc B, et al. Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res.* 2007;67(17):8113-20.
17. Meireles AM, Preto A, Rocha AS, Rebocho AP, Máximo V, Pereira-Castro I, et al. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. *Thyroid.* 2007;17(8):707-15.
18. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hébrant A, van Staveren WC, et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:133.
19. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.*2015;111:A3.B.1-A3.B.
20. Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, Mourão FA, Massensini AR, Martins-Filho OA, et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(4):307-15.
21. Almeida VM, Bezerra MA, Nascimento JC, Amorim LMF. Anticancer drug screening: standardization of in vitro wound healing assay. *J Bras Patol Med Lab.* 2019;55(6):606–19.