

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO BISFENOL A

Ana Laura Fernandes De Oliveira*¹, Tatiana Fernandes Araújo Almeida², Ivana Márcia Alves Diniz³, Gabriel Henrique Campolina-Silva⁴, Cleida Aparecida Oliveira⁵, Milene Alvarenga Rachid⁵, Tarcília Aparecida da Silva⁶

1. Estudante de Iniciação Científica da Faculdade de Odontologia da UFMG
2. Doutoranda da Faculdade de Odontologia da UFMG
3. Professora Doutora da Faculdade de Odontologia da UFMG
4. Doutorando do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
5. Professora Doutora do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
6. Professora Doutora da Faculdade de Odontologia da UFMG / Orientadora

Resumo

O Bisfenol-A (BPA) é um monômero amplamente utilizado na produção de plástico policarbonato. Apresenta efeitos no sistema endócrino que podem resultar em alterações como aumento da incidência de câncer de mama e próstata. Objetivou-se avaliar os efeitos de exposição ao BPA *in vivo*. Para isso camundongos C57Bl/6 receberam BPA na água durante 6 semanas. Foram coletadas as glândulas salivares maiores, língua, mucosa jugal, palato, glândulas mamárias das fêmeas (n=10) e próstata dos machos (n=30). Observou-se aumento da espessura do epitélio e queratina das mucosas orais e redução do número de ácinos das glândulas submandibulares. Nos machos notou-se aumento do número de túbulos granulares convolutos e alterações morfológicas no lobo anterior prostático. Não houve hiperplasia epitelial nas glândulas mamárias das fêmeas. Conclui-se que a exposição crônica ao BPA induz alterações morfológicas na mucosa oral, glândulas salivares e próstata de camundongos, sugerindo efeitos em tecidos normais.

Autorização legal: O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UMFG), protocolo 387/2016.

Palavras-chave: BPA; disruptores endócrinos; camundongos.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPEMIG

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMG

Introdução

O Bisfenol-A (BPA) (4,4-isopropilidenedifenol) é um monômero plástico sintético composto por dois anéis fenólicos, aplicado na síntese de policarbonatos e resinas epóxi (MICHAŁOWICZ, 2014). É amplamente utilizado na indústria para a produção de garrafas plásticas, eletroeletrônicos, latas de alimentos, resinas de uso odontológico e diversos outros materiais de uso diário (MICHAŁOWICZ, 2014; VOGEL, 2009). Devido à larga aplicabilidade, o BPA é um dos principais produtos químicos sintetizados mundialmente, com mais de 3,8 milhões de toneladas produzidas somente em 2014 (HOEKSTRA; SIMONEAU, 2013; MICHAŁOWICZ, 2014; VANDENBERG et al., 2010).

A principal via de exposição ao BPA é a ingestão oral, que pode ocorrer por meio da hidrólise do polímero para alimentos e bebidas (HOEKSTRA; SIMONEAU, 2013; KANG; KONDO; KATAYAMA, 2006). Outras formas de exposição incluem o contato por meio do ar, do solo, ou através da pele (BIEDERMANN; TSCHUDIN; GROB, 2010; HOEKSTRA; SIMONEAU, 2013; RUBIN, 2011; ZALKO et al., 2011). Em decorrência da constante exposição e fácil absorção, o BPA já foi detectado em amostras humanas de soro, saliva, urina, líquido amniótico, leite materno, dentre outros líquidos corporais (HOEKSTRA; SIMONEAU, 2013; RUBIN, 2011; VANDENBERG et al., 2007, 2010).

Na década de 30 foi descoberta a atividade estrogênica do BPA (DODDS; LAWSON, 1936). Este atua a nível celular como xenoestrogênio mimetizando o 17 β -estradiol e sensibilizando receptores de estrógeno e de andrógeno, mesmo em concentrações muito baixas, levando a uma interrupção das vias de sinalização induzidas pelo estrógeno (ROUTLEDGE et al., 2000; WETHERILL et al., 2005). O contato do BPA com humanos e animais pode induzir efeitos hepatotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos em virtude do seu potencial oxidativo e mutagênico (KERI et al., 2007; RICHTER et al., 2007; HASSAN et al., 2012). Nesse contexto, o BPA já foi considerado possível contribuinte em processos tumorigênicos humanos, como no câncer de mama, próstata e ovário (BILANCIO et al., 2017; SHAFEI et al., 2018a, 2018b). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do BPA em um modelo *in vivo* murino de exposição crônica ao BPA por ingestão oral.

Metodologia

Animais C57BL/6 (30 machos e 10 fêmeas) com aproximadamente 6 semanas, foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB-UFMG sob condições controladas de iluminação e temperatura, dieta padrão para camundongo, água ad libitum, sendo pesados semanalmente.

Os animais foram separados em três grupos: 11 camundongos machos tratados com BPA (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído semanalmente na água de beber na concentração de 200mg/L; 10 animais machos tratados com o veículo de diluição do BPA, o dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), na maior concentração utilizada no grupo experimental BPA; e 09 animais constituindo o grupo controle, que receberam somente água filtrada durante o período experimental. As fêmeas foram separadas em grupo BPA e Veículo (5 animais em cada) respeitando as mesmas doses. Em todos os grupos foram utilizadas garrafas de vidro.

Os camundongos receberam as doses de BPA, veículo ou apenas água, durante seis semanas. Após este período, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico, que consiste em solução de quetamina (100mg/mL) e xilazina (20mg/mL) nas doses de 180mg/kg e 25mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal, procedendo então à coleta dos seguintes órgãos/tecidos: glândulas salivares maiores, língua, mucosa bucal, palato e próstata. As glândulas mamárias das fêmeas também foram coletadas.

Todos os tecidos citados previamente foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%, e processados por técnicas de rotina. As línguas, palatos, mucosas bucais, glândulas e próstatas foram cortadas no sentido ântero-posterior e as metades incluídas segundo a orientação da secção desejada. Cortes de 3 µm de espessura foram obtidos para coloração com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas das línguas, palato e mucosa jugal foram fotografadas em microscopia de luz (Leica DM500; aumento 20x), 10 campos em cada lâmina, para análise morfométrica realizada com o auxílio do *software Image J* (Scion Corporation, E.U.A). A espessura epitelial e da camada córnea foram mensuradas para verificar os efeitos produzidos pelo BPA.

A estrutura das glândulas salivares foi avaliada em 5 cortes consecutivos, utilizando microscopia de luz (Leica DM500). Para especificar as alterações estruturais desenvolvidas em consequência ao BPA, foram verificadas a quantidade dos ácinos e túbulos granulares convolutos (GCT) com o auxílio do *software Image J* (Scion Corporation, E.U.A).

Os lobos prostáticos foram separados (anterior, dorsolateral e ventral) e analisados para a presença de hiperplasia e proliferação intraepitelial.

As glândulas mamárias foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de alterações morfológicas e hiperplásicas.

Cortes na espessura de 3µm foram obtidos da língua e palato dos animais (n=05), montados em lâminas silanizadas, para a reação de imunistoquímica para o anticorpo Ki67 (Abcam).

Resultados e Discussão

Por meio do estudo *in vivo* murino de exposição crônica ao BPA, observou-se que em camundongos C57BL/6 machos há um aumento significativo da espessura do epitélio e camada córnea das mucosas orais (mucosa jugal, língua e palato) induzido pelo BPA, em relação aos grupos controle e veículo (DMSO). Consistentemente houve um aumento do número de células epiteliais Ki67+ nas línguas e palatos de animais machos do grupo BPA em relação aos demais grupos, indicando o aumento da atividade proliferativa das mesmas. Nas glândulas submandibulares houve uma diminuição significativa do número de ácinos e aumento significativo do número de túbulos granulares convolutos (GTC) por mm², no grupo BPA em relação aos demais grupos.

Nas fêmeas, houve aumento significativo na espessura do epitélio da mucosa jugal e da língua, no grupo BPA em relação ao grupo veículo (DMSO). Não houve diferença significativa da espessura da camada córnea nas amostras analisadas. A análise da glândula submandibular revelou uma diminuição significativa da média de ácinos por mm² no grupo BPA. Por sua vez não houve diferença significativa na contagem de túbulos granulares convolutos.

Os túbulos granulares convolutos (GTC) são estruturas presentes em roedores, com funções secretoras particularmente sensíveis aos hormônios sexuais que induzem sua hipertrofia estrutural e aumento da secreção de fatores de crescimento (EGF, NGF, TGF) importantes na manutenção do epitélio oral e do paladar (GRESIK et al., 1986, 1996). Em roedores, as ações dos hormônios sexuais sobre as estruturas glandulares devem ser analisadas considerando-se o dimorfismo sexual que apresentam. O dimorfismo sexual nas glândulas submandibulares se manifesta principalmente no desenvolvimento dos GTC, que ocorre mais proeminentemente nos machos do que nas fêmeas (CARAMIA, 1966; GRESIK, 1975; YAMAMOTO et al., 2018). O aumento significativo do número de GTC nos machos tratados com o BPA pode sugerir um aumento da produção de fatores de crescimento, que poderia ter culminado no aumento da atividade proliferativa das células epiteliais da cavidade oral. Entretanto, outras análises são necessárias para testar essa informação.

O papel do BPA na desregulação da homeostase oral foi investigado anteriormente em um modelo *in vivo* utilizando ratos (FOLIA et al., 2013). Nesse estudo, BPA induziu o ressecamento das mucosas orais, espessamento do epitélio, além de alterações no número e volume dos ácinos glandulares (FOLIA et al., 2013), corroborando alguns dos nossos achados intraorais.

Por sua vez, a análise considerando os diferentes lobos prostáticos revelou que o tratamento com BPA promoveu alterações pontuais de maneira lobo-específica. Nesse sentido as principais modificações foram observadas na próstata anterior, onde o BPA induziu hiperplasia epitelial facilmente detectado pelo intenso

pregueamento do epitélio glandular, observado sutilmente no grupo controle e veículo. Além disso, áreas de proliferação intraepitelial também foram observadas. Em contraste, BPA não promoveu alterações significativas nos demais lobos prostáticos (ventral e dorsolateral). Na análise das glândulas mamárias não foi observada a presença de hiperplasia epitelial induzida pelo BPA.

Conclusões

O estudo in vivo da exposição crônica ao BPA por meio da ingestão oral, revelou que o BPA induziu alterações morfológicas na mucosa oral e glândulas salivares, sugerindo efeitos diretos do BPA em tecidos normais. Os efeitos do BPA estenderam-se à próstata, órgão sensível à ação de hormônios.

Referências bibliográficas

- BIEDERMANN, S.; TSCHUDIN, P.; GROB, K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 571–576, 11 set. 2010.
- BILANCIO, A. et al. Bisphenol a induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation. **Oncotarget**, v. 8, n. 70, p. 115620–115631, 2017.
- CARAMIA, F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland. I. Sexual differences. **Journal of ultrastructure research**, v. 16, n. 5, p. 505–23, dez. 1966.
- CHANG, Y.-L. et al. Regulation of estrogen receptor function in oral squamous cell carcinoma cells by FAK signaling. **Endocrine Related Cancer**, v. 21, n. 4, p. 555–565, 2014.
- DODDS, E. C.; LAWSON, W. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. **Nature**, v. 137, n. 3476, p. 996–996, 13 jun. 1936.
- EGLOFF, A. M. et al. Cross-talk between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 21, p. 6529–6540, 2009.
- FOLIA, M. et al. Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component bisphenol A in adult male rats. **The Laryngoscope**, v. 123, n. 6, p. 1405–10, jun. 2013.
- GRESIK, E. W. The postnatal development of the sexually dimorphic duct system and of amylase activity in the submandibular glands of mice. **Cell and tissue research**, v. 157, n. 3, p. 411–22, 1975.
- GRESIK, E. W. et al. Effect of advanced age on the induction by androgen or thyroid hormone of epidermal growth factor and epidermal growth factor mRNA in the submandibular glands of C57BL/6 male mice. **Mechanisms of ageing and development**, v. 34, n. 2, p. 175–89, abr. 1986.
- GRESIK, E. W. et al. The rodent granular convoluted tubule cell--an update. **European journal of morphology**, v. 34, n. 3, p. 221–4, ago. 1996.
- HASSAN, Z. K. et al. Bisphenol A Induces Hepatotoxicity through Oxidative Stress in Rat Model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- HOEKSTRA, E. J.; SIMONEAU, C. Release of Bisphenol A from Polycarbonate-A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 386–402, 2013.
- KANG, J.-H.; KONDO, F.; KATAYAMA, Y. Human exposure to bisphenol A. **Toxicology**, v. 226, n. 2–3, p. 79–89, set. 2006.
- KERI, R. A. et al. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 240–252, ago. 2007.
- KOLUDE, B. et al. Immunohistochemical expression of oestrogen receptor- α and progesterone receptor in salivary gland tumours. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, n. 9, p. 716–719, 2013.
- MARQUES, Y. M. F. S. et al. Oestrogen receptor ?? in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. **Histopathology**, v. 60, n. 4, p. 609–616, 2012.
- MICHAŁOWICZ, J. Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 738–758, 2014.
- OHSHIRO, K.; KUMAR, R. MTA1 regulation of ER β pathway in salivary gland carcinoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 464, n. 4, p. 1016–21, 4 set. 2015.
- RICHTER, C. A. et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 199–224, ago. 2007.

- ROUTLEDGE, E. J. et al. Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER) α and ER β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 46, p. 35986–35993, 17 nov. 2000.
- RUBIN, B. S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1–2, p. 27–34, 2011.
- SHAFEI, A. et al. The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. **Gene**, v. 647, p. 235–243, 2018a.
- SHAFEI, A. et al. Stop eating plastic, molecular signaling of bisphenol A in breast cancer. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 24, p. 23624–23630, 29 ago. 2018b.
- SUMIDA, T.; ISHIKAWA, A.; MORI, Y. Stimulation of the estrogen axis induces epithelial-mesenchymal transition in human salivary cancer cells. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 13, n. 4, p. 305–310, 2016.
- VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 139–177, ago. 2007.
- VANDENBERG, L. N. et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1055–1070, 2010.
- VOGEL, S. A. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety”. **American journal of public health**, v. 99 Suppl 3, p. 559–566, 2009.
- WETHERILL, Y. B. et al. Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. **Cancer research**, v. 65, n. 1, p. 54–65, 1 jan. 2005.
- YAMAMOTO, M. et al. Distinct hormonal regulation of two types of sexual dimorphism in submandibular gland of mice. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 2, p. 261–272, 28 fev. 2018.
- ZALKO, D. et al. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 424–430, jan. 2011.