

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**

**Gabriela Kelly da Silva**

**EFEITOS DO BISFENOL A EM GLÂNDULAS SALIVARES DE  
CAMUNDONGOS E EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS  
HUMANAS**

**Belo Horizonte**  
**2023**

Gabriela Kelly da Silva

**EFEITOS DO BISFENOL A NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE  
CAMUNDONGOS E EM LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS  
HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia — área de concentração em Estomatologia Bucal.

**Orientadora:** Profa. Dra. Tarcília Aparecida Silva

**Coorientadora:** Profa. Dra. Soraia Macari

Belo Horizonte  
2023

## Ficha Catalográfica

S586e Silva, Gabriela Kelly da.  
2023 Efeitos do bisfenol A nas glândulas salivares de  
T camundongos e em linhagem de células tumorais humanas /  
Gabriela Kelly da Silva. -- 2023.

60 f. : il.

Orientadora: Tarcília Aparecida Silva.  
Coorientadora: Soraia Macari.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Compostos químicos. 2. Disruptores endócrinos. 3. Poluentes ambientais. 4. Receptores de estrogênio. 5. Glândulas salivares. I. Silva, Tarcília Aparecida. II. Macari, Soraia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UFMG

### FOLHA DE APROVAÇÃO

#### EFEITOS DO BISFENOL A NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE CAMUNDONGOS E EM LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

**GABRIELA KELLY DA SILVA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração ESTOMATOLOGIA.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Tarcília Aparecida da Silva - Orientadora  
UFMG

Profa. Soraia Macari  
UFMG

Profa. Patrícia Carlos Caldeira  
UFMG

Profa. Giovanna Ribeiro Souto  
PUC - MINAS

Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Carlos Caldeira, Professora do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tarcília Aparecida da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovanna Ribeiro Souto, Usuário Externo**, em 10/02/2023, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraia Macari, Professora do Magistério Superior**, em 23/02/2023, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2064470** e o código CRC **0B96323D**.

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos e ao Rodrigo, que me fazem ter força para alcançar os meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, constantemente, por todas as graças alcançadas e por me fazer sentir sua presença todos os dias.

Um agradecimento especial aos meus pais, irmãos e ao Rodrigo, por estarem sempre ao meu lado, deixando essa trajetória mais tranquila e feliz.

Agradeço também à Fernanda, Flávia, Alcides e Tatiana que muito me ajudaram a percorrer este caminho com mais leveza e paciência, sem vocês eu não teria conseguido!

Às professoras Tarcília Aparecida Silva e Soraia Macari por todo conhecimento compartilhado, por serem exemplos de eficiência, pela confiança e principalmente, por terem me dado esta oportunidade.

Aos demais colegas e professores do mestrado, pela importante e significativa colaboração na minha formação.

Finalmente, agradeço à equipe do Colegiado de Pós-Graduação por todo auxílio concedido, sempre gentis, pacientes e de forma tão respeitosa durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

O Bisfenol A (BPA) é um produto químico desregulador endócrino com potencial papel em cânceres endócrinos. Entretanto, os efeitos do BPA sobre as glândulas salivares têm sido pouco explorados. Investigamos o impacto da exposição in vivo subcrônica ao BPA e seus efeitos in vitro nas linhagens celulares do carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar. Camundongos machos e fêmeas foram expostos ao BPA (30.000 µg/kg/dia). Analisamos glândulas salivares sublinguais e submandibulares desses camundongos C56BL6 e camundongos fêmeas submetidos a ovariectomia. A concentração de BPA nas glândulas salivares foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com armadilha de íons. A expressão dos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  foi avaliada em amostras de glândulas salivares de camundongos e linhagens celulares UM-HMC-1 e UM-HMC-3A pelo qRT-PCR, RNA mensageiro. Foram avaliadas in vitro, a viabilidade celular p63 e Ki-67, a imunoglobulina e a expressão de proteínas-alvo relacionadas às vias de sobrevivência/proliferação. O BPA prejudicou a morfologia das glândulas submandibulares e sublingual, particularmente nas fêmeas, e aumentou a expressão dos receptores de estrogênio, também acompanhado por um acúmulo significativo de BPA nestes tecidos. Ao contrário, a redução dos níveis de estrogênio pelo modelo de ovariectomia teve um leve impacto nas alterações morfológicas induzidas pela BPA. In vitro, a BPA não afetou a proliferação de células neoplásicas, mas aumentou a expressão dos receptores de p63 e estrogênio. A fosforilação ERK1/2 foi aumentada enquanto a fosforilação AKT e NF- $\kappa$ B foi reduzida. Os dados destacam um efeito nocivo do BPA sobre os tecidos das glândulas salivares e células tumorais. Os dependentes de estrogênio podem combinar o mecanismo de acúmulo de BPA, juntamente com a via de sinalização pró-sobrevivência e aumento da expressão da p63.

Palavras-chave: BISFENOL A; produto químico perturbador do sistema endócrino; poluente ambiental; receptores de estrogênio; glândulas salivares.

## ABSTRACT

### Effects of bisphenol A on murines salivary glands and human tumor cell lines

Bisphenol A (BPA) is an endocrine-disrupting chemical with potential role in endocrine cancers. However, BPA effects on the salivary glands have been barely explored. We investigated the impact of *in vivo* sub-chronic exposure to BPA and its *in vitro* effects on salivary gland mucoepidermoid carcinoma cell lines. Male and female mice were exposed to BPA (30,000 µg/kg/day). We analyzed sublingual and submandibular salivary glands from sham C56BL6 mice and that female ones underwent ovariectomy. Concentration of BPA in salivary glands was evaluated by gas chromatography coupled to ion trap mass spectrometry. Expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  receptors was assessed in mouse salivary gland samples and cell lines UM-HMC-1 and UM-HMC-3A by qRT-PCR, mRNA. *In vitro*, cell viability p63 and Ki-67 immunostaining and expression of target proteins related to survival/proliferation pathways were evaluated. BPA impaired the architectural of the submandibular and sublingual glands, particularly in female mice, and increased the expression of estrogen receptors. This was accompanied by a significant accumulation of BPA in these tissues. Conversely, the reduction of estrogen levels by the ovariectomy model slightly impacted BPA-induced morphological changes. *In vitro*, BPA did not affect the proliferation of neoplastic cells, but increased the expression of p63 and estrogen receptors. ERK1/2 phosphorylation was increased while AKT and NF- $\kappa$ B phosphorylation was reduced. Data highlight a harmful effect of BPA on salivary gland tissues and tumorigenic cells. Estrogen-dependent may orchestrate the BPA-accumulation mechanism, along with pro-survival signaling pathway and increased p63 expression.

Keywords: bisphenol A; endocrine disrupting chemical; environmental pollutant; estrogen receptors; salivary glands.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Efeitos da exposição ao Bisfenol A (BPA) sobre as glândulas salivares de camundongos machos e fêmeas e quantificação dos produtos nesses tecidos. ....48
- Figura 2: Regulação positiva da liberação do receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) e do receptor de estrogênio beta (ER $\beta$ ) pelo Bisfenol A (BPA) em glândulas salivares de camundongos fêmeas. ....48
- Figura 3: Efeitos da deficiência de estrogênio induzido por ovariectomia nas glândulas salivares submandibulares de camundongos expostos ao BPA (30.000  $\mu$ g/kg/dia) e veículo (0,05% DMSO). ....49
- Figura 4: Viabilidade celular relativa por resazurina nas linhagens celulares (A) UM-HMC-3A (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A) e (B) UM-HMC-1 (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1) às 48 horas de incubação. ....49
- Figura 5: Imunocitoquímica, immunoblotting e expressão do receptor de estrogênio em UM-HMC-1 (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1) e UM-HMC-3A (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A). ....50

## LISTA DE TABELAS

Supplementary Table 1- Ratio obtained from the densitometry of the bands (phosphorylated antibody/total antibody) of the target proteins of the UM-HMC-1 and UM-HMC-3A cell lines exposed to 50nM bisphenol A (BPA).....	52
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPA	Bisfenol A
DMSO	Dimetilsulfóxido
ER	Receptor de estrógeno
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GCT	Granulated Convolute Tubes
HE	Hematoxilina e Eosina
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
OVX	Ovariectomizadas
qRT PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1	Objetivo geral .....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA EXPANDIDA.....</b>	<b>16</b>
3.1	Animais e protocolos experimentais .....	16
3.1.1	Avaliação histomorfométrica .....	17
3.1.2	Quantificação do Bisfenol A nas glândulas salivares .....	17
3.2	Ensaio in vitro .....	17
3.2.1	Células .....	17
3.2.2	Teste de viabilidade celular da resazurina .....	18
3.2.3	Imunocitoquímica .....	18
3.2.4	Western Blotting .....	19
3.3	Extração do mRNA do tecido do camundongo e das linhagens celulares e reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) .....	19
3.4	Análise estatística.....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
4.1	Artigo Científico .....	21
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Bisfenol A (BPA) é um dos compostos químicos sintéticos de maior volume, utilizados no mundo inteiro na produção de numerosos produtos, tais como plásticos, papéis térmicos e materiais médicos e odontológicos (FRANKOWSKI et al., 2020; GEENS et al., 2012; MARZOUK et al., 2019).

Nos últimos anos, as preocupações no impacto do BPA têm aumentado porque evidências indicam que o composto é potencialmente genotóxica e um poluente ambiental importante (ĎUROVCOVÁ et al., 2022).

O BPA age como desregulador do sistema endócrino capaz de promover tumores hormonais (WETHERILL et al., 2007). Além disso, interfere nos mecanismos celulares, mesmo em baixas concentrações (NOMIRI et al., 2019) e leva a inflamação ao ampliar a produção de citocinas e de mediadores inflamatórios através da ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (LEE et al., 2020). Estudos apontam que o BPA tem sido constantemente encontrado no plasma (KADDAR et al. 2009), fluidos placentários (BONDE et al., 2016), leite materno (IRIBARNE-DURÁN et al., 2022), sêmen (CASTELLINI et al., 2022), urina (CASTELLINI et al., 2022), e saliva (GOMES et al., 2020; LOPES-ROCHA et al., 2022).

Em humanos, foram documentados múltiplos efeitos adversos potenciais induzidos pelo BPA (HEINDEL et al., 2020; PATEL et al., 2017; PRINS et al., 2019; VANDENBERG et al., 2020; VOM SAAL & VANDENBERG, 2021), tais como impacto negativo na fertilidade masculina e feminina (BONDE et al., 2016; KARWACKA et al., 2019), associação com alguns distúrbios endócrinos e aumento da ocorrência de câncer mama (WAN et al., 2021), endometrial (CASERTA et al., 2022), e câncer de próstata (DI DONATO et al., 2017). Em roedores, a exposição ao Bisfenol A pode induzir carcinoma mamário (ACEVEDO et al., 2013; AYYANAN et al., 2011; DURANDO et al., 2007; WADIA et al., 2013), aumentar a sensibilidade da próstata às exposições de hormônios adultos, e o risco de neoplasia epitelial prostática (ALMEIDA et al., 2021; NELLES et al., 2011; NICHOLSON et al., 2018; TAYLOR et al., 2020).

Agências reguladoras como a Food and Drug Administration (FDA) continuam a endossar que níveis muito baixos de BPA (4  $\mu$ g/kg/dia) são seguros e que efeitos adversos significativos em humanos não são biologicamente plausíveis (MAFFINI et al., 2017; VANDENBERG et al., 2020; VOM SAAL & VANDENBERG, 2021).

A cavidade oral foi sugerida, por diversos pesquisadores, como a principal via

de contaminação da BPA, após a exposição prolongada ao mesmo (GAYRARD et al., 2013; GUIGNARD et al., 2016; TEEGUARDEN et al., 2015). É importante notar que a BPA é capaz de interagir com receptores de estrogênio (ACCONCIA et al., 2015; MATTHEWS et al., 2001), que são expressos em epitélio oral e queratinócitos, particularmente após a estimulação da BPA (ALMEIDA et al., 2021; EMFIETZOGLOU et al., 2019).

Assim, a exposição frequente de tecidos orais ao BPA levantou questões sobre uma possível ligação com a carcinogênese oral e orofaríngea (ALMEIDA et al., 2021; EMFIETZOGLOU et al., 2019), bem como alterações nas glândulas salivares (FOLIA et al., 2013). Nesta linha, sugere-se que a atividade cancerígena do BPA seja encontrada nas glândulas derivadas da endoderme (CUOMO et al., 2017), levantando a hipótese de que as glândulas salivares também são alvos e locais potenciais para o acúmulo do Bisfenol A.

De fato, a literatura recente demonstra que a exposição crônica ao BPA resultou em mudanças citopatológicas e apoptose nas células da glândula salivar (ÇETIN et al., 2021) e degeneração de células acinares na glândula submandibular e no sistema de ductos (BASHIR et al., 2022). Essas descobertas podem estar associadas ao efeito do BPA como um produto químico perturbador do sistema endócrino (EDC) ou seu potencial pró-oxidativo (BABU et al., 2013; ĎUROVCOVÁ et al., 2022; VANDENBERG et al., 2019; VOM SAAL et al., 2021). Além disso, a capacidade do Bisfenol A de interferir e/ou prevenir a ligação de hormônios naturais a seus receptores - mesmo em baixas concentrações - pode estar ligada aos efeitos deletérios desta substância na homeostase das glândulas salivares (EMFIETZOGLOU et al., 2019; FOLIA et al., 2013; HEINDEL et al., 2020; PATEL et al., 2017; PRINS et al., 2019;).

Estudos anteriores apontaram que a expressão de receptores de estrogênio (ER) em glândulas salivares humanas normais (TSINTI et al., 2009) e neoplásicas (AQUINO et al., 2018) coloca a preocupação com a interferência do BPA nesses tecidos. Apesar disso, há uma escassez de estudos na literatura avaliando o impacto do Bisfenol A nas glândulas salivares (BASHIR et al., 2022; FOLIA et al., 2013; ÇETIN et al., 2021), nos mostrando a importância de um estudo nessa área devido à considerável incerteza relacionada a toxicidade do BPA nas glândulas.

Além disso, a capacidade deste composto químico de interferir e/ou prevenir a ligação de hormônios naturais a seus receptores, mesmo em baixas concentrações,

pode estar ligada ao seu efeito deletério na homeostase da glândula salivar.

Nesse contexto, para um melhor entendimento desse tema, se faz necessário novas investigações que comprovem a potencial relação do BPA com a cavidade oral, em específico as glândulas salivares, que pode contribuir para a elucidação dos mecanismos causados pela exposição crônica do Bisfenol A em seres humanos e animais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Investigar o impacto da Bisfenol A (BPA) *in vitro* e *in vivo* em células de glândulas salivares neoplásicas e não neoplásicas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos da exposição subcrônica ao BPA em glândulas salivares maiores utilizando modelo experimental em camundongos.
- Avaliar *in vitro* os efeitos do BPA em células neoplásicas derivadas do carcinoma mucoepidermóide.

### 3 METODOLOGIA EXPANDIDA

#### 3.1 Animais e protocolos experimentais

Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas (5 semanas de idade e 15-25 g de peso) foram adquiridos do centro de cuidado animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. Os animais foram tratados de acordo com os regulamentos do Comitê de Ética Institucional (#387/2016), mantidos em um ciclo de 12 horas de luz/obscuridade sob temperatura controlada, recebendo uma dieta padrão e água ad libitum, e pesados semanalmente.

O primeiro conjunto de experimentos consistiu na exposição subcrônica ao Bisfenol A. Os animais machos (n=30) e fêmeas (n=30) foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle (água potável), veículo [0,05% de dimetil sulfóxido d6 (DMSO), Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EUA] e Bisfenol A [30 mg/kg/dia; Bisfenol A-(dimetil-d6) - C15D6H10O2; Sigma-Aldrich] (ALMEIDA et al, 2021). O Bisfenol A foi diluído em água potável e somente garrafas de vidro foram usadas ao longo dos ensaios (NUÑEZ et al., 2018). Após seis semanas, os animais foram eutanizados com uma overdose anestésica (300 mg/kg ketamina e 30 mg/kg xilazina) e as glândulas salivares sublingual e submandibular esquerda foram coletadas e fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%. As glândulas salivares sublinguais e submandibulares direitas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

O segundo conjunto de experimentos consistiu em um modelo de deficiência de estrogênio induzida por ovariectomia. Os animais (n=20) foram anestesiados (100 mg/kg ketamina e 10 mg/kg xilazina) e alocados aleatoriamente em quatro grupos: animais que ingeriram DMSO (sham); animais expostos ao Bisfenol A (sham); animais ovariectomizados que ingeriram DMSO; e animais ovariectomizados expostos ao Bisfenol A. A ovariectomia consistiu na excisão bilateral dos ovários. Em resumo, os ovários foram expostos e removidos, e a pele foi suturada imediatamente após o procedimento (grupos ovariectomizados). No grupo de controle cirúrgico, do inglês sham, os ovários foram expostos mas não removidos e a pele foi suturada posteriormente (MACARI et al., 2015). Uma semana após a ovariectomia, os animais começaram a ingerir Bisfenol A (30 mg/kg/dia) ou veículo (0,05% DMSO) em água

potável e continuaram o tratamento por seis semanas. Os animais foram então eutanizados com uma overdose anestésica e as principais glândulas salivares foram coletadas. Os tecidos foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%.

### 3.1.1 Avaliação histomorfométrica

As seções de quatro- $\mu$ m de espessuras de material em parafina obtidas de cada animal foram coradas com hematoxilina e eosina. Um total de 10 campos em cada lâmina foram fotografados sob microscopia de luz com ampliação  $\times 20$  (DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para avaliação morfométrica usando o software ImageJ (ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MA, EUA). A análise morfológica foi realizada como previamente definido (NERY et al., 2010). O número de ácinos e dutos excretores por  $\text{mm}^2$  foi examinado na glândula salivar sublingual, enquanto o número de ácinos e túbulos granulares convolutos por  $\text{mm}^2$  foi avaliado na glândula salivar submandibular (FOLIA et al., 2013). Todas as análises foram realizadas de forma cega por dois autores calibrados (G.K.S. e T.F.A.A.). Um terceiro autor (T.A.S.) resolveu quaisquer discrepâncias.

### 3.1.2 Quantificação do bisfenol a nas glândulas salivares

As glândulas salivares sublingual e submandibular direita foram usadas para determinar a concentração de Bisfenol A através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com armadilha de íons (FERNANDEZ et al., 2017; GOMES et al., 2020). A extração e concentração dos analitos foram realizadas utilizando o método de microextração de fase líquida de fibra oca (GOMES et al., 2020).

## 3.2 Ensaios in vitro

### 3.2.1 Células

As linhagens celulares UM-HMC-1 (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1) e UM-HMC-3A (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A) foram utilizadas (gentilmente cedidas pelo Professor Fabio D. Nunes da Universidade de São Paulo, Brasil). As amostras celulares

resultantes foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Waltham, MA, EUA) suplementado com 1% L-Glutamina (Invitrogen), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 20 ng/mL de fator de crescimento da epiderme (Sigma-Aldrich), 400 ng/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 5 µg de insulina (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL de nistatina (Sigma-Aldrich), e 1% de anfotericina B (Sigma-Aldrich). O regime antimicrobiano foi alterado para 5% de penicilina/streptomina (Invitrogen). As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência.

### 3.2.2 Teste de viabilidade celular da resazurina

Células foram chapeadas em quadruplo em duas réplicas biológicas independentes a uma densidade celular de  $4 \times 10^3$  células/poço em microplacas de 96 poços e incubadas durante a noite a 37°C em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Diferentes concentrações de Bisfenol A (1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM e 10 µM) foram testadas e comparadas com o grupo controle de veículos (0,05% DMSO). As células foram avaliadas após 48, 72 e 120 horas adicionando 0,01 mg/mL de resazurina (AlamarBlue, Thermo-Fisher Scientific Inc., Abingdon, UK) em DMEM (Gibco, Thermo-Fisher Scientific Inc.). As placas foram mantidas protegidas da luz e incubadas a 37°C por 4 horas em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A absorção foi avaliada usando um fluorômetro Synergy 2 Multi-mode Microplate Reader (BioTek Instruments; Winooski, VT, EUA) com excitação de 530/25 nm e emissão de 590/35 nm. Um poço contendo meio sem resazurina foi empregado como controle de reação em branco.

### 3.2.3 Imunocitoquímica

As células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A foram laminadas a uma densidade celular de  $4 \times 10^5$  por poço em uma lamela de vidro adaptada a microplacas de 12 poços e incubadas a 37°C em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas. As células foram tratadas com 50 nM de Bisfenol A e veículo (0,05% DMSO) por 48 horas. A análise imunocitoquímica foi realizada em triplicata usando a técnica do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase com anti-p63 (clone MC0221;

1:50, Medaysis, Livermore, CA, EUA) e anti-Ki-67 (clone MIB-1, 1:400, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) anticorpos primários. A quantificação de células positivas foi realizada por aquisição de imagem com um microscópio leve (O600R, Opticam, São Paulo, SP, Brasil) com ampliação  $\times 20$  usando um software integrado (Software Opticam Microscopy Technology OPTHD) e contou em 10 campos consecutivos com o software ImageJ.

#### 3.2.4 Western Blotting

As células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A foram revestidas a uma densidade de  $3 \times 10^6$  células/poço em uma microplaca de 6 poços e tratadas com 50 nM Bisfenol A e veículo (0,05% DMSO) por 2 e 24 horas. Extratos de proteína celular foram adquiridos utilizando o CellLytic™ Reagente de lise/extração de células de mamíferos M (Sigma-Aldrich) com coquetéis inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich). A concentração de proteína foi determinada pelo método da proteína Bradford (Laboratórios Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Um total de 30  $\mu$ g de proteína foi separado por eletroforese em gel de 10% de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida e transferido para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (GE HealthCare, Freiburg, Alemanha). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite sem gordura em soro fisiológico com tampão Tris contendo 10% de Tween 20. Anticorpos contra a fosfo-serina trionina quinase (pAkt, 4056, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), serina trionina quinase (Akt, 9272, Cell Signaling), fosfo-extracelular kinase 1/2 (pERK1/2, 4377, Cell Signaling), kinase 1/2 (ERK1/2, M5670, Sigma-Aldrich), fator fosfonuclear-kappa B (pNF- $\kappa$ B, 3033, Cell Signaling), e fator nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B, 8242, Cell Signaling) foram empregados. As reações foram desenvolvidas usando o sistema Enhanced Chemiluminescence™ Western blotting system (GE Health-Care, Chicago, IL, EUA) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, 5174, Cell Signaling) foi usado como controle de carga. A análise densitométrica foi realizada utilizando o software ImageJ. Os resultados são relatados como a relação anticorpo fosforilado/ anticorpo total obtida a partir da densitometria das bandas.

#### 3.3 Extração do mRNA do tecido do camundongo e das linhagens celulares e reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A expressão dos receptores de estrogênio alfa e beta foi quantificada pelo qRT-PCR em amostras de glândulas salivares de camundongos, assim como em linhas de células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A. O mRNA total foi extraído com reagente TRIzol (Thermo-Fisher Scientific Inc.) seguido de purificação da coluna (RNeasy Mini Kit, Qiagen Inc., Redwood City, CA, EUA). A qualidade e integridade das amostras de mRNA foram verificadas analisando 1 µL do mRNA total em um Bioanalisador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O DNA complementar foi sintetizado a partir do 2.5 µg RNA usando a enzima SuperScript VILO Master Mix transcriptase reverse (Thermo-Fisher Scientific Inc.). O sistema Rotor-Gene Q (Qiagen Inc.) foi empregado para a análise, e o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo-Fisher Scientific Inc.) foi aplicado. O protocolo de termociclagem consistiu em um estágio inicial de pré-incubação a 95°C por 10 minutos para aumentar a sensibilidade de detecção, 40 ciclos de amplificação começando a 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 1 segundo, seguido por um único estágio de resfriamento a 40°C por 10 segundos. Os resultados são descritos como o nível relativo de expressão gênica calculado em referência à expressão do controle interno GAPDH usando o método Ct e a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os detalhes dos genes alvo examinados são fornecidos na Tabela Complementar 1.

### 3.4 Análise estatística

O software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise estatística.

Os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney, teste de comparação múltipla Kruskal-Wallis ou análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste post-hoc Dunnett.

Para todas as análises, o nível de significância foi fixado em  $<0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados a seguir no formato de artigo científico.

### 4.1 Artigo Científico

Artigo submetido em Novembro de 2022 na Revista *Archives of Oral Biology* (Qualis A1).

#### **Efeitos do Bisfenol A nas glândulas salivares de camundongos e nas linhagens de células tumorais humanas**

Título em vigor: Efeitos do Bisfenol A sobre as glândulas salivares

Gabriela Kelly da Silva<sup>1\*</sup>, José Alcides Almeida de Arruda<sup>1\*</sup>, Tatiana Fernandes Araújo Almeida<sup>1\*</sup>, Sicília Rezende Oliveira<sup>1</sup>, Ricardo Alves Mesquita<sup>1</sup>, Zenilda de Lourdes Cardeal<sup>2</sup>, Helvécio Costa Menezes<sup>2</sup>, Ivana Márcia Alves Diniz<sup>3</sup>, Soraia Macari<sup>3</sup>, Andréia Machado Leopoldino<sup>4</sup>, Tarcília Aparecida Silva<sup>1</sup>

\*Estes autores contribuíram igualmente para este estudo.

1 Departamento de Cirurgia Oral, Patologia e Odontologia Clínica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

2 Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3 Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

4 Departamento de Análises Clínicas, Toxicologia e Ciências da Alimentação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Endereços de e-mail:

gabiestomatoufmg@gmail.com (Silva, G. K.)  
alcides\_almeida@hotmail.com (de Arruda, J. A. A.)  
tatiana.fernandes@hotmail.com (Almeida, T. F. A.)  
siciliarezende@gmail.com (Oliveira, S. R.)  
ramesquita@ufmg.br (Mesquita, R. A.)  
zenilda@ufmg.br (Cardeal, Z. L.)  
hmenezes@ufmg.br (Menezes, H. C.)  
ivanadiniz@ymail.com (Diniz, I. M. A.)  
soraiamacari@gmail.com (Macari, S.)  
andreiaml@usp.br (Leopoldino, A. M.)  
silva.tarcilia@gmail.com (Silva, T. A.)

Autor correspondente: Tarcília Aparecida Silva. Departamento de Cirurgia Oral, Patologia e Odontologia Clínica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, sala 3204, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31.270-910. E-mail: silva.tarcilia@gmail.com

Abreviações: Akt, serine threonine kinase; CLARITY-BPA, Consortium Linking Academic and Regulatory Insights on Bisphenol A Toxicity; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMSO, dimethyl sulfoxide-d6; ERK1/2, kinase 1/2 extracelular regulada por sinal; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; NF-κB, fator nuclear-kappa B; NLRP3, proteína receptora tipo NOD 3; pAkt, fosfo-serina trionina quinase; pERK1/2, fosfo-extracelular sinal-regulado quinase 1/2; pNF-κB, fator fosfonuclear-kappa B; qRT-PCR, reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real; UM-HMC-1, University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1; UM-HMC-3A, University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A.

## RESUMO

Objetivo: Investigar o impacto da exposição subcrônica in vivo ao Bisfenol A e seus efeitos in vitro sobre as linhagens celulares do carcinoma mucoepidermóide da glândula salivar humana.

Metodologia: Camundongos machos e fêmeas foram expostos ao Bisfenol A (30 mg/kg/dia). Foram analisadas glândulas salivares sublinguais e submandibulares

dos camundongos com deficiência de estrogênio induzido por ovariectomia ou de C57BL/6. A concentração de Bisfenol A nas glândulas salivares foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com armadilha de íons. A expressão gênica dos receptores de estrogênio alfa e beta foi quantificada em glândulas salivares de camundongos e linhas celulares (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1 e University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A). A viabilidade celular, a imunoglobulina p63 e Ki-67 e a expressão de proteínas-alvo relacionadas às vias de sobrevivência/proliferação foram avaliadas in vitro.

**Resultados:** O Bisfenol A perturbou a morfologia das glândulas submandibulares e sublinguais, particularmente em camundongos fêmeas, e aumentou a expressão dos receptores de estrogênio, efeitos que foram acompanhados por um acúmulo significativo de Bisfenol A nesses tecidos. Por outro lado, a ovariectomia afetou ligeiramente as mudanças morfológicas induzidas pelo Bisfenol A. In vitro, o Bisfenol A não afetou a proliferação de células neoplásicas, mas aumentou a expressão dos receptores de p63 e estrogênio. O sinal extracelular regulado pela cinase 1/2 fosforilação foi aumentado enquanto a fosforilação serina trionina quinase e a fosforilação nuclear fator-kappa B foram reduzidas.

**Conclusões:** Os dados atuais destacam um efeito potencialmente prejudicial do Bisfenol A sobre os tecidos das glândulas salivares e células tumorais das glândulas salivares. As vias dependentes de estrogênio podem orquestrar os efeitos do Bisfenol A, juntamente com as vias de sinalização pró-sobrevivência e aumento da expressão da p63.

**Palavras-chave:** Bisfenol A; produto químico perturbador do sistema endócrino; poluente ambiental; receptores de estrogênio; glândulas salivares.

## **1. INTRODUÇÃO**

O Bisfenol A é um dos compostos químicos de maior volume utilizados mundialmente na produção de numerosos produtos, como plásticos, papéis térmicos e materiais médicos e odontológicos (Frankowski et al., 2020; Geens et al., 2012; Marzouk et al., 2019). O Bisfenol A é um poluente ambiental ubiquamente distribuído (Ďurovcová et al., 2022) e tem sido consistentemente identificado no plasma (Kaddar

et al., 2009), nos fluidos placentários (Bonde et al., 2016), leite materno (Iribarne-Durán et al., 2022), sêmen (Castellini et al., 2022), urina (Castellini et al., 2022), e saliva (Gomes et al., 2020; Lopes-Rocha et al., 2022).

Múltiplos efeitos adversos potenciais induzidos pelo Bisfenol A foram documentados em humanos (Heindel et al., 2020; Patel et al., 2017; Prins et al., 2019; Vandenberg et al., 2020; Vom Saal & Vandenberg, 2021), tais como um impacto negativo na fertilidade masculina e feminina (Bonde et al., 2016; Karwacka et al., 2019), a associação com alguns distúrbios endócrinos e aumento da ocorrência de câncer de mama (Wan et al., 2022), endometrial (Caserta et al., 2022) e câncer de próstata (Di Donato et al., 2017). Em roedores, a exposição ao Bisfenol A pode induzir carcinoma mamário (Acevedo et al., 2013; Ayyanan et al., 2011; Durando et al., 2007; Wadia et al., 2013) e aumentar a sensibilidade da próstata à exposição ao hormônio adulto e o risco de neoplasia epitelial prostática (Almeida et al., 2021; Nelles et al., 2011; Nicholson et al., 2018; Taylor et al., 2020). Entretanto, agências reguladoras como a Food and Drug Administration continuam a endossar que níveis muito baixos de Bisfenol A são seguros e que efeitos adversos significativos dessa substância química em humanos não são biologicamente plausíveis (Maffini et al., 2017; Vandenberg et al., 2020; Vom Saal & Vandenberg, 2021).

A cavidade oral foi sugerida como sendo a principal via de contaminação do BPA (Gayraud et al., 2013; Guignard et al., 2016; Teegarden et al., 2015). É importante notar que esta substância química é capaz de interagir com receptores de estrogênio (Acconcia et al., 2015; Matthews et al., 2001), que são expressos em epitélio oral e queratinócitos, particularmente após a estimulação com o BPA (Almeida et al., 2021; Emfietzoglou et al., 2019).

Como tal, a exposição freqüente dos tecidos orais ao Bisfenol A levantou questões sobre uma possível ligação com a carcinogênese oral e orofaríngea (Almeida et al., 2021; Emfietzoglou et al., 2019), bem como com alterações citopatológicas e apoptose nas glândulas salivares (Çetin et al., 2021; Folia et al., 2013). De fato, a literatura recente demonstrou que a exposição crônica ao BPA resultou na degeneração das células acinares na glândula submandibular e no sistema de ductos (Bashir et al., 2022).

Nesta linha, sugere-se que a atividade cancerígena do Bisfenol A está ancorada nas glândulas derivadas da endoderme (Cuomo et al., 2017), levantando a hipótese de que as glândulas salivares são potenciais alvos e locais de acúmulo do

BPA. Estas descobertas podem estar associadas aos efeitos do Bisfenol A como um produto químico perturbador do sistema endócrino ou como um agente com potencial pró-oxidativo (Babu et al., 2013; Ďurovcová et al., 2022; Vandenberg et al., 2019; Vom Saal & Vandenberg, 2021). Além disso, a capacidade deste composto em interferir e/ou prevenir a ligação de hormônios naturais a seus receptores - mesmo em baixas concentrações - pode estar ligada a seus efeitos deletérios na homeostase das glândulas salivares (Emfietzoglou et al., 2019; Folia et al., 2013; Heindel et al., 2020; Patel et al., 2017; Prins et al., 2019).

A expressão de receptores de estrogênio em glândulas salivares humanas normais (Tsinti et al., 2009) e neoplásicas (Aquino et al., 2018) pode explicar a interferência do Bisfenol A nesses tecidos. Apesar disso, poucos estudos avaliando o impacto do Bisfenol A nas glândulas salivares estão disponíveis na literatura (Bashir et al., 2022; Çetin et al., 2021; Folia et al., 2013). O objetivo do presente estudo foi examinar a exposição ao BPA nas principais glândulas salivares de camundongos. Os efeitos potenciais deste produto químico sobre os tumores das glândulas salivares humanas foram explorados *in vitro*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Animais e protocolos experimentais**

Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas (5 semanas de idade e 15-25 g de peso) foram adquiridos do centro de cuidado animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. Os animais foram tratados de acordo com os regulamentos do Comitê de Ética Institucional (#387/2016), mantidos em um ciclo de 12 horas de luz/obscuridade sob temperatura controlada, recebendo uma dieta padrão e água *ad libitum*, e pesados semanalmente.

O primeiro conjunto de experimentos consistiu na exposição subcrônica ao Bisfenol A. Os animais machos (n=30) e fêmeas (n=30) foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle (água potável), veículo [0.05% de dimetil sulfoxido d6 (DMSO), Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EUA] e Bisfenol A [30 mg/kg/dia; Bisfenol A-(dimetil-d6) - C15D6H10O2; Sigma-Aldrich] (Almeida et al., 2021). O BPA foi diluído em água potável e somente garrafas de vidro foram usadas ao longo dos ensaios (Nuñez et al., 2018). Após seis semanas, os animais foram eutanizados com

uma overdose anestésica (300 mg/kg ketamina e 30 mg/kg xilazina) e as glândulas salivares sublingual e submandibular esquerda foram coletadas e fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%. As glândulas salivares sublinguais e submandibulares direitas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

O segundo conjunto de experimentos consistiu em um modelo de deficiência de estrogênio induzida por ovariectomia. Os animais (n=20) foram anestesiados (100 mg/kg ketamina e 10 mg/kg xilazina) e alocados aleatoriamente em quatro grupos: animais que ingeriram DMSO (sham); animais expostos ao Bisfenol A (sham); animais ovariectomizados que ingeriram DMSO; e animais ovariectomizados expostos ao Bisfenol A. A ovariectomia consistiu na excisão bilateral dos ovários. Em resumo, os ovários foram expostos e removidos, e a pele foi suturada imediatamente após o procedimento (grupos ovariectomizados). No grupo de controle cirúrgico (sham), os ovários foram expostos mas não removidos e a pele foi suturada posteriormente (Macari et al., 2015). Uma semana após a ovariectomia, os animais começaram a ingerir BPA (30 mg/kg/dia) ou veículo (0,05% DMSO) em água potável e continuaram o tratamento por seis semanas. Os animais foram então eutanizados com uma overdose anestésica e as principais glândulas salivares foram coletadas. Os tecidos foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%.

#### 2.1.1. Avaliação histomorfométrica

As seções de quatro- $\mu$ m de espessuras de material em parafina obtidas de cada animal foram coradas com hematoxilina e eosina. Um total de 10 campos em cada lâmina foram fotografados sob microscopia de luz com ampliação  $\times 20$  (DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para avaliação morfológica usando o software ImageJ (ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MA, EUA). A análise morfológica foi realizada como previamente definido (Nery et al., 2010). O número de ácinos e dutos excretores por mm<sup>2</sup> foi examinado na glândula salivar sublingual, enquanto o número de ácinos e túbulos granulares convolutos por mm<sup>2</sup> foi avaliado na glândula salivar submandibular (Folia et al., 2013). Todas as análises foram realizadas de forma cega por dois autores calibrados (G.K.S. e T.F.A.A.). Um terceiro autor (T.A.S.) resolveu quaisquer discrepâncias.

#### 2.1.2 Quantificação do Bisfenol A nas glândulas salivares

As glândulas salivares sublingual e submandibular direita foram usadas para determinar a concentração de Bisfenol A através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com armadilha de íons (Fernandez et al., 2017; Gomes et al., 2020). A extração e concentração dos analitos foram realizadas utilizando o método de microextração de fase líquida de fibra oca (Gomes et al., 2020).

## 2.2. Ensaio in vitro

### 2.2.1. Células

As linhagens celulares UM-HMC-1 (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1) e UM-HMC-3A (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A) foram utilizadas (gentilmente cedidas pelo Professor Fabio D. Nunes da Universidade de São Paulo, Brasil). As amostras celulares resultantes foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Waltham, MA, EUA) suplementado com 1% L-Glutamina (Invitrogen), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 20 ng/mL de fator de crescimento da epiderme (Sigma-Aldrich), 400 ng/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 5 µg de insulina (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL de nistatina (Sigma-Aldrich), e 1% de anfotericina B (Sigma-Aldrich). O regime antimicrobiano foi alterado para 5% de penicilina/streptomomicina (Invitrogen). As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência.

### 2.2.2. Teste de viabilidade celular da resazurina

Células foram chapeadas em quadruplo em duas réplicas biológicas independentes a uma densidade celular de  $4 \times 10^3$  células/poço em microplacas de 96 poços e incubadas durante a noite a 37°C em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Diferentes concentrações de Bisfenol A (1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM e 10 µM) foram testadas e comparadas com o grupo controle de veículos (0,05% DMSO). As células foram avaliadas após 48, 72 e 120 horas adicionando 0,01 mg/mL de resazurina (AlamarBlue, Thermo-Fisher Scientific Inc., Abingdon, UK) em DMEM (Gibco, Thermo-Fisher Scientific Inc.). As placas foram mantidas protegidas da luz e incubadas a 37°C por 4 horas em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A absorção foi avaliada usando um fluorômetro

Synergy 2 Multi-mode Microplate Reader (BioTek Instruments; Winooski, VT, EUA) com excitação de 530/25 nm e emissão de 590/35 nm. Um poço contendo meio sem resazurina foi empregado como controle de reação em branco.

### 2.2.3. Imunocitoquímica

As células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A foram laminadas a uma densidade celular de  $4 \times 10^5$  por poço em uma lamela de vidro adaptada a microplacas de 12 poços e incubadas a 37°C em uma atmosfera 95% umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas. As células foram tratadas com 50 nM de Bisfenol A e veículo (0,05% DMSO) por 48 horas. A análise imunocitoquímica foi realizada em triplicata usando a técnica do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase com anti-p63 (clone MC0221; 1:50, Medaysis, Livermore, CA, EUA) e anti-Ki-67 (clone MIB-1, 1:400, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) anticorpos primários. A quantificação de células positivas foi realizada por aquisição de imagem com um microscópio leve (O600R, Opticam, São Paulo, SP, Brasil) com ampliação  $\times 20$  usando um software integrado (Software Opticam Microscopy Technology OPTHD) e contou em 10 campos consecutivos com o software ImageJ.

### 2.2.4. Western Blotting

As células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A foram revestidas a uma densidade de  $3 \times 10^6$  células/poço em uma microplaca de 6 poços e tratadas com 50 nM Bisfenol A e veículo (0,05% DMSO) por 2 e 24 horas. Extratos de proteína celular foram adquiridos utilizando o CellLytic™ Reagente de lise/extração de células de mamíferos M (Sigma-Aldrich) com coquetéis inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich). A concentração de proteína foi determinada pelo método da proteína Bradford (Laboratórios Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Um total de 30 µg de proteína foi separado por eletroforese em gel de 10% de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida e transferido para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (GE HealthCare, Freiburg, Alemanha). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite sem gordura em soro fisiológico com tampão Tris contendo 10% de Tween 20. Anticorpos contra a fosfo-serina trionina quinase (pAkt, 4056, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), serina trionina quinase (Akt, 9272, Cell Signaling), fosfo-extracelular kinase 1/2 (pERK1/2, 4377, Cell Signaling), kinase 1/2 (ERK1/2, M5670, Sigma-Aldrich), fator fosfonuclear-kappa B (pNF-κB, 3033, Cell Signaling), e fator nuclear-kappa B (NF-κB, 8242, Cell

Signaling) foram empregados. As reações foram desenvolvidas usando o sistema Enhanced Chemiluminescence™ Western blotting system (GE Health-Care, Chicago, IL, EUA) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, 5174, Cell Signaling) foi usado como controle de carga. A análise densitométrica foi realizada utilizando o software ImageJ. Os resultados são relatados como a relação anticorpo fosforilado/ anticorpo total obtida a partir da densitometria das bandas.

### 2.3. Extração do mRNA do tecido do camundongo e das linhagens celulares e reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A expressão dos receptores de estrogênio alfa e beta foi quantificada pelo qRT-PCR em amostras de glândulas salivares de camundongos, assim como em linhas de células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A. O mRNA total foi extraído com reagente TRIzol (Thermo-Fisher Scientific Inc.) seguido de purificação da coluna (RNeasy Mini Kit, Qiagen Inc., Redwood City, CA, EUA). A qualidade e integridade das amostras de mRNA foram verificadas analisando 1 µL do mRNA total em um Bioanalisador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O DNA complementar foi sintetizado a partir do 2.5 µg RNA usando a enzima SuperScript VILO Master Mix transcriptase reverse (Thermo-Fisher Scientific Inc.). O sistema Rotor-Gene Q (Qiagen Inc.) foi empregado para a análise, e o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo-Fisher Scientific Inc.) foi aplicado. O protocolo de termociclagem consistiu em um estágio inicial de pré-incubação a 95°C por 10 minutos para aumentar a sensibilidade de detecção, 40 ciclos de amplificação começando a 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 1 segundo, seguido por um único estágio de resfriamento a 40°C por 10 segundos. Os resultados são descritos como o nível relativo de expressão gênica calculado em referência à expressão do controle interno GAPDH usando o método Ct e a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os seguintes genes alvo foram analisados ER $\alpha$  (NM\_001122742.1; Homo sapiens receptor de estrogênio 1 [ESR1]; forward: ATGAGAGCTGCCAACCTTTG; reverso: GGTTGGGTCAGTAAGCCCATC) para células de origem humana e (NM\_00132531.1 musmusculus receptor de estrogênio 1 alfa [Esr1]; forward: TTGAACCAGCAGGGTGCC; reverso: AGGCTTTGGTGTGTGAAGGGTC) para células de origem animal. Também, ER $\beta$  (NM\_00129172323; Homo sapiens receptor de estrogênio 2 [ESR2] forward: TGGAGTCTGGTCGTGTGAAG; reverso: ACTTCACCATTCCCCTTCG) para

células de origem humana e (NM\_207707.1 musmusculus receptor de estrogênio 2 beta [Ers2] forward: CTGTGATGAACTACAGTGTTTCCC; reverso: ACTTCACCATTCCTCCACTTCG: CACATTTGGGCTTGCAGTCTG) para células de origem animal.

#### 2.4. Análise estatística

O software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney, teste de comparação múltipla Kruskal-Wallis ou análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste post-hoc Dunnett. Para todas as análises, o nível de significância foi fixado em  $<0,05$ .

### 3. RESULTADOS

3.1. A exposição ao BPA resultou em seu acúmulo nas glândulas salivares e alteração da morfologia dos tecidos em camundongos fêmeas.

A exposição subcrônica ao Bisfenol A (30 mg/kg/dia) resultou em mudanças na morfologia das glândulas submandibulares e sublinguais das fêmeas. Houve uma redução significativa no número de ácinos e túbulos granulares convolutos nas glândulas submandibulares, bem como uma diminuição no número de ácinos e ductos excretorios nas glândulas sublingual ( $p<0,05$ ) em relação ao veículo ( $p>0,05$ ) (Figuras 1A e 1B). Não foram observadas alterações morfológicas nas glândulas salivares sublingual ou submandibular dos machos expostos ao Bisfenol A. Também não houve alterações no peso da glândula salivar entre os grupos (dados não mostrados).

Em seguida, examinamos a concentração de Bisfenol A reunindo glândulas salivares sublinguais e submandibulares dos camundongos. A cromatografia gasosa revelou um acúmulo significativo de BPA em animais expostos a este produto químico em comparação com animais que ingeriram apenas 0,05% de DMSO (veículo) ( $p=0,01$ ) (Figura 1C).

3.2. Regulação de receptores de estrogênio nas glândulas salivares após a exposição ao Bisfenol A

Semelhante com as mudanças induzidas pelo Bisfenol A acumulando-se no tecido da glândula salivar, níveis aumentados de mRNA dos receptores de estrogênio para alfa ( $p=0,02$ ) e beta ( $p=0,01$ ) foram observados nas glândulas salivares submandibulares de animais expostos ao BPA em comparação com o grupo veículo (Figuras 2A e 2B).

### 3.3. A deficiência de estrogênio modificou a resposta da glândula salivar ao Bisfenol A

Com base na atividade estrogênica do Bisfenol A (Julien et al., 2018; Okuda et al., 2010), nós levantamos a hipótese de que a redução da disponibilidade de estrogênio por ovariectomia aumentaria os efeitos deletérios do Bisfenol A. Camundongos ovariectomizados expostos ao BPA mostraram um número semelhante de ácinos nas glândulas submandibulares em comparação com o respectivo veículo ( $p>0,05$ ). Em contraste, entre os animais do grupo controle, houve uma diminuição do número de ácinos nos camundongos tratados com Bisfenol A ( $p=0,03$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada quando se compararam os animais do grupo controle e ovariectomizados expostos ao Bisfenol A ( $p>0,05$ ) (Figura 3A). Com relação aos valores dos túbulos granulados convolutos no grupo de animais ovariectomizados, houve um aumento no número de TGC nos animais expostos ao Bisfenol A em comparação com o grupo veículo ( $p=0,01$ ). No grupo controle, os animais expostos ao BPA tinham valores mais baixos de túbulos granulares convolutos em comparação com o grupo veículo ( $p=0,04$ ). Além disso, ao comparar os animais expostos ao Bisfenol A, os ratos ovariectomizados apresentaram valores mais altos de túbulos granulares convolutos do que o grupo controle ( $p=0,01$ ) (Figura 3B).

### 3.4. O Bisfenol A não afetou a proliferação de células neoplásicas, mas aumentou a expressão dos receptores p63 e de estrogênio in vitro

A fim de resumir a histopatologia dos tumores malignos das glândulas salivares, examinamos um par de linhagens de células de carcinoma mucoepidermóide, UM-HMC-1 e UM-HMC-3A (Warner et al., 2013). Em primeiro lugar, determinamos pelo ensaio de resazurina se o Bisfenol A em diferentes concentrações (1 nM, 10 nM, 50

nM, 100 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) induziu citotoxicidade. Houve uma significância na dose de 1 nM ( $p=xxx$ ). Embora não significativo, foi observada uma diminuição na viabilidade celular a partir de 100 nM. Com base nestes resultados, a concentração de 50 nM foi utilizada para ensaios adicionais (Figuras 4A e 4B).

A seguir avaliamos a expressão de Ki-67 e p63 por imunocitoquímica. Nenhuma mudança no índice de proliferação celular medido pela porcentagem Ki-67 foi observada para as linhagens de células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A em comparação com o veículo e o Bisfenol A (dados não mostrados). Por outro lado, houve um aumento na expressão p63 nas linhagens de células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A tratadas com Bisfenol A em comparação com o veículo ( $p<0,05$  e  $p=0,03$ , respectivamente) (Figuras 5A e 5B).

Para entender melhor o mecanismo pelo qual o BPA poderia interferir no comportamento das células neoplásicas, analisamos os efeitos deste químico sobre as proteínas-alvo relacionadas às vias de sobrevivência e proliferação (isto é, pAkt, Akt, pERK1/2, ERK1/2, pNF- $\kappa$ B, e NF- $\kappa$ B). Houve uma redução na fosforilação Akt após 2 horas de exposição ao Bisfenol A para ambas as linhagens celulares, bem como após 24 horas para UM-HMC-3A. Além disso, uma redução da fosforilação do NF- $\kappa$ B após 2 horas de exposição ao Bisfenol A foi detectada para ambas as linhagens de células. Em contraste, a fosforilação ERK1/2 foi aumentada para ambas as linhagens de células em 24 horas (Figura 5C e Tabela Complementar 1).

Analisamos então a expressão dos receptores de estrogênio alfa e beta nas linhagens de células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A tratadas com 50 nM bisfenol A e 0,05% DMSO (veículo). Uma expressão aumentada dos receptores de estrogênio alfa só foi observada no UM-HMC-3A tratado com BPA em comparação com o respectivo grupo veículo ( $p<0,001$ ) (Figuras 5D e 5E).

#### **4. DISCUSSÃO**

Aqui, demonstramos que a exposição ao Bisfenol A resultou em seu acúmulo significativo nas glândulas salivares, um efeito acompanhado de mudanças morfológicas nas glândulas submandibulares e sublingual, particularmente em camundongos fêmeas, e aumento da expressão dos receptores de estrogênio. Entretanto, a redução na disponibilidade de estrogênio, ou seja, no modelo de ovariectomia, teve um leve impacto nas mudanças morfológicas induzidas pelo

Bisfenol A, sem modificações adicionais nos ácinos, mas com um aumento no número de túbulos granulares convolutos nas glândulas submandibulares.

Os roedores mostram um notável dimorfismo sexual molecular e funcional das glândulas salivares (Mukaibo et al., 2019), que reflete o efeito dos hormônios esteróides sobre a morfogênese e os processos secretores desses órgãos (Yamamoto et al., 2018). Os resultados do presente estudo revelaram que as fêmeas são mais suscetíveis à ruptura da glândula salivar induzida pela exposição subcrônica ao Bisfenol A do que os camundongos machos.

Entretanto, a exposição oral ao BPA (25 mg/kg, três vezes por semana durante 60 dias) causou degeneração de células acinares e sistemas de dutos nas glândulas submandibulares de camundongos machos (Bashir et al., 2022). Em outro estudo, ratos expostos ao Bisfenol A (130 mg/kg por 28 dias) apresentaram alterações citopatológicas e apoptose celular nas glândulas salivares, além de um aumento significativo nos parâmetros de estresse oxidativo tecidual (Çetin et al., 2021). Em linha com um estudo anterior, o BPA induziu mudanças microscópicas significativas nas estruturas acinares das glândulas submandibulares de forma dose-dependente, enquanto que poucos efeitos foram observados sobre a morfometria nos túbulos granulares convolutos, mesmo em altas doses (Folia et al., 2013).

Os mecanismos potenciais que mediam os efeitos do Bisfenol A sobre as glândulas salivares compreendem suas propriedades pró-oxidativas (Çetin et al., 2021), a ativação de vias inflamatórias (Wang et al., 2020), e seu papel como produto químico perturbador do sistema endócrino (por exemplo, através da sinalização do receptor de estrogênio) (Babu et al., 2013; Vandenberg et al., 2019; Vom Saal & Vandenberg, 2021). Nossos dados sugerem que, pelo menos em parte, as alterações induzidas pelo Bisfenol A nas glândulas salivares abrangem receptores de estrogênio, que são expressos sob condições de estado estável (Tsinti et al., 2009) e regulados pela exposição ao Bisfenol A. Consistentemente, a capacidade do Bisfenol A de interferir e/ou prevenir a ligação de hormônios naturais a seus receptores - mesmo em baixas concentrações - pode estar ligada aos efeitos deletérios deste produto químico na homeostase da glândula salivar (Emfietzoglou et al., 2019; Folia et al., 2013). Além disso, em condições inflamatórias que afetam as glândulas salivares, como a síndrome de Sjögren, as ações do bisfenol A via receptores de estrogênio também causaram mudanças na morfologia e nos eventos imunoinflamatórios implicados na progressão e deterioração da doença (Wang et al., 2020). Entretanto, o impacto da

exposição ao Bisfenol A em pacientes que sofrem de condições de glândulas salivares pré-existentes precisa ser explorado com base na sobreposição da fisiopatologia.

Nas glândulas salivares neoplásicas humanas, a expressão dos receptores de estrogênio (Aquino et al., 2018) é uma possível ligação com a atividade cancerígena do Bisfenol A (Cuomo et al., 2017). No estudo atual, examinamos as ações do BPA em um par de linhagens de células de carcinoma mucoepidermóide (Warner et al., 2013) e observamos que, notadamente, esta substância química desencadeou a expressão alfa do receptor de estrogênio no UM-HMC-3A. Isto corrobora o fato de que o carcinoma multifocal da glândula mamária de roedores fêmeas, devido à exposição ao Bisfenol A, tende a ser alfa positivo no receptor de estrogênio (Ruiz et al., 2021).

Enquanto não foram observadas mudanças morfológicas ou proliferativas substanciais em resposta ao Bisfenol A, houve um aumento na fosforilação ERK1/2 e uma redução na fosforilação Akt e NF- $\kappa$ B. Dados anteriores revelaram que o Bisfenol A não induz apoptose nas linhagens de células submandibulares humanas, mas reduz o número de células viáveis de forma dependente da concentração (Terasaka et al., 2005). Por outro lado, foi sugerido que o BPA poderia atuar como um disruptor da atividade inflamatória regulando as vias da NF- $\kappa$ B/MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e da NLRP3 (proteína receptora do tipo NOD 3) ativação inflamatória (Lee, Ha, & Kim, 2020). A via ERK1/2 é reconhecida como um sinal de sobrevivência para várias células neoplásicas (Balmanno & Cook, 2009), incluindo linhagens de células de carcinoma mucoepidermóide salivar (Handra-Luca et al., 2003). Entretanto, o significado da ativação/inativação induzida por Bisfenol A das vias de sinalização merece mais investigação. Alternativamente, as células orais do carcinoma escamoso estimuladas com Bisfenol A mostraram aumento da fosforilação da proliferação de Akt, ERK e NF- $\kappa$ B (Almeida et al., 2021).

O BPA também desencadeou a expressão p63 em ambas as linhas de células neoplásicas avaliadas neste estudo. O gene p63 é um membro da família p53 que desempenha um papel importante na identidade e diferenciação celular das células-tronco, sendo um marcador de diferenciação mioepitelial em neoplasias benignas e malignas da glândula salivar (Sivakumar et al., 2022). p63 também inibe a apoptose celular e funciona como um oncogene em diferentes tumores orais (Chen et al., 2018). Por exemplo, sua expressão está significativamente correlacionada com o grau histológico no carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares (Taghavi et al., 2020). Nas glândulas mamárias de roedores fêmeas, a exposição pré-natal ao

Bisfenol A aumentou o número de doenças potencialmente malignas, acompanhadas por ductos hiperplásicos e células mioepiteliais marcadas com p63 (Durando et al., 2007). Da mesma forma, a exposição ao desenvolvimento de xenoestrogênios perturba o padrão de expressão normal do p63 e a citodiferenciação uterina adequada, um efeito relacionado à metaplasia escamosa glandular (Vigizzi et al., 2015).

A cavidade oral é provavelmente a principal via de contaminação pelo Bisfenol A (Gayrard et al., 2013; Guignard et al., 2016; Teegarden et al., 2015), o que é consistente com uma alta concentração desta substância química detectada no espaço orofaríngeo, mucosa bucal e saliva (Almeida et al., 2021; Emfietzoglou et al., 2019; Gomes et al., 2020). Além disso, alguns materiais restauradores dentários produzem uma liberação significativa de Bisfenol A na saliva (Gomes et al., 2020; Lopes-Rocha et al., 2022). A literatura recente demonstrou que a exposição subcrônica ao BPA perturba a homeostase de queratinócitos orais, alterando a atividade proliferativa e as vias pró-sobreviventes e inflamatórias (Almeida et al., 2021). Enquanto para humanos é difícil estimar a exposição ao Bisfenol A, resultados divergentes e interpretações de dados sobre esta substância química em estudos de toxicologia têm sido descritos em modelos animais, nos quais uma ampla gama de doses é empregada. Por exemplo, o Consortium Linking Academic and Regulatory Insights on Bisphenol A Toxicity (CLARITY-BPA) testou níveis de dose de 2,5 a 25.000 µg kg pb/dia (Heindel et al., 2020; Leung et al., 2020), e outros testaram doses ainda mais altas desta substância química (Camacho et al., 2015). Vale mencionar que adotamos como referência um estudo anterior que mostrou mudanças induzidas pelo Bisfenol A nos tecidos orais de ratos (Folia et al., 2013). O citado estudo testou doses diárias de 5 µg/kg a 12.500 µg/kg de peso corporal e, nessas doses, o Bisfenol A não teve efeito sobre o epitélio oral (Folia et al., 2013). Assim, realizamos um experimento piloto com doses de 15 e 30 mg/kg e como não foram observadas alterações epiteliais na dose de 15 mg/kg, a dose de 30 mg/kg foi empregada no estudo atual.

O presente estudo apresenta deficiências que devem ser reconhecidas. Apesar das limitações que se aplicam aos modelos animais, especialmente no contexto da síntese do complexo processo de mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao resgate do Bisfenol A nos tecidos das glândulas salivares, coletivamente, nossos resultados apoiam a exposição de curto prazo a esta substância química. Isto corrobora o fato de que baixas doses de BPA induzem efeitos adversos marcados,

em particular o notável número de efeitos observados em doses 20.000 vezes maiores do que a atual dose "segura" de Bisfenol A para humanos (Vandenberg et al., 2019).

Em última análise, de relevância clínica para o conceito de que o envelhecimento está associado a uma diminuição dos hormônios sexuais (por exemplo, andrógenos na andropausa e estrogênios na pós-menopausa), uma compreensão das mudanças dependentes da idade na interação com as doenças das glândulas salivares desencadeadas pelo BPA, incluindo, por exemplo, amostras humanas, certamente aprofundaria o conhecimento dos processos fisiopatológicos de forma translacional.

## **5. CONCLUSÃO**

Em resumo, as presentes descobertas evidenciam uma ligação entre a BPA e mudanças morfológicas nas glândulas salivares, um mecanismo, pelo menos em parte, dependente do estrogênio. Nas células neoplásicas, a BPA modificou as vias de sinalização pró-sobrevivência e aumentou a expressão da p63. Estas descobertas representam uma preocupação adicional sobre os efeitos prejudiciais da BPA nos tecidos orais, particularmente salivares, e as potenciais repercussões a longo prazo.

Contribuições dos autores: T.F.A.A., A.M.L., e T.A.S. conceituaram o estudo, realizaram a análise experimental e redigiram o manuscrito. A J.A.A.A., G.K.S., S.R.O., R.A.M. e I.M.A.D. participaram da análise dos dados e fizeram uma revisão crítica. A T.F.A.A., A.M.L., Z.L.C., H.C.M., S.M. e T.A.S. forneceram o modelo animal, ensaios experimentais, analisaram dados e realizaram revisão crítica. Todos os autores leram e aprovaram a versão final a ser publicada e concordam em ser responsáveis por todos os aspectos do estudo.

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (#302157/2017-4; #305077/2021-0), Brasil.

Declaração de Interesse Concorrente: Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

Agradecimentos: Este estudo foi apoiado pela Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código Financeiro 001), Brasil. J.A.A.A.A. e S.R.O. são bolsistas. R.A.M., Z.L.C., A.M.L. e T.A.S são bolsistas de pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil. A Sra. E. Greene forneceu a edição em inglês do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

Acconcia, F., Pallottini, V., & Marino, M. (2015). Molecular mechanisms of action of BPA. *Dose-Response*, 13(4), 1559325815610582. <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>

Acevedo, N., Davis, B., Schaeberle, C. M., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2013). Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 1040–1046. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306734>

Almeida, T. F. A., Oliveira, S. R., Mayra da Silva, J., Fernandes de Oliveira, A. L., de Lourdes Cardeal, Z., Menezes, H. C., Gomes, J. M., Campolina-Silva, G. H., Oliveira, C. A., Macari, S., Garlet, G. P., Alves Diniz, I. M., Leopoldino, A. M., & Aparecida Silva, T. (2021). Effects of high-dose bisphenol A on the mouse oral mucosa: A possible link with oral cancers. *Environmental Pollution*, 286, 117296. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117296>

Aquino, G., Collina, F., Sabatino, R., Cerrone, M., Longo, F., Ionna, F., Losito, N. S., De Cecio, R., Cantile, M., Pannone, G., & Botti, G. (2018). Sex hormone receptors in benign and malignant salivary gland tumors: prognostic and predictive role. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 399. <https://doi.org/10.3390/ijms19020399>

Ayyanan, A., Laribi, O., Schuepbach-Mallepell, S., Schrick, C., Gutierrez, M., Tanos, T., Lefebvre, G., Rougemont, J., Yalcin-Ozuysal, O., & Brisken, C. (2011). Perinatal exposure to bisphenol a increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Molecular Endocrinology*, 25(11), 1915–1923. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1129>

Babu, S., Uppu, S., Claville, M. O., & Uppu, R. M. (2013). Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(4), 273–280. <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.753969>

Balmanno, K., & Cook, S. J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death and Differentiation*, 16(3), 368–377. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.148>

Bashir, D. W., Ahmed, Y. H., & El-Sakhawy, M. A. (2022). Ameliorative effect of vitamin E and selenium against bisphenol A-induced toxicity in spinal cord and submandibular salivary glands of adult male albino rats. *International Journal of Environmental Health Research*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2067327>

Bonde, J. P., Flachs, E. M., Rimborg, S., Glazer, C. H., Giwercman, A., Ramlau-Hansen, C. H., Hougaard, K. S., Høyer, B. B., Hærvig, K. K., Petersen, S. B., Rylander, L., Specht, I. O., Toft, G., & Bräuner, E. V. (2016). The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 23(1), 104–125. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw036>

Camacho, L., Basavarajappa, M. S., Chang, C. W., Han, T., Kobets, T., Koturbash, I., Surratt, G., Lewis, S. M., Vanlandingham, M. M., Fuscoe, J. C., Gamboa da Costa, G., Pogribny, I. P., & Delclos, K. B. (2015). Effects of oral exposure to bisphenol A on gene expression and global genomic DNA methylation in the prostate, female mammary gland, and uterus of NCTR Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.009>

Caserta, D., De Marco, M. P., Besharat, A. R., & Costanzi, F. (2022). Endocrine disruptors and endometrial cancer: molecular mechanisms of action and clinical implications, a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 2956. <https://doi.org/10.3390/ijms23062956>

Castellini, C., Muselli, M., Parisi, A., Totaro, M., Tienforti, D., Cordeschi, G., Giorgio Baroni, M., Maccarrone, M., Necozone, S., Francavilla, S., & Barbonetti, A. (2022). Association between urinary bisphenol A concentrations and semen quality: a meta-analytic study. *Biochemical Pharmacology*, 197, 114896. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114896>

Çetin, Y. S., Altındağ, F., & Berköz, M. (2021). Protective role of resveratrol and apigenin against toxic effects of bisphenol a in rat salivary gland. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.2011310>

Chen, Y., Peng, Y., Fan, S., Li, Y., Xiao, Z. X., & Li, C. (2018). A double dealing tale of p63: an oncogene or a tumor suppressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(6), 965–973. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2666-y>

Cuomo, D., Porreca, I., Cobellis, G., Tarallo, R., Nassa, G., Falco, G., Nardone, A., Rizzo, F., Mallardo, M., & Ambrosino, C. (2017). Carcinogenic risk and bisphenol A exposure: a focus on molecular aspects in endoderm derived glands. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 457, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.027>

Di Donato, M., Cerner, G., Giovannelli, P., Galasso, G., Bilancio, A., Migliaccio, A., & Castoria, G. (2017). Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 457, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.045>

Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2007). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 80–86. <https://doi.org/10.1289/ehp.9282>

Đurovcová, I., Kyzek, S., Fabová, J., Makuková, J., Gálová, E., & Ševčovičová, A. (2022). Genotoxic potential of bisphenol A: a review. *Environmental Pollution*, 306, 119346. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119346>

Emfietzoglou, R., Spyrou, N., Mantzoros, C. S., & Dalamaga, M. (2019). Could the endocrine disruptor bisphenol-A be implicated in the pathogenesis of oral and oropharyngeal cancer? Metabolic considerations and future directions. *Metabolism*, 91, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.007>

Fernandez, M., André, L. C., & Cardeal, Z. L. (2017). Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. *Journal of Chromatography. A*, 1481, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.043>

Folia, M., Boudalia, S., Ménétrier, F., Decocq, L., Pasquis, B., Schneider, C., Bergès, R., Artur, Y., & Canivenc-Lavier, M. C. (2013). Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component bisphenol A in adult male rats. *The Laryngoscope*, 123(6), 1405–1410. <https://doi.org/10.1002/lary.23791>

Frankowski, R., Zgoła-Grześkowiak, A., Grześkowiak, T., & Sójka, K. (2020). The presence of bisphenol A in the thermal paper in the face of changing European regulations - a comparative global research. *Environmental Pollution*, 265(Pt A), 114879. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114879>

Gayrard, V., Lacroix, M. Z., Collet, S. H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P. L., & Picard-Hagen, N. (2013). High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environmental Health Perspectives*, 121(8), 951–956. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206339>

Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A. M., Pussemier, L., Scippo, M. L., Van Loco, J., & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3725–3740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.059>

Gomes, J. M., Almeida, T., da Silva, T. A., de Lourdes Cardeal, Z., & Menezes, H. C. (2020). Saliva biomonitoring using LPME-GC/MS method to assess dentistry exposure to plasticizers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(28), 7799–7810.

<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02908-x>

Guignard, D., Gauderat, G., Gayrard, V., Lacroix, M. Z., Picard-Hagen, N., Puel, S., Toutain, P. L., & Viguié, C. (2016). Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.004>

Handra-Luca, A., Bilal, H., Bertrand, J. C., & Fouret, P. (2003). Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation. *The American Journal of Pathology*, 163(3), 957–967. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63455-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63455-4)

Heindel, J. J., Belcher, S., Flaws, J. A., Prins, G. S., Ho, S. M., Mao, J., Patisaul, H. B., Ricke, W., Rosenfeld, C. S., Soto, A. M., Vom Saal, F. S., & Zoeller, R. T. (2020). Data integration, analysis, and interpretation of eight academic CLARITY-BPA studies. *Reproductive Toxicology*, 98, 29–60. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.05.014>

Iribarne-Durán, L. M., Peinado, F. M., Freire, C., Castellero-Rosales, I., Artacho-Cordón, F., & Olea, N. (2022). Concentrations of bisphenols, parabens, and benzophenones in human breast milk: a systematic review and meta-analysis. *The Science of the Total Environment*, 806(Pt 1), 150437. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150437>

Julien, B., Pinteur, C., Vega, N., Labaronne, E., Vidal, H., Naville, D., & Le Magueresse-Battistoni, B. (2018). Evidence for estrogeno-mimetic effects of a mixture of low-dose pollutants in a model of ovariectomized mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.11.008>

Kaddar, N., Bendridi, N., Harthé, C., de Ravel, M. R., Bienvenu, A. L., Cuilleron, C. Y., Mappus, E., Pugeat, M., & Déchaud, H. (2009). Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 645(1-2), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.036>

Karwacka, A., Zamkowska, D., Radwan, M., & Jurewicz, J. (2019). Exposure to modern, widespread environmental endocrine disrupting chemicals and their effect on the reproductive potential of women: an overview of current epidemiological evidence. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 22(1), 2–25. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1358828>

Lee, H. W., Ha, S. K., & Kim, Y. (2020). Bisphenol A disrupts inflammatory responses via Nod-like receptor protein 3 pathway in macrophages. *Applied Biological Chemistry*, 63(78). doi: 10.1186/s13765-020-00562-6.

Leung, Y. K., Biesiada, J., Govindarajah, V., Ying, J., Kendler, A., Medvedovic, M., & Ho, S. M. (2020). Low-dose bisphenol A in a rat model of endometrial cancer: a CLARITY-BPA study. *Environmental Health Perspectives*, 128(12), 127005. <https://doi.org/10.1289/EHP6875>

Lopes-Rocha, L., Hernandez, C., Gonçalves, V., Pinho, T., & Tiritan, M. E. (2022). Analytical methods for determination of BPA released from dental resin composites and related materials: a systematic review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2093097>

Macari, S., Duffles, L. F., Queiroz-Junior, C. M., Madeira, M. F., Dias, G. J., Teixeira, M. M., Szawka, R. E., & Silva, T. A. (2015). Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. *Archives of Oral Biology*, 60(2), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.11.010>

Maffini, M. V., Neltner, T. G., & Vogel, S. (2017). We are what we eat: regulatory gaps in the United States that put our health at risk. *PLoS Biology*, 15(12), e2003578. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003578>

Marzouk, T., Sathyanarayana, S., Kim, A. S., Seminario, A. L., & McKinney, C. M. (2019). A systematic review of exposure to bisphenol A from dental treatment. *JDR Clinical and Translational Research*, 4(2), 106–115. <https://doi.org/10.1177/2380084418816079>

Matthews, J. B., Twomey, K., & Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chemical Research in Toxicology*, 14(2), 149–157. <https://doi.org/10.1021/tx0001833>

Mukaibo, T., Gao, X., Yang, N. Y., Oei, M. S., Nakamoto, T., & Melvin, J. E. (2019). Sexual dimorphisms in the transcriptomes of murine salivary glands. *FEBS Open Bio*, 9(5), 947–958. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12625>

Nelles, J. L., Hu, W. Y., & Prins, G. S. (2011). Estrogen action and prostate cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 6(3), 437–451. <https://doi.org/10.1586/eem.11.20>

Nery, L. R., Moreira, C. R., Cestari, T. M., Taga, R., & Damante, J. H. (2010). Postmortem acinar autolysis in rat sublingual gland: a morphometric study. *Journal of Applied Oral Science*, 18(5), 509–514. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572010000500014>

Nicholson, T. M., Nguyen, J. L., Levenson, G. E., Taylor, J. A., Vom Saal, F. S., Wood, R. W., & Ricke, W. A. (2018). Endocrine disruptor bisphenol A is implicated in urinary voiding dysfunction in male mice. *American Journal of Physiology. Renal physiology*, 315(5), F1208–F1216. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00582.2017>

Núñez, P., Arguelles, J., & Perillan, C. (2018). Short-term exposure to bisphenol A affects water and salt intakes differently in male and ovariectomised female rats. *Appetite*, 120, 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.10.018>

Okuda, K., Takiguchi, M., & Yoshihara, S. (2010). In vivo estrogenic potential of 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene, an active metabolite of bisphenol A, in uterus of ovariectomized rat. *Toxicology Letters*, 197(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.04.017>

Patel, S., Brehm, E., Gao, L., Rattan, S., Ziv-Gal, A., & Flaws, J. A. (2017). Bisphenol A exposure, ovarian follicle numbers, and female sex steroid hormone

levels: results from a CLARITY-BPA study. *Endocrinology*, 158(6), 1727–1738. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1887>

Prins, G. S., Patisaul, H. B., Belcher, S. M., & Vandenberg, L. N. (2019). CLARITY-BPA academic laboratory studies identify consistent low-dose Bisphenol A effects on multiple organ systems. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 125 Suppl 3(Suppl 3), 14–31. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13125>

Ruiz, T. F. R., Colleta, S. J., Zuccari, D. A. P. C., Vilamaior, P. S. L., Leonel, E. C. R., & Taboga, S. R. (2021). Hormone receptor expression in aging mammary tissue and carcinoma from a rodent model after xenoestrogen disruption. *Life Sciences*, 285, 120010. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120010>

Sivakumar, N., Narwal, A., Pandiar, D., Devi, A., Anand, R., Bansal, D., & Kamboj, M. (2022). Diagnostic utility of p63/p40 in the histologic differentiation of salivary gland tumors: a systematic review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 133(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2021.07.010>

Taghavi, N., Yazdani, F., Akbarzadeh Baghban, A., Sargolzaei, S., & Kardouni Khoozestani, P. (2020). Comparative analysis of p63, maspin and matrix metalloproteinase 2 expression in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)*, 21(2), 95–101. <https://doi.org/10.30476/DENTJODS.2019.77868.0>

Taylor, J. A., Jones, M. B., Besch-Williford, C. L., Berendzen, A. F., Ricke, W. A., & S Vom Saal, F. (2020). Interactive effects of perinatal BPA or DES and adult testosterone and estradiol exposure on adult urethral obstruction and bladder, kidney, and prostate pathology in male mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3902. <https://doi.org/10.3390/ijms21113902>

Teegarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Yang, X., Fisher, J. W., Seryak, L. M., & Doerge, D. R. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: evidence against sublingual absorption following ingestion in soup.

*Toxicology and Applied Pharmacology*, 288(2), 131–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.009>

Terasaka, H., Kadoma, Y., Sakagami, H., & Fujisawa, S. (2005). Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells. *Anticancer Research*, 25(3B), 2241–2247.

Tsinti, M., Kassi, E., Korkolopoulou, P., Kapsogeorgou, E., Moutsatsou, P., Patsouris, E., & Manoussakis, M. N. (2009). Functional estrogen receptors alpha and beta are expressed in normal human salivary gland epithelium and apparently mediate immunomodulatory effects. *European Journal of Oral Sciences*, 117(5), 498–505.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00659.x>

Vandenberg, L. N., Hunt, P. A., & Gore, A. C. (2019). Endocrine disruptors and the future of toxicology testing - lessons from CLARITY-BPA. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(6), 366–374. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0173-y>

Vandenberg, L. N., Prins, G. S., Patisaul, H. B., & Zoeller, R. T. (2020). The use and misuse of historical controls in regulatory toxicology: lessons from the CLARITY-BPA study. *Endocrinology*, 161(5), bqz014. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqz014>

Vigizzi, L., Bosquiazzo, V. L., Kass, L., Ramos, J. G., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2015). Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 52, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.01.011>

Vom Saal, F. S., & Vandenberg, L. N. (2021). Update on the health effects of bisphenol A: overwhelming evidence of harm. *Endocrinology*, 162(3), bqaa171. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa171>

Wadia, P. R., Cabaton, N. J., Borrero, M. D., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Shioda, T., & Soto, A. M. (2013). Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PLoS One*, 8(5), e63902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063902>

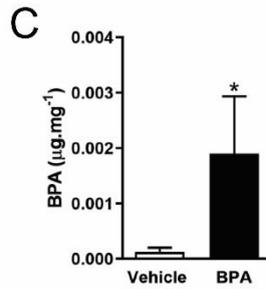
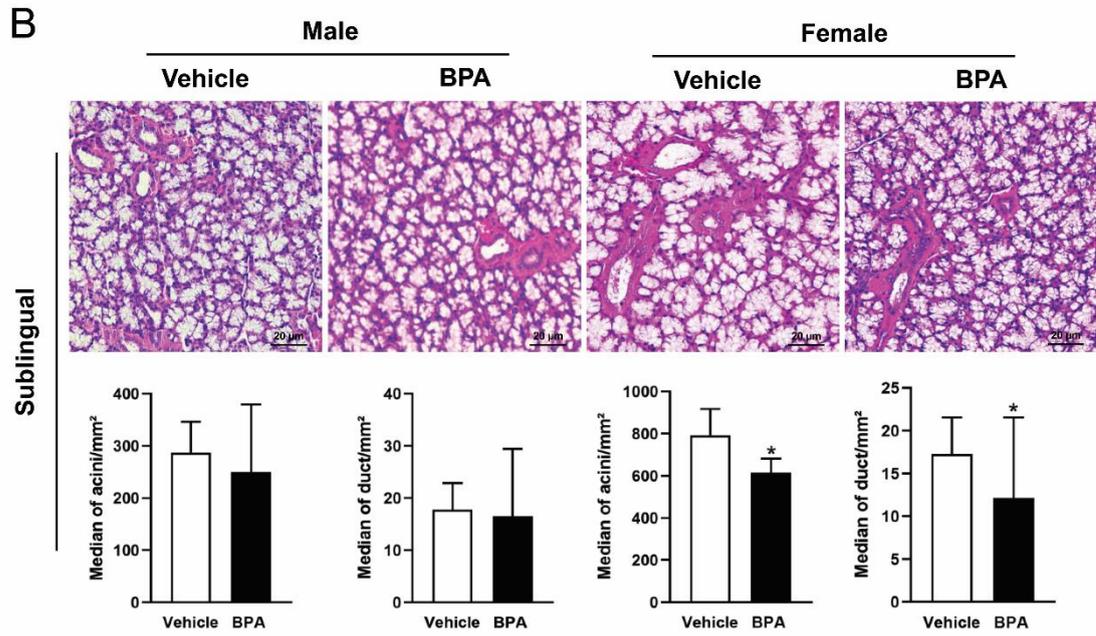
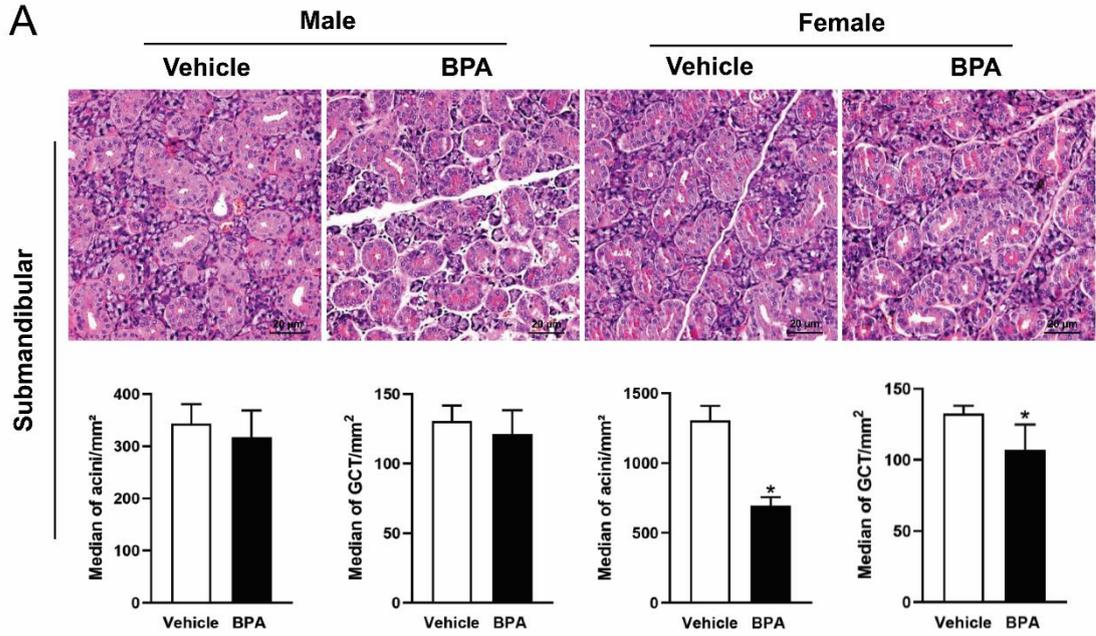
Wan, M., Co, V. A., & El-Nezami, H. (2022). Endocrine disrupting chemicals and breast cancer: a systematic review of epidemiological studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(24), 6549–6576. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1903382>

Wang, J., She, C., Li, Z., Tang, N., Xu, L., Liu, Z., & Liu, B. (2020). *In vitro* impact of bisphenol A on maturation and function of monocyte-derived dendritic cells in patients with primary Sjögren's syndrome. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 42(1), 28–36. <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1706554>

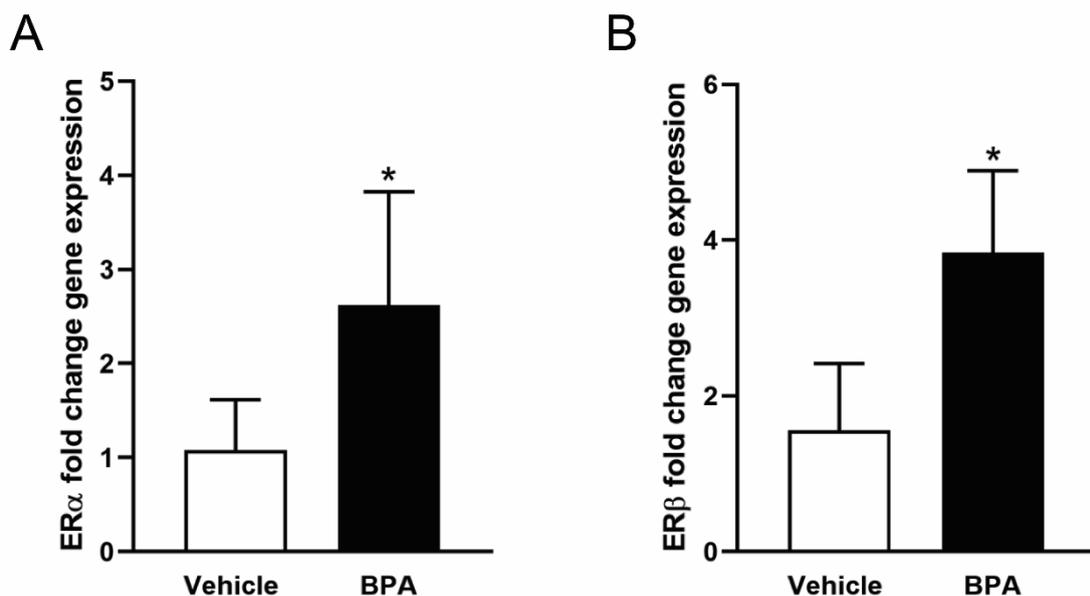
Warner, K. A., Adams, A., Bernardi, L., Nor, C., Finkel, K. A., Zhang, Z., McLean, S. A., Helman, J., Wolf, G. T., Divi, V., Queimado, L., Kaye, F. J., Castilho, R. M., & Nör, J. E. (2013). Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncology*, 49(11), 1059–1066. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.08.004>

Yamamoto, M., Nakata, H., Kumchantuek, T., Adhapanyanich, K., & Iseki, S. (2018). Distinct hormonal regulation of two types of sexual dimorphism in submandibular gland of mice. *Cell and Tissue Research*, 371(2), 261–272. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2719-4>

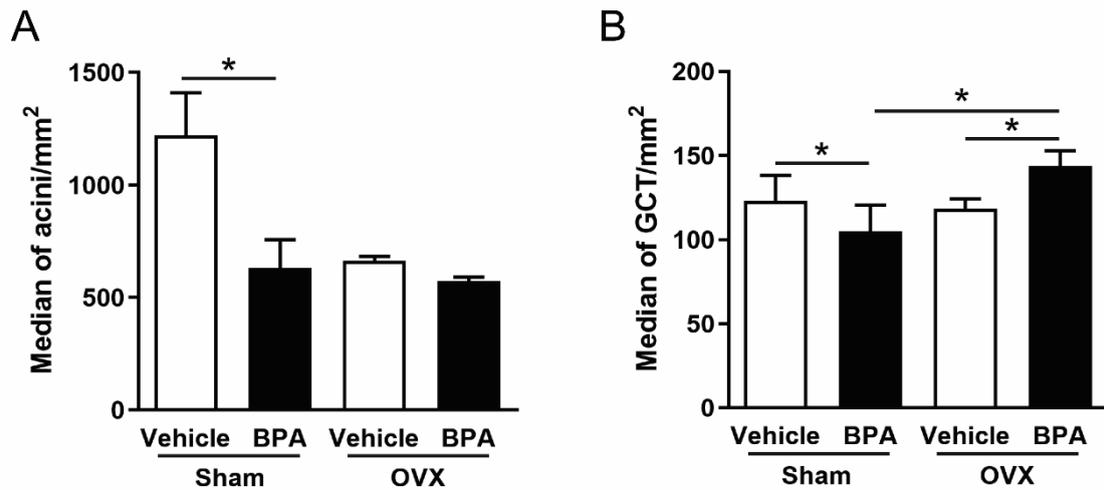
FIGURAS COM LEGENDAS



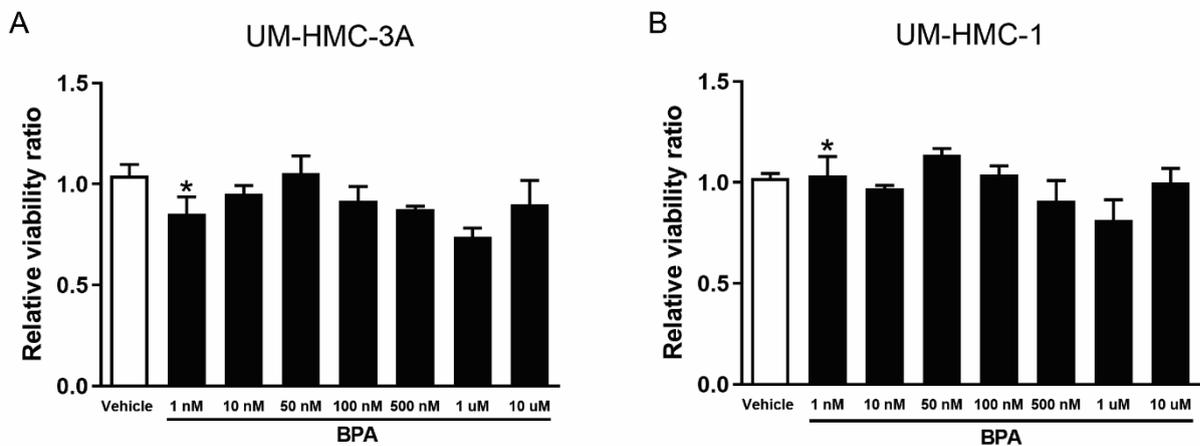
**Figura 1.** Efeitos da exposição ao Bisfenol A (BPA) sobre as glândulas salivares de camundongos machos e fêmeas e quantificação dos produtos nesses tecidos. Imagens representativas que revelam a morfologia e a arquitetura dos tecidos das glândulas (A) submandibulares e (B) sublingual dos camundongos machos e fêmeas. Histomorfometria de ácinos e túbulos granulares convolutos (GCT) de animais que receberam 0,05% de dimetilsulfóxido (DMSO; veículo) ou BPA (30.000 µg/kg/dia). (C) Acumulação de BPA em tecidos de glândulas salivares de camundongos expostos a BPA em água potável medida por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com armadilhas de íons (GC/MS). Nota: dados referentes a aspectos histopatológicos (n=10 por grupo) são mostrados como média ± desvio padrão da média, enquanto dados (n=5 por grupo) referentes ao ensaio GC/MS são mostrados como média ± desvio padrão. O teste Mann-Whitney determinou a diferença estatística entre os grupos e (\*) indica  $p < 0,05$ .



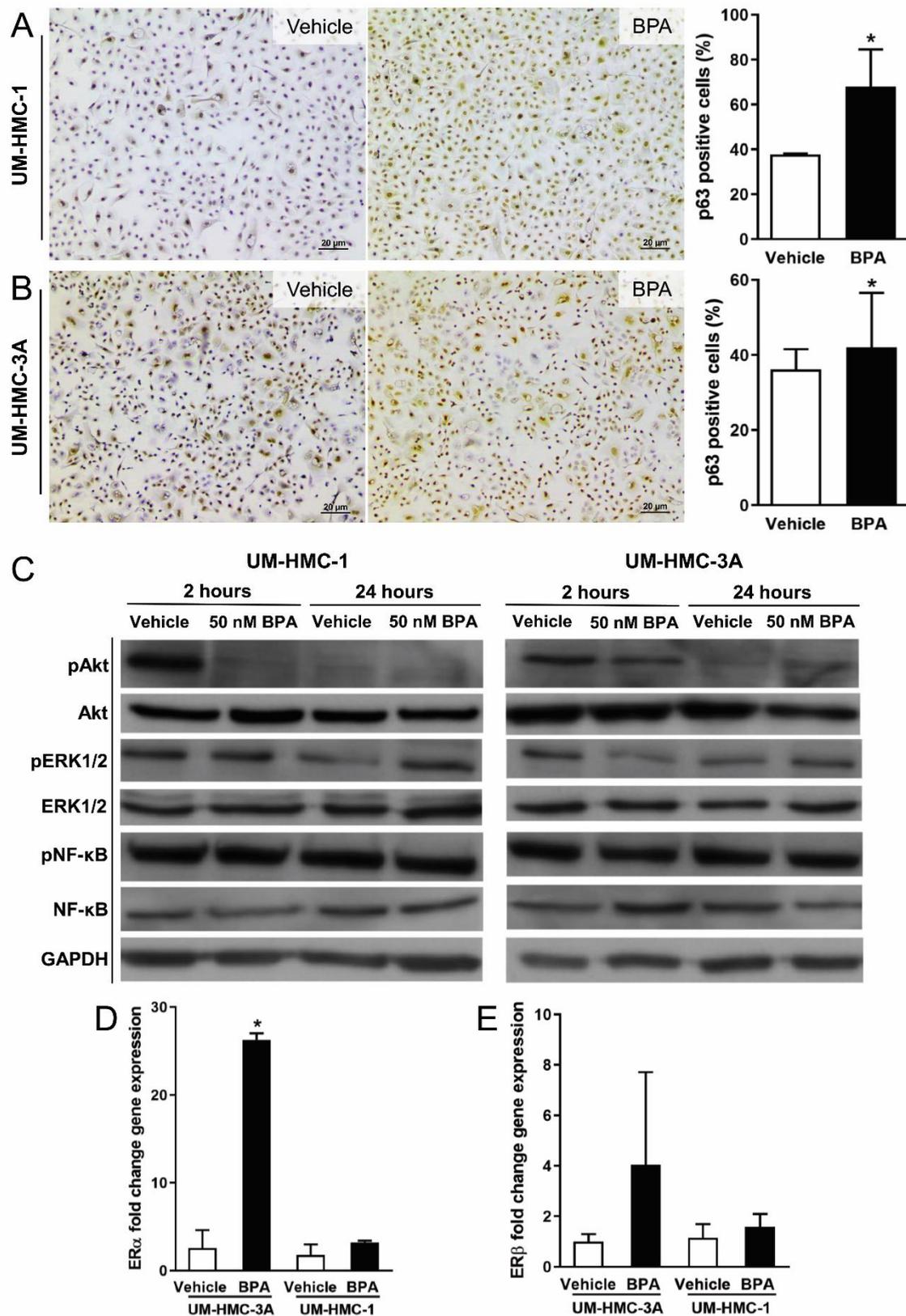
**Figura 2.** Regulação positiva da liberação do receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) e do receptor de estrogênio beta (ER $\beta$ ) pelo Bisfenol A (BPA) em glândulas salivares de camundongos fêmeas. A alteração na expressão do RNA mensageiro (mRNA) de ER $\alpha$  e ER $\beta$  foi determinada em glândulas salivares de camundongos expostos a BPA (30.000 µg/kg/dia) e 0,05% de DMSO (veículo) (n=5 por grupo). Nota: os dados são apresentados como média ± desvio padrão da média. O teste de Mann-Whitney determinou diferença estatística entre os grupos e (\*) indica  $p < 0,05$ .



**Figura 3.** Efeitos da deficiência de estrogênio induzido por ovariectomia nas glândulas salivares submandibulares de camundongos expostos ao BPA (30.000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) e veículo (0,05% DMSO). Histomorfometria de (A) ácinos e (B) túbulos granulares convolutos (GCT) das glândulas. Nota: os dados ( $n=5$  por grupo) são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão da média. O teste Mann-Whitney determinou a diferença estatística entre os grupos e (\*) indica  $p < 0,05$ .



**Figura 4.** Viabilidade celular relativa por resazurina nas linhagens celulares (A) UM-HMC-3A (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A) e (B) UM-HMC-1 (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1) às 48 horas de incubação. Nota: os dados ( $n=3$  réplicas biológicas independentes) são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão da média. O teste ANOVA unilateral seguido do teste post-hoc de Bonferroni foi usado para determinar a significância estatística entre os grupos e (\*) indica  $p < 0,05$ .



**Figura 5.** Imunocitoquímica, imunoblotting e expressão do receptor de estrogênio em UM-HMC-1 (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1) e UM-HMC-3A (University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A). Imagens imunocitoquímicas representativas da coloração p63 em (A) UM-HMC-1 e (B) UM-

HMC-3A com os respectivos grupos: veículo (0,05% DMSO) e BPA (50 nM). A relação relativa das células positivas p63 no veículo e BPA no UM-HMC-1 e UM-HMC-3A é mostrada em gráficos de barras. (C) Análise de immunoblotting do UM-HMC-1 e do UM-HMC-3A. As células foram processadas após 2 e 24 horas de cultura de células sob incubação de BPA (50 nM). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários para a proteína total e formas fosforiladas: AKT (v-Akt murine thymoma viral oncogene), pAKT (phospho-v-Akt murine thymoma viral oncogene), ERK (extracellular signal-regulated kinase), pERK (phospho-extracellular signal-regulated kinase), NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), e pNF- $\kappa$ B (phospho-v-Akt murine thymoma viral oncogene). GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) era o controle de carga. Quantidades iguais de proteína (30  $\mu$ g) de cada amostra foram submetidas a SDS-PAGE (eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida) e Western blotting. (D) Efeitos dos receptores de estrogênio liberados por BPA (10 nM) ou veículo (0,05% DMSO) nas linhagens de células UM-HMC-1 e UM-HMC-3A. Nota: os dados (n=2 réplicas biológicas independentes) são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão da média. O teste Mann-Whitney determinou a diferença estatística entre os grupos e (\*) indica  $p < 0,05$ .

## Tabela Complementar

**Supplementary Table 1.** Razão obtida da densitometria das bandas (anticorpo fosforilado/ anticorpo total) das proteínas-alvo das linhas celulares UM-HMC-1 e UM-HMC-3A expostas a 50nM de bisfenol A (BPA).

Target proteins	UM-HMC-1				UM-HMC-3A			
	2 hours		24 hours		2 hours		24 hours	
	Vehicle	50 nM BPA	Vehicle	50 nM BPA	Vehicle	50 nM BPA	Vehicle	50 nM BPA
pAKT:AKT	0.85	0.10	0.15	0.19	0.71	0.23	0.44	0.34
pERK1/2:ERK1/2	1.61	1.54	0.95	1.23	1.00	0.61	1.22	1.43
pNF-κB:NF-κB	4.61	5.34	3.48	3.56	5.15	3.05	4.09	4.72

**Note:** AKT, v-Akt murine thymoma viral oncogene; ERK, extracellular signal-regulated kinase; NF-κB, nuclear factor-κB; pAKT, phospho-v-Akt murine thymoma viral oncogene; pERK, phospho-extracellular signal-regulated kinase; pNF-κB, phospho-nuclear factor-κB; UM-HMC-1, University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-1; UM-HMC-3A, University of Michigan-Human Mucoepidermoid Carcinoma-3A.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos, pudemos verificar que a exposição ao Bisfenol A resultou em seu acúmulo nas glândulas salivares de camundongos fêmeas, acometendo também na alteração da morfologia desses animais.

Além disso, foi possível relacionar a deficiência de estrogênio e a resposta do BPA nas glândulas salivares, sendo que aqueles indivíduos ovariectomizados expostos ao BPA apresentaram uma diminuição do número de ácinos em comparação ao grupo controle.

O BPA aumenta a expressão dos receptores p63 e de estrogênio em linhagens celulares tumorais. Foi possível concluir também que houve uma regulação positiva da liberação do receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) e do receptor de estrogênio beta (ER $\beta$ ) pelo Bisfenol A em glândulas salivares de camundongos fêmeas.

Tem sido sugerido que a cavidade oral é a principal via de contaminação (GUIGNARD et al., 2016; TEEGUARDEN et al., 2015; WANG et al., 2020), admitindo que as glândulas salivares são locais potenciais para o acúmulo de BPA, corroborando com os nossos achados. Nesta linha, estudos mostram que a exposição crônica à BPA pode resultar em mudanças nas glândulas salivares (FOLIA et al., 2013), nossos resultados confirmaram as alterações glandulares e indicaram uma mudança significativa na morfologia das glândulas salivares submandibulares e sublinguais de camundongos.

Além disso, acredita-se que a exposição a este monômero estimula a proliferação celular de células não-neoplásicas e neoplásicas (ALMEIDA et al., 2021), para entender melhor este mecanismo de indução da proliferação celular pela BPA, avaliamos os efeitos da BPA nas proteínas-alvo, pAKT, pERK e pNF $\kappa$ B, que estão envolvidas na proliferação e sobrevivência celular (MURATA & KANG, 2018; NOMIRI et al., 2019). Uma diminuição em pAKT e um aumento em pERK foram observados no grupo tratado com BPA. Resultados similares foram descritos anteriormente (CUOMO et al., 2017; YAGUCHI, 2019).

Por se tratar de um estudo realizado em modelos animais, tivemos algumas limitações, especialmente no contexto da síntese do complexo processo de mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao resgate do bisfenol A nos tecidos das glândulas salivares, coletivamente, nossos resultados apoiam a exposição de curto prazo a esta substância química. Isto corrobora o fato de que baixas doses de

bisfenol A induzem efeitos adversos marcados, em particular o notável número de efeitos observados em doses 20.000 vezes maiores do que a atual dose "segura" de BPA para humanos (VANDENBERG et al., 2019). Em última análise, de relevância clínica para o conceito de que o envelhecimento está associado a uma diminuição dos hormônios sexuais (por exemplo, andrógenos na andropausa e estrogênios na pós-menopausa), uma compreensão das mudanças dependentes da idade na interação com as doenças das glândulas salivares desencadeadas pelo Bisfenol A, incluindo, por exemplo, amostras humanas, certamente aprofundaria o conhecimento dos processos fisiopatológicos de forma translacional.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso trabalho evidenciou uma ligação entre a BPA e mudanças morfológicas nas glândulas salivares, um mecanismo, pelo menos em parte, dependente do estrogênio. Nas células neoplásicas, a BPA modificou as vias de sinalização pró-sobrevivência e aumentou a expressão da p63. Estas descobertas representam uma preocupação adicional sobre os efeitos prejudiciais da BPA nos tecidos orais, particularmente salivares, e as potenciais repercussões a longo prazo.

## REFERÊNCIAS

ACCONCIA, Filippo; PALLOTTINI, Valentina; MARINO, Maria. Molecular mechanisms of action of BPA. **Dose-response**, v. 13, n. 4, p. 1559325815610582, 2015.

ACEVEDO, Nicole et al. Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 9, p. 1040-1046, 2013.

ALMEIDA, Tatiana Fernandes Araujo et al. Effects of high-dose bisphenol A on the mouse oral mucosa: A possible link with oral cancers. **Environmental Pollution**, v. 286, p. 117296, 2021.

AQUINO, Gabriella et al. Sex hormone receptors in benign and malignant salivary gland tumors: prognostic and predictive role. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 399, 2018.

AYYANAN, Ayyakkannu et al. Perinatal exposure to bisphenol a increases adult mammary gland progesterone response and cell number. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 11, p. 1915-1923, 2011.

BABU, Sainath et al. Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 23, n. 4, p. 273-280, 2013.

BASHIR, Dina W.; AHMED, Yasmine H.; EL-SAKHAWY, Mohamed A. Ameliorative effect of vitamin E and selenium against bisphenol A-induced toxicity in spinal cord and submandibular salivary glands of adult male albino rats. **International Journal of Environmental Health Research**, p. 1-17, 2022.

BONDE, Jens Peter et al. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction update**, v. 23, n. 1, p. 104-125, 2017.

CASERTA, Donatella et al. Endocrine Disruptors and Endometrial Cancer: Molecular Mechanisms of Action and Clinical Implications, a Systematic Review. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 6, p. 2956, 2022.

CASTELLINI, Chiara et al. Association between urinary bisphenol A concentrations and semen quality: A meta-analytic study. **Biochemical Pharmacology**, v. 197, p. 114896, 2022.

ÇETIN, Yaser Said; ALTINDAĞ, Fikret; BERKÖZ, Mehmet. Protective role of resveratrol and apigenin against toxic effects of bisphenol a in rat salivary gland. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-9, 2021.

CUOMO, Danila et al. Carcinogenic risk and Bisphenol A exposure: A focus on

molecular aspects in endoderm derived glands. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 457, p. 20-34, 2017.

DI DONATO, Marzia et al. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 457, p. 35-42, 2017.

DURANDO, Milena et al. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 1, p. 80-86, 2007.

ĐUROVCOVÁ, Ivana et al. Genotoxic potential of bisphenol A: A review. **Environmental Pollution**, p. 119346, 2022.

EMFIETZOGLOU, Rodopi et al. Could the endocrine disruptor bisphenol-A be implicated in the pathogenesis of oral and oropharyngeal cancer? Metabolic considerations and future directions. **Metabolism**, v. 91, p. 61-69, 2019.

FERNANDEZ, Miriany A. Moreira; ANDRÉ, Leiliane Coelho; DE LOURDES CARDEAL, Zenilda. Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. **Journal of Chromatography a**, v. 1481, p. 31-36, 2017.

FOLIA, Mireille et al. Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component bisphenol A in adult male rats. **The Laryngoscope**, v. 123, n. 6, p. 1405-1410, 2013.

FRANKOWSKI, Robert et al. The presence of bisphenol A in the thermal paper in the face of changing European regulations—a comparative global research. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114879, 2020.

GAYRARD, Véronique et al. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 8, p. 951-956, 2013.

GEENS, Tinne et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3725-3740, 2012.

GOMES, José Messias et al. Saliva biomonitoring using LPME-GC/MS method to assess dentistry exposure to plasticizers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 28, p. 7799-7810, 2020.

GUIGNARD, Davy et al. Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 93, p. 82-88, 2016.

HEINDEL, Jerrold J. et al. Data integration, analysis, and interpretation of eight academic CLARITY-BPA studies. **Reproductive Toxicology**, v. 98, p. 29-60, 2020.

IRIBARNE-DURÁN, L. M. et al. Concentrations of bisphenols, parabens, and benzophenones in human breast milk: A systematic review and meta-analysis. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 150437, 2022.

KADDAR, Nisrin et al. Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. **Analytica chimica acta**, v. 645, n. 1-2, p. 1-4, 2009.

KARWACKA, Anetta et al. Exposure to modern, widespread environmental endocrine disrupting chemicals and their effect on the reproductive potential of women: an overview of current epidemiological evidence. **Human Fertility**, v. 22, n. 1, p. 2-25, 2019.

LEE, Hee-Weon; HA, Sang Keun; KIM, Yoonsook. Bisphenol A disrupts inflammatory responses via Nod-like receptor protein 3 pathway in macrophages. **Applied Biological Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 1-10, 2020.

LOPES-ROCHA, Lúgia et al. Analytical Methods for Determination of BPA Released from Dental Resin Composites and Related Materials: A Systematic Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1-16, 2022.

MACARI, Soraia et al. Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. **Archives of oral biology**, v. 60, n. 2, p. 333-341, 2015.

MAFFINI, Maricel V.; NELTNER, Thomas G.; VOGEL, Sarah. We are what we eat: Regulatory gaps in the United States that put our health at risk. **PLoS Biology**, v. 15, n. 12, p. e2003578, 2017.

MARZOUK, T. et al. A systematic review of exposure to bisphenol a from dental treatment. **JDR Clinical & Translational Research**, v. 4, n. 2, p. 106-115, 2019.

MATTHEWS, Jason B.; TWOMEY, Ken; ZACHAREWSKI, Timothy R. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . **Chemical research in toxicology**, v. 14, n. 2, p. 149-157, 2001.

MURATA, Masaharu; KANG, Jeong-Hun. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 311-327, 2018.

NELLES, Jason L.; HU, Wen-Yang; PRINS, Gail S. Estrogen action and prostate cancer. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 6, n. 3, p. 437-451, 2011.

NICHOLSON, Tristan M. et al. Endocrine disruptor bisphenol A is implicated in urinary voiding dysfunction in male mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 315, n. 5, p. F1208-F1216, 2018.

NOMIRI, Samira et al. A mini review of bisphenol A (BPA) effects on cancer-related cellular signaling pathways. **Environmental science and pollution research**, v. 26, n. 9, p. 8459-8467, 2019.

NUÑEZ, Paula; ARGUELLES, Juan; PERILLAN, Carmen. Short-term exposure to

bisphenol A affects water and salt intakes differently in male and ovariectomised female rats. **Appetite**, v. 120, p. 709-715, 2018.

PATEL, Shreya et al. Bisphenol A exposure, ovarian follicle numbers, and female sex steroid hormone levels: results from a CLARITY-BPA study. **Endocrinology**, v. 158, n. 6, p. 1727-1738, 2017.

PRINS, Gail S. et al. CLARITY-BPA academic laboratory studies identify consistent low-dose Bisphenol A effects on multiple organ systems. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 125, p. 14-31, 2019.

TAYLOR, Julia A. et al. Interactive effects of perinatal BPA or DES and adult testosterone and estradiol exposure on adult urethral obstruction and bladder, kidney, and prostate pathology in male mice. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 11, p. 3902, 2020.

TEEGUARDEN, Justin G. et al. 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 288, n. 2, p. 131-142, 2015.

TSINTI, Maria et al. Functional estrogen receptors alpha and beta are expressed in normal human salivary gland epithelium and apparently mediate immunomodulatory effects. **European Journal of Oral Sciences**, v. 117, n. 5, p. 498-505, 2009.

VANDENBERG, Laura N. et al. The use and misuse of historical controls in regulatory toxicology: lessons from the CLARITY-BPA study. **Endocrinology**, v. 161, n. 5, p. bqz014, 2020.

VANDENBERG, Laura N.; HUNT, Patricia A.; GORE, Andrea C. Endocrine disruptors and the future of toxicology testing—lessons from CLARITY–BPA. **Nature reviews endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 366-374, 2019.

VOM SAAL, Frederick S.; VANDENBERG, Laura N. Update on the health effects of bisphenol A: overwhelming evidence of harm. **Endocrinology**, v. 162, n. 3, 2021.

WADIA, Perinaaz R. et al. Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63902, 2013.

WAN, Murphy Lam Yim; CO, Vanessa Anna; EL-NEZAMI, Hani. Endocrine disrupting chemicals and breast cancer: a systematic review of epidemiological studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-27, 2021.

WANG, Jing et al. In vitro impact of bisphenol A on maturation and function of monocyte-derived dendritic cells in patients with primary Sjögren's syndrome. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 42, n. 1, p. 28-36, 2020.

WETHERILL, Yelena B. et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. **Reproductive toxicology**, v. 24, n. 2, p. 178-198, 2007.

YAGUCHI, Takahiro. The endocrine disruptor bisphenol A promotes nuclear ER $\alpha$  translocation, facilitating cell proliferation of Grade I endometrial cancer cells via EGF-dependent and EGF-independent pathways. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 452, n. 1, p. 41-50, 2019.