



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Efeitos do Disruptor Endócrino Bisfenol A na Imunidade Inata

Luís Miguel Fernandes de Sousa

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professora Doutora Ana Mafalda Loureiro Fonseca

Covilhã, Maio de 2015

Dedicatória

Aos meus pais, pelo enorme esforço e amor incondicional. A eles, tudo devo.

Aos meus irmãos, pelo apoio e carinho incessantes.

Aos meus afilhados, pela força e companhia inigualáveis.

À minha tia Natália.

Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Mafalda Loureiro Fonseca, pelo empenho, disponibilidade e dedicação.

Aos meus afilhados, por me transmitirem a força necessária para encarar todos os obstáculos.

Aos meus colegas de faculdade, por 6 anos inesquecíveis.

Aos meus amigos de longa data, por tornarem tudo mais fácil.

Aos meus pais e irmãos, que mesmo a 1500 Km de distância, nunca deixaram de estar presentes.

Resumo

Os disruptores endócrinos (DEs) são substâncias naturais ou sintéticas que, quando presentes no organismo, têm a capacidade de alterar funções endócrinas, agindo como agonistas ou antagonistas hormonais. O bisfenol A (BPA) está entre os DEs mais estudados e produzidos mundialmente, sendo utilizado na produção de plásticos de policarbonato e resinas epoxídicas. Encontra-se em inúmeros produtos de consumo diário, entre os quais garrafas de água, revestimentos de recipientes alimentares, lentes de contacto, produtos eletrónicos e brinquedos, o que resulta numa exposição generalizada da sociedade ao BPA.

O sistema imunitário compreende um conjunto de mecanismos que cumpre a função de defesa do organismo, discriminando o próprio do alheio, tornando-o responsável pela manutenção do estado de saúde de cada indivíduo. É tradicionalmente dividido em duas categorias, a adaptativa e a inata, sendo que esta última cumpre a função de primeira linha de defesa e tem um papel fundamental na eliminação de patógenos nas fases iniciais da infeção. Avanços recentes no campo da imunidade inata têm suscitado o interesse da comunidade científica e propondo alterações paradigmáticas nesta vertente, introduzindo-se o conceito de memória, até então atribuído exclusivamente à imunidade adaptativa.

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no efeito do BPA na imunidade inata, através da análise de investigações realizadas sobretudo em modelos animais.

Os resultados observados permitiram concluir que a exposição ao BPA estava associada a alterações em diversos aspetos da imunidade inata, inclusive na diferenciação e proliferação de células efectoras, na indução da apoptose, na produção de óxido nítrico (NO), na secreção de citocinas e na atividade fagocítica, sendo que alguns desses efeitos são alcançados através da interação agonista com recetores de estrogénio (ERs). Contudo, são necessários mais estudos, particularmente em humanos, para a obtenção de dados mais consistentes que revelem a real influência do BPA na imunidade inata.

Considerando-se o conteúdo exposto neste trabalho e dado o potencial do BPA em aumentar a suscetibilidade à doença, é recomendável a minimização da exposição ao BPA e a sua substituição por elementos inócuos para a saúde humana.

Palavras-chave

Bisfenol A, imunidade inata, macrófago, fagocitose e disruptor endócrino.

Abstract

Endocrine disruptors (DEs) are natural or synthetic substances that, when present in the body, have the ability to change endocrine functions, acting as hormone agonists or antagonists. Bisphenol A (BPA) is among the most studied and produced DEs worldwide, being used in the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins. It is found in many products of daily consumption, including water bottles, food container linings, contact lenses, electronic products and toys, resulting in widespread human exposure to BPA.

The immune system comprises a set of mechanisms that serves the body's defense purpose, making it responsible for maintaining each individual's health. It is traditionally divided into two categories, adaptive and innate, the latter of which performs the first line defense functions and plays a key role in pathogens elimination at early stages of infection. Recent advances in the field of innate immunity have sparked the interest of the scientific community and proposed paradigmatic changes, introducing the concept of memory, previously assigned exclusively to adaptive immunity.

This study aimed to perform a literature review about the pathophysiological mechanisms involved in the effects of BPA in innate immunity by analyzing investigations mostly implemented in animal models.

The results observed showed that BPA exposure was related to changes in many innate immunity aspects, including the differentiation and proliferation of effector cells, induction of apoptosis, nitric oxide (NO) production, cytokine secretion and phagocytic activity, and that some of these effects were accomplished through agonist interaction with estrogen receptors (ERs). However, more studies are needed, especially in humans, to obtain more consistent data revealing the real influence of BPA in innate immunity.

Considering the contents exposed in this work and given BPA's potential to increase disease susceptibility, minimize exposure to BPA is highly recommended, replacing it with harmless elements for human health.

Keywords

Bisphenol A, innate immunity, macrophage, phagocytosis, endocrine disruptor.

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo e Palavras-chave	vii
Abstract and Keywords	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
1. Introdução	1
2. Metodologia	3
3. A Imunidade Inata	5
3.1. Breve perspectiva histórica	5
3.2. Componentes do Sistema Imune Inato	5
3.2.1. Células efetoras	6
3.2.2. Proteínas efetoras - As citocinas	9
3.3. Sistema do complemento	11
3.4. Fagocitose	12
3.5. A Resposta Inflamatória	13
3.6. Nova perspectiva da Imunidade Inata	14
4. Bisfenol A	17
5. Efeitos do Bisfenol A na Dinâmica da Imunidade Inata	19
5.1. Interação com Recetores de Estrogénio	19
5.2. Proliferação, Diferenciação e Migração de Células da Imunidade Inata	21
5.3. Apoptose	22
5.4. Síntese de Óxido Nítrico	24
5.5. Fagocitose	26
5.6. Produção e Libertação de Citocinas	27
5.7. Inflamação	28
6. Implicações da Ação do Bisfenol A no Contexto de Suscetibilidade à Doença	31
7. Conclusão	33
8. Bibliografia	35
Anexo I - Níveis de citocinas e quimiocinas no soro após exposição perinatal ao BPA	41

Lista de Figuras

Figura 1 - Hematopoiese	6
Figura 2 - Visão geral das vias de ativação do complemento	11
Figura 3 - Estrutura química do Bisfenol A	17
Figura 4 - Resumo do efeito do BPA na Imunidade Inata	34

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais citocinas da imunidade inata

10

Lista de Acrónimos

BisGMA	Bisfenol-A-glicidil-metacrilato
BMDC	Células dendríticas da medula óssea
BPA	Bisfenol A
CLR	Recetores de lectina tipo C
CMV	Citomegalovírus
CR1	Recetor do complemento tipo 1
CR2	Recetor do complemento tipo 2
C4bp	Proteína de ligação ao C4
DAF	Fator acelerador da dissociação
DC	Célula dendrítica
DE	Disruptor endócrino
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ER	Recetor de estrogénio
ERE	Elementos de resposta estrogénica
ER α	Recetor de estrogénio alfa
ER β	Recetor de estrogénio beta
E2	17 β -Estradiol
G-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos
HSC	Células estaminais hematopoiéticas
IFN- α	Interferão alfa
IFN- γ	Interferão gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de ataque à membrana
MC	Mastócito
MCP	Cofator proteico da membrana
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
M Φ	Macrófago
MHC-I	Complexo major de histocompatibilidade I
MHC-II	Complexo major de histocompatibilidade II
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NK	Célula <i>Natural Killer</i>

NLR	Recetores tipo NOD
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PCR	Proteína C reativa
PI	Iodeto de Propídeo
PRR	Recetor de reconhecimento de padrão
RFU	Unidades relativas de fluorescência
ROS	Espécies reativas de oxigénio
TCR	Recetor de célula T
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
TLR	Recetor tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Recetor 1 do fator de necrose tumoral

1. Introdução

O sistema imunitário é o conjunto complexo de mecanismos integrados que tem como uma das suas funções a discriminação entre o próprio e o alheio; é um sistema único e esta importante função pertence-lhe em exclusivo. Se na noção de alheio incluirmos o próprio alterado, podemos considerar o sistema imune como o responsável pela manutenção da integridade física, sem o qual a vida é ameaçada (1).

A resposta imune é dividida tradicionalmente em duas vertentes: inata e adaptativa (2). A imunidade inata consiste na ação concentrada de vários tipos celulares, recetores, sistemas de sinalização e mecanismos efetores (1). Como primeira linha de defesa do organismo, tem papel fundamental durante o período crítico que se verifica logo após a exposição do hospedeiro ao agressor, pois a sua principal função centra-se em eliminar patogénios e apresentar antígenos às células envolvidas na imunidade adaptativa (3, 4).

Até à última década, o estudo da imunidade inata tinha sido eclipsado pelas descobertas dramáticas no campo da vertente adaptativa. No entanto, a recente definição molecular de como o sistema imune inato deteta a infeção e capacita respostas imunes protetoras precipitou um renascimento desta área (5). Para além disso, novos estudos têm contrariado o conceito de inespecificidade da imunidade inata, contribuindo assim para uma mudança de paradigma, alterando a forma como pensamos sobre a patogénese e tratamento de doenças infecciosas, autoimunes, alérgicas e neoplásicas (4).

Por mais de setenta anos, os cientistas relataram que certos compostos sintéticos e naturais podem interferir com a síntese, metabolismo e ação das hormonas endógenas. Estas substâncias são conhecidas coletivamente como disruptores endócrinos (DEs) e têm sido alvo de crescente preocupação devido aos seus potenciais efeitos nos seres humanos (6, 7). A exposição a estes químicos, especialmente em fases iniciais do desenvolvimento, pode alterar os padrões normais de evolução e produzir consequências nefastas no sistema imune e, assim, modificar dramaticamente a suscetibilidade dos seres humanos à doença ao longo da vida (8). Um dos DEs mais estudados é o Bisfenol A (BPA) pois trata-se de um químico amplamente produzido, sendo que cerca de cem toneladas são libertadas para a atmosfera todos os anos (9, 10).

O BPA é utilizado na produção de plásticos de policarbonato e resinas epoxídicas que são encontrados em inúmeros produtos da nossa vida diária (11, 12, 13). A exposição ao BPA pode ocorrer por ingestão, uma vez que o químico pode transvazar para os alimentos ou bebidas, por inalação ou contacto com a pele (14, 15).

Existe alguma controvérsia acerca da segurança dos produtos que contêm BPA na sua composição; contudo, uma vasta quantidade de estudos *in vivo* reportou e confirmou as suspeitas em relação aos seus efeitos adversos, mesmo em doses abaixo do esperado (16). Com o presente trabalho procura-se reunir, atualizar e sumarizar a informação atual sobre os

efeitos do BPA na imunidade inata, evidenciando os diferentes mecanismos implícitos nesse processo.

2. Metodologia

A informação utilizada na elaboração da presente monografia foi recolhida em livros de texto de referência na área da imunologia e da biologia celular, e em artigos de revistas científicas da especialidade. Para tal, utilizou-se a base de dados científica de biomedicina Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) usando como critérios de pesquisa as palavras-chave “bisphenol a”, “innate immunity”, “macrophage”, “phagocytosis” e “endocrine disruptor”, isoladamente e/ou nas diferentes combinações possíveis. A pesquisa foi restrita preferencialmente ao idioma inglês e efetuada maioritariamente entre Novembro de 2014 e Fevereiro de 2015. Procedeu-se posteriormente à análise e seleção dos artigos mais relevantes, incluindo artigos de revisão, ensaios clínicos e estudos de investigação, os quais foram agrupados segundo os diferentes métodos de análise dos efeitos da exposição ao BPA na imunidade inata.

3. A Imunidade Inata

3.1. Breve perspectiva histórica

O termo imunidade advém do latim *immunis* que significa “pessoa privilegiada”, simbolizando o estado de proteção face a uma doença infecciosa (3). Apesar da história da imunologia se entrosar num conceito de prevenção da doença que remonta à mais alta antiguidade, ela é um ramo relativamente recente da ciência médica, tendo sido considerada parte da Microbiologia durante vários anos (1). São clássicas as referências ao médico britânico do séc. XVIII Edward Jenner e ao investigador francês do séc. XIX Louis Pasteur como sendo os pais da imunidade. No entanto, foram Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato que forneceram as primeiras evidências acerca do mecanismo subjacente à então recém-descoberta vacinação. No que à vertente inata diz respeito, o grande pioneiro foi Ilya Mechnikov com a descoberta e caracterização da fagocitose, trabalho esse que levaria o cientista a ser distinguido com o prémio Nobel da Medicina em 1908 (1, 3, 4, 5).

3.2. Componentes do Sistema Imune Inato

O sistema imune inato fornece proteção ao reconhecer desvios da homeostase causados por agressões infecciosas, mecânicas e químicas, estando presente em todas as classes de plantas e animais (5, 17, 18). O suporte do seu funcionamento apoia-se em componentes celulares e humorais que aumentam a proteção oferecida pelas barreiras anatómicas e fisiológicas presentes no organismo (1, 5).

A pele e a superfície das membranas das mucosas conferem bloqueio à entrada da maioria dos microrganismos, constituindo uma primeira linha de defesa eficaz (3). Para isso contam com um epitélio contínuo capaz de produzir péptidos com função antibiótica natural que são capazes de agir diretamente nos micróbios e indiretamente ao ativar células envolvidas na resposta inflamatória (2). Também o muco e os cílios auxiliam no aprisionamento e expulsão dos invasores (3). Entre as barreiras fisiológicas existentes são de destacar o papel da temperatura corporal e do pH ácido da maioria das secreções, que contrariam a proliferação bacteriana (1, 3). Se, ainda assim, o invasor conseguir escapar aos mecanismos de defesa supracitados, deparar-se-á com uma densa rede de células preparadas para ativar uma resposta imunitária que terá como objetivo final a manutenção do estado de saúde do indivíduo (17).

3.2.1. Células efetoras

As respostas imunológicas são mediadas por leucócitos que, no período pós-embriônico, derivam de precursores existentes na medula óssea. O processo de formação das células sanguíneas a partir de células estaminais é designado por hematopoiese (Figura 1). Existem duas grandes linhagens celulares: a linhagem mieloide, que origina os granulócitos polimorfonucleares e os monócitos, e a linhagem linfóide, que origina os linfócitos (1).

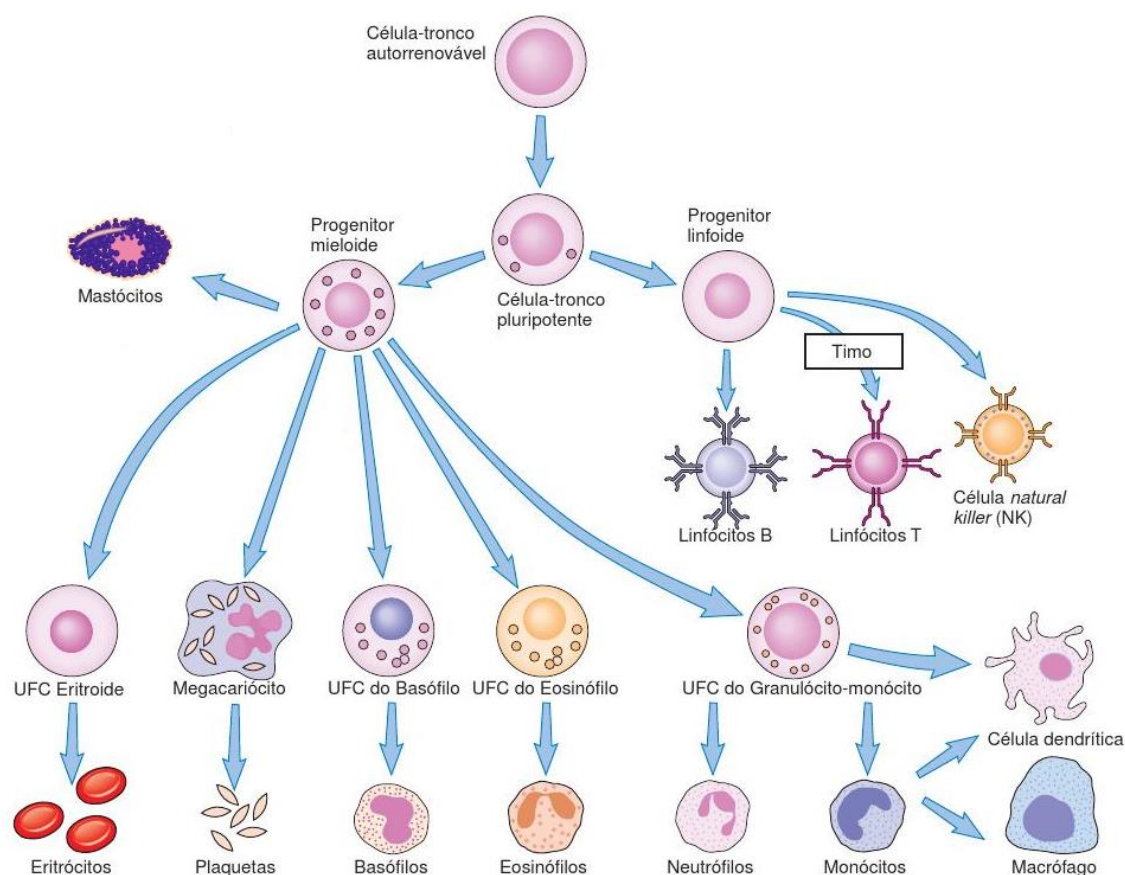


Figura 1 - Hematopoiese (adaptado de 2).
UFC- unidade formadora de colônias.

Monócitos

Os monócitos são células incompletamente diferenciadas que circulam no sangue e, quando entram nos tecidos, evoluem para outro tipo de células muito importantes para o encetar das respostas imunológicas: macrófagos (MΦs) ou células dendríticas (DCs) (3). É normalmente a maior célula circulante do sangue periférico, com um diâmetro entre 10 a 15 μm, núcleo irregular e frequentemente lobulado, citoplasma vacuolizado e limites assimétricos (1, 2).

Macrófagos

Nos tecidos, quando os monócitos se diferenciam em MΦs, sofrem algumas transformações que lhes permitem assegurar importantes funções fisiológicas, existindo praticamente em todos os tecidos do corpo (1). Eles tornam-se cinco a dez vezes maiores, os seus organelos intracelulares aumentam em número e em complexidade e, acima de tudo, adquirem uma capacidade fagocítica aumentada, produzem enzimas hidrolíticas e começam a libertar diversos fatores solúveis (3). Consoante o microambiente tecidual onde se encontram, os MΦs diferem consideravelmente nas suas características fenotípicas, sendo que geralmente possuem uma forma ovalada, com um núcleo em posição periférica em forma de rim (1).

Os MΦs encontram-se normalmente em estado de repouso, podendo ser ativados por uma variedade de estímulos durante uma resposta imune, tornando-se mais eficazes. Eles respondem aos estímulos infecciosos quase tão rapidamente como os neutrófilos, mas permanecem no local da inflamação por muito mais tempo: são as células efetoras predominantes nos estágios mais tardios da resposta imune inata, um ou dois dias após a infeção (2). As suas funções centram-se na fagocitose e destruição de micróbios bem como na libertação de citocinas que estimulam a inflamação (2, 3).

Células Dendríticas

Como o próprio nome indica, as DCs têm uma morfologia estrelada, composta por um emaranhado de longas extensões membranosas (1, 3). São amplamente distribuídas no tecido linfóide, epitélio mucoso e parênquima dos órgãos, apresentando morfologia distinta consoante o local (2). As DCs engolfam patógenos invasores e digerem-nos em pequenos péptidos, que depois expressam na sua superfície. Após este processo, as células migram desde o tecido infetado para os nódulos linfáticos regionais, onde apresentam os antígenos aos linfócitos T *naive* (4). Por desempenharem esta função, são extremamente importantes na coordenação da resposta inata com a resposta adaptativa (2).

Neutrófilos

Os neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares, são a população mais abundante de células sanguíneas brancas circulantes e, tal como os MΦs, exercem atividade fagocítica (3). Possuem forma esférica com cerca de 12 a 15 μm de diâmetro, numerosas projeções de membrana, núcleo segmentado em 3 a 5 lóbulos conectados e, no citoplasma, dois tipos de grânulos; os específicos, que são preenchidos por enzimas tais como lisozima, colagenase e elastase, e os azurófilos, que constituem lisossomas capacitados de microbicidas, entre os quais defensinas e catelicidinas (2). Têm um tempo de vida curto, entre 24 a 48 horas, período no qual sofrem apoptose caso não sejam recrutados para locais de infeção (2, 3). Em resposta à infeção, a medula óssea produz e liberta um número aumentado de neutrófilos que, atraídos por fatores quimiotáticos, são as primeiras células a chegar ao local de infeção (2).

Eosinófilos

Estas células são semelhantes aos neutrófilos mas exibem fraca capacidade fagocítica. O núcleo é bilobulado, por vezes trilobulado. Os eosinófilos têm um papel importante contra organismos parasitários e atuam libertando o conteúdo dos seus grânulos para o meio extracelular, onde as enzimas podem então danificar a membrana dos parasitas (1, 3). Tal como os basófilos, são vestigiais no sangue periférico (1).

Basófilos

Os basófilos são granulócitos não fagocíticos que geralmente possuem o núcleo coberto pelos grânulos. A sua função consiste em libertar substâncias farmacologicamente ativas, tais como heparina e histamina, que têm papel importante nas respostas alérgicas e contra parasitas, particularmente contra helmintas (1, 3).

Mastócitos

Os mastócitos (MCs) têm importância semelhante aos basófilos nas reações alérgicas visto que também possuem grânulos citoplasmáticos com histamina e outras substâncias farmacologicamente ativas. Mas, ao contrário dos basófilos, povoam apenas os tecidos e não o sangue periférico (1, 3). Contudo, alguns investigadores defendem que os MCS desempenham mais funções que as descritas, considerando que são células que participam ativamente na vigilância contra patógenos invasores e na regulação da resposta inflamatória aguda, desde o seu início ao seu término (19).

A localização dos MCs, intimamente relacionada com as barreiras epiteliais e endoteliais, torna-os das primeiras células a depararem-se com os invasores, tal como as DCs e os MΦs (19, 20). No entanto, a deteção inicial pode não ser através de contacto direto, uma vez que os MCS também identificam sinais de *stress* oriundos do tecido circundante. Dependendo do estímulo ativador pressentido pelos MCS, eles libertam um rol de mediadores inflamatórios específicos para o patógeno detetado e, segundo os autores, determinam o perfil inflamatório inicial no local de infeção bem como a qualidade e o carácter da resposta do hospedeiro (19).

Juntamente com os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos constituem o grupo celular dos granulócitos (2).

Células Natural Killer

As células Natural Killer (NK) derivam da medula óssea e compartilham o progenitor primário com os linfócitos T. No entanto, expressam marcadores de membrana que também são encontrados em monócitos e granulócitos (3). Apesar das suas semelhanças com os linfócitos, as NK não se desenvolvem no timo nem possuem recetores de célula T (TCR) capazes de reconhecer péptidos apresentados por moléculas do complexo major de histocompatibilidade I (MHC-I) (1, 3). Pelo contrário, expressam à superfície um grande

número de recetores com funções ativadoras ou inibidoras, conhecidos generalizadamente por recetores NK (1). O termo *natural killer* deriva da habilidade das NK em destruir várias células-alvo sem que seja necessária ativação adicional, quando são isoladas do sangue ou do baço (2). Além de destruir células infetadas diretamente, as NK constituem uma fonte importante de interferão gama (IFN- γ), o qual ativa os M Φ s (2, 21).

As NK participam na fase inicial da defesa contra infeções por microrganismos intracelulares e diversos tipos de tumores, podendo também estar implicadas na autoimunidade e reações de hipersensibilidade (22). Quando uma NK interage com outra célula, o resultado é determinado por uma integração de sinais gerados a partir de recetores ativadores e inibidores. Para que não haja destruição de uma célula sadia, os sinais ativadores têm de ser bloqueados por sinais inibitórios (2, 21). Se tal não se verificar, as NK destroem as células-alvo através de um processo que envolve a libertação de grânulos que contêm perforina e granzimas (3).

3.2.2. Proteínas efetoras - As citocinas

As citocinas são proteínas segregadas pelas células da imunidade inata e adquirida que medeiam muitas das funções dessas células. Elas são produzidas em resposta a microrganismos e outros antigénios, e diferentes citocinas estimulam respostas diversas de células envolvidas na inflamação (2). Tal como as hormonas atuam como mensageiras do sistema endócrino, as citocinas atuam como mensageiras do sistema imune, sendo que estas últimas, ao invés do que acontece com as hormonas, exercem os seus efeitos sobretudo por ação autócrina e parácrina. Adicionalmente, as citocinas exibem propriedades de pleiotropia, redundância, sinergia e antagonismo que as distinguem e tornam possível regular a atividade celular de forma coordenada e interativa (3).

Para exercerem a sua função, as citocinas ligam-se a recetores específicos das membranas das células-alvo e deflagram as vias de transdução de sinal que, como resultado, alteram a expressão genética das células em questão (3).

Na tabela 1 estão resumidas as características das principais citocinas envolvidas na imunidade inata.

Tabela 1 - Principais citocinas da Imunidade Inata (adaptado de 2, 3).

Citocina	Fonte celular	Principais alvos e efeitos biológicos
TNF- α	++ M Φ s e MCs; NKs, Linfócitos T	<ul style="list-style-type: none"> • Células inflamatórias e endoteliais - recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local de inflamação e sua ativação; • Hepatócitos - síntese de proteínas de fase aguda; • Hipotálamo - induz febre; • Músculo/Gordura - catabolismo (caquexia).
IFN- α	++ M Φ s; Outros leucócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Todas as células - promove estado antiviral e a expressão aumentada de MHC-I; • NKs - ativação.
IFN- γ	NKs, células Th1	<ul style="list-style-type: none"> • Todas as células - promove estado antiviral, expressão aumentada de MHC-I; • MΦs - ativação.
Quimiocinas	M Φ s, células endoteliais, células T, fibroblastos, plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> • Leucócitos - Quimiotaxia, ativação, migração para dentro dos tecidos.
IL-1	M Φ s, monócitos, células endoteliais	<ul style="list-style-type: none"> • MΦs e neutrófilos - atração quimiotática; • NKs e células endoteliais - estimula a atividade; • Hepatócitos - síntese de proteínas de fase aguda; • Hipotálamo - induz febre.
IL-6	M Φ s, monócitos, células endoteliais, células T	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatócitos - síntese de proteínas de fase aguda.
IL-8	M Φ s, células endoteliais	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos - atração quimiotática.
IL-10	M Φ s, células Th2	<ul style="list-style-type: none"> • MΦs e DCs - inibição da produção de IL-12 e da expressão de MHC-II.
IL-12	M Φ s, DCs	<ul style="list-style-type: none"> • NKs - aumento da citotoxicidade; • Células T - diferenciação em Th1; • NK e células T - aumento da síntese de IFN-γ.
IL-15	M Φ s	<ul style="list-style-type: none"> • NK - proliferação
IL-18	M Φ s	<ul style="list-style-type: none"> • NK - aumento da síntese de IFN-γ
TGF- β	M Φ s, MCs, plaquetas, linfócitos	<ul style="list-style-type: none"> • MΦs e monócitos - atração quimiotática; • MΦs - estimulação da produção de IL-1; • Células epiteliais, endoteliais, linfóides e hematopoiéticas - inibição da proliferação.

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; M Φ s - macrófagos; MCs - mastócitos; NKs - células NK; IFN- α - interferon alfa; MHC-I - complexo major de histocompatibilidade classe I; IFN- γ - interferon gama; IL - interleucina; DCs - células dendríticas; MHC-II - complexo major de histocompatibilidade classe II; TGF- β - fator de crescimento tumoral beta.

3.3. Sistema do complemento

O sistema do complemento desempenha um papel essencial nos mecanismos de defesa do nosso organismo, participando de uma forma decisiva no processo inflamatório e, conseqüentemente, nos mecanismos da imunidade inata (1, 2). Contudo, considerando o carácter inespecífico dos seus mecanismos de ação, o complemento constitui um elo de ligação fundamental para o estabelecimento da imunidade adquirida (1).

O complemento é constituído por uma série complexa de proteínas séricas e de membrana que, no processo de ativação do sistema, são responsáveis pela produção de vários efeitos biológicos, nomeadamente a opsonização, a quimiotaxia, a imunoaderência, a lise celular e a interação com outros sistemas que caracterizam e fundamentam a sua importância no processo inflamatório (1, 2). As proteínas e glicoproteínas que compõem o sistema são sintetizadas sobretudo no fígado, embora MΦs e fibroblastos também produzam quantidades significativas das mesmas (1, 3). Elas estão normalmente presentes no plasma numa forma inativa e são conhecidas como zimogénios; quando o sistema é ativado os zimogénios são convertidos em enzimas ativas através de clivagem proteolítica e adquirem capacidade de, por sua vez, ativarem o componente seguinte da cascata (1, 2, 3).

A ativação do complemento pode processar-se por três vias: A via clássica, a via da lectina e a via alternativa (1, 2, 3). Em cada uma dessas vias são consideradas três fases: a fase de iniciação, a fase de amplificação e a fase de ataque à membrana. As duas primeiras fases são distintas para cada via mas a última é comum a todas elas e termina com a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e conseqüente lise celular (1). O esquema da figura 2 oferece uma visão geral das vias de ativação do complemento.

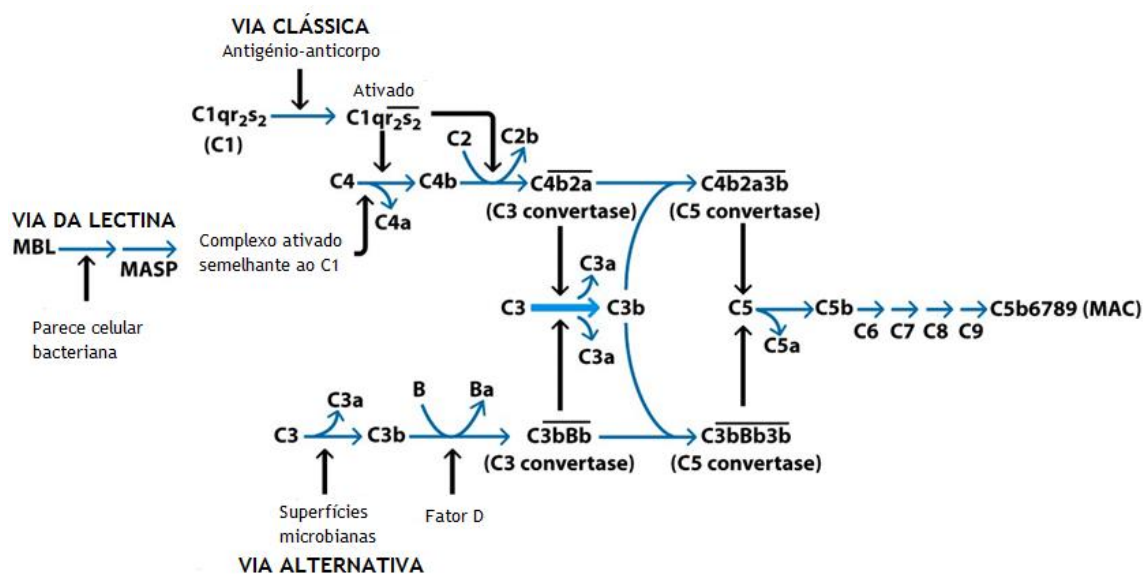


Figura 2 - Visão geral das vias de ativação do complemento (adaptado de 3).

A via clássica é iniciada através da ligação do C1 aos complexos antígeno-anticorpo. A via alternativa é iniciada através da ligação do C3b às superfícies de ativação, tais como paredes celulares bacterianas. A via da lectina é iniciada pela ligação da proteína MBL à superfície do patógeno. A via alternativa utiliza alguns fatores que são únicos, enquanto as vias clássica e da lectina possuem os componentes comuns

após o componente C1. Todas as três vias geram as C3 e C5 convertases e o C5b ligado, que é convertido no MAC através de uma sequência comum de reações terminais. O MAC, complexo final resultante da ativação das três vias, penetra nas membranas plasmáticas das células e forma poros que permitem o movimento livre de água e íons provocando lise celular. A hidrólise de C3 é o principal passo na amplificação de todas as vias, gerando grande quantidade de C3b, que forma parte da C5 convertase. O C3b também pode difundir-se da superfície de ativação e ligar-se aos complexos imunes ou às superfícies celulares estranhas, onde atua como uma opsonina. As setas azuis indicam as etapas da reação. As setas pretas indicam atividade enzimática ou atividade de ativação. MBL - lectina ligante de manose; MASP - serina protease associada ao MBL; MAC - complexo de ataque à membrana.

Por ser inespecífico, o sistema do complemento necessita de mecanismos de regulação para que a sua ação seja restrita a alvos designados (2, 3). Muitos dos componentes que interagem na ativação do complemento são extremamente lábeis e sofrem inativação espontânea conforme se difundem para fora das células-alvo. Além disso, uma série de proteínas reguladoras inativam vários fatores do complemento, sendo que os fatores H e I são os mais importantes (1, 3). O fator H atua na via alternativa ao bloquear a formação da C3 convertase e é facilitador da ação enzimática do fator I, que atua em todas as vias ao clivar o C4b e o C3b em diversos fragmentos que podem participar noutros processos biológicos, nomeadamente na opsonização (1). A proteína de ligação ao C4 (C4bp), o fator acelerador da dissociação (DAF), o cofator proteico de membrana (MCP) e o Recetor do complemento tipo 1 (CR1) funcionam todos como cofatores na ação do fator I (3).

Sintetizando, o MAC é capaz de lisar um amplo espectro de microrganismos, vírus, eritrócitos e células nucleadas. Como as vias de ativação alternativa e da lectina ocorrem sem uma interação inicial antigénio-anticorpo, estas vias atuam como sistemas inatos de defesa não-específica contra infeções. No entanto, muitas das atividades biológicas do complemento dependem da ligação dos fragmentos, produzidos aquando da ativação do sistema, a recetores do complemento que são expressos em inúmeras células (3). São particularmente importantes os efeitos do C3a e do C5a, que se comportam como anafilatoxinas e ligam-se a recetores específicos dos basófilos e MCs tecidulares, desencadeando a libertação de mediadores inflamatórios, maioritariamente histamina. A permeabilidade vascular e a vasodilatação resultante podem também ser alcançadas pela ação direta destes fragmentos. O C5a tem efeitos mais vastos e intensos que o C3a, particularmente no efeito quimiotático exercido sobre os neutrófilos, sendo também um ativador dos mesmos (2, 3). No que diz respeito à opsonização, o C3b é a principal opsonina do sistema do complemento e se as células fagocíticas experimentarem a ligação dos seus recetores ao complexo C3b-antigénio, a fagocitose será estimulada (3).

3.4. Fagocitose

A fagocitose é um processo dependente de energia que consiste no englobamento de partículas e microrganismos com diâmetro superior a 5µm. O primeiro passo envolve o reconhecimento do micróbio e, para isso, os fagócitos expressam recetores de reconhecimento de padrão (PRR) e recetores para opsoninas e anticorpos que revestem os

patogénios (2). Dos PRR conhecidos, acredita-se que o recetor de manose, que se liga aos açúcares da superfície dos microrganismos e células envelhecidas, e os recetores *scavenger*, com capacidade para se ligar a inúmeros ligandos, inclusive lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram-negativas e ácidos lipoteicóicos das Gram-positivas, desempenham função essencial no desencadear da fagocitose. Já os recetores tipo *toll* (TLR), também expressos pelos fagócitos, parecem funcionar como ponte entre a fagocitose e outras funções efetoras da imunidade inata, não existindo evidência que possam ser promotores da fagocitose (1). Para o reconhecimento opsonico, os fagócitos servem-se essencialmente dos recetores do complemento 1 e 2 (CR1 e CR2) e dos recetores Fc, que se ligam aos fragmentos do complemento e à porção Fc dos anticorpos, respetivamente (1, 2, 3).

Quando o fagócito entra em contacto com o micróbio, emite dois pseudópodes que o envolvem e logo depois se fundem, formando-se um vacúolo designado fagossoma. Após deslocar-se para a intimidade do citoplasma, o fagossoma funde-se com as membranas dos lisossomas e constitui-se assim o fagolisossoma, local onde os mecanismos microbicidas estão concentrados (1, 2).

O repertório microbicida dos fagócitos conta com mecanismos independentes do oxigénio, onde se destacam o papel das enzimas proteolíticas, dos péptidos antimicrobianos e do óxido nítrico (NO), e com mecanismos dependentes do oxigénio, consequentes da explosão respiratória que culmina na produção de espécies reativas do oxigénio (ROS) altamente eficazes na destruição de microrganismos (1, 2, 3).

3.5. A Resposta Inflamatória

A inflamação é o processo que o organismo dispõe para localizar, neutralizar ou eliminar um agente agressor (1). A resposta inflamatória aguda é de início rápido e de curta duração, de poucos minutos a poucos dias, e caracteriza-se pela exsudação de líquido, proteínas plasmáticas e um acúmulo de leucócitos (23). Quando a reação inflamatória não é suficiente para atingir tal objetivo, a sua permanência permite o estabelecimento de uma resposta imunológica adaptativa (1).

Os pontos marcantes de uma resposta inflamatória aguda localizada são edema, eritema, calor, dor e perda de função (3). Minutos após a lesão tecidual, ocorre vasodilatação que resulta num aumento de volume sanguíneo na área e consequente eritema (2, 3). A permeabilidade vascular também aumenta e origina o acúmulo de fluídos e leucócitos no tecido (23). Muitas destas alterações vasculares são devidas aos efeitos indiretos das anafilatoxinas do complemento, tais como C3a e C5a, que induzem a desgranulação dos basófilos e dos MCs locais com a libertação de histamina (3).

Poucas horas após o início destas alterações vasculares e devido a ação das quimiocinas produzidas pelo próprio tecido infetado, os neutrófilos aderem às células endoteliais e migram para os tecidos, onde realizam a fagocitose dos patogénios invasores e libertam mediadores pró-inflamatórios (1, 2). Os MΦs chegam passadas 5 a 6 horas e,

aquando da ativação através dos PRR, libertam interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que amplificam a resposta inflamatória ao incitar um aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais vasculares e um aumento da produção de quimiocinas (3). Isto resulta num influxo de mais células efetoras, incluindo linfócitos (1, 3). Em simultâneo, a IL-1 e o TNF- α têm efeitos sistémicos ao atuar no hipotálamo e nos hepatócitos induzindo, respetivamente, febre e produção de proteínas de fase aguda. A proteína C reativa (PCR) é o protótipo das proteínas de fase aguda e os seus níveis séricos aumentam 1000 vezes durante a resposta inflamatória aguda (3).

A duração e a intensidade da inflamação devem ser cuidadosamente reguladas para controlar o dano tecidular e facilitar os mecanismos de reparação dos tecidos necessários para a cicatrização. O fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) desempenha um papel importante na limitação da resposta inflamatória, além de promover o acúmulo e proliferação de fibroblastos, células cruciais para a reparação apropriada do tecido (3).

A resposta inflamatória torna-se crónica se existir persistência do antigénio. O acúmulo de M Φ s ativos é o marco da inflamação crónica. Duas citocinas em particular, o IFN- γ e o TNF- α , desempenham um papel central no desenvolvimento e manutenção da inflamação crónica. Um dos efeitos mais notáveis do IFN- γ é a sua capacidade em ativar os M Φ s, resultando dessa ativação o aumento na expressão do complexo major de histocompatibilidade II (MHC-II), aumento na produção de citocinas e o aumento da atividade microbicida (3). O aglomerar de M Φ s ativados é responsável por grande parte da lesão tecidular devido à libertação de enzimas hidrolíticas, ROS e intermediários do NO (3, 23). Também o TNF- α parece contribuir para o desgaste dos tecidos, o que é característico da inflamação crónica (3).

3.6. Nova perspetiva da Imunidade Inata

Durante mais de meio século, considerou-se que o sistema de defesa do ser humano era exercido por mecanismos imunes inatos e por mecanismos imunes adaptativos. A imunidade inata reage instantaneamente aquando da invasão de um patógeno mas era considerada inespecífica e incapaz de produzir memória imunológica. Durante a última década, com a descoberta dos PRR, tais como TLR, recetores de lectina tipo C (CLR) e recetores tipo NOD (NLR), o dogma da imunidade inata tem vindo a alterar-se, uma vez que estes recetores permitem o reconhecimento específico de diversos microrganismos, apesar de não ser específico para a espécie (24).

Numa recente revisão que detalha os argumentos para os efeitos protetores da memória inata foi proposto o termo imunidade treinada para refletir a proteção contra reinfeção pelo mesmo ou por diferentes patógenos que ocorre em organismos sem a vertente adaptativa da imunidade, tais como plantas, invertebrados e mamíferos com falta de células T e B funcionantes (23, 24). A descoberta de características de memória em células da

imunidade inata, tais como NK e monócitos, foi vista como uma mudança de paradigma na imunidade (24).

Diversos estudos demonstraram que as NK oferecem proteção sustentada ao hospedeiro de uma forma independente de células T e B; ela depende da expressão de recetores Ly49, que leva ao recrutamento das cinases Syk e SAP70 para a ativação a longo-termo das NK contra reinfeções por herpesvírus, tais como o citomegalovírus (CMV) (24). Durante a reativação do CMV em doentes, a expansão das NKG2C⁺ NK, foi demonstrada (26).

No que diz respeito aos monócitos, o LPS parece induzir diversos tipos de modificação epigenética de uma forma estímulo-específica. Enquanto a maioria dos marcadores epigenéticos esvanece ao longo do tempo, a metilação de histonas em H3Kme1 nos chamados potenciadores latentes, permanece como marcador epigenético ativo e confere memória imunológica de longo-termo (27). A imunidade treinada induzida *in vivo* através de reprogramação epigenética resultou em proteção de ratos deficientes em células T e B contra candidíase sistêmica letal, sublinhando a importância terapêutica potencial da imunidade treinada (28).

Em resumo, estes dados compõem um cenário no qual a imunidade inata exhibe características adaptativas, já que pode ser treinada para providenciar proteção parcial contra infecções de uma forma independente da clássica resposta imune mediada por células T e B. Os monócitos e as NK emergem como os principais intermediários da imunidade treinada em mamíferos, com a reprogramação funcional a mediar esses efeitos. Estas descobertas poderão ter impacto significativo no tratamento de infecções refratárias e requerem mais estudo e consolidação (24).

4. Bisfenol A

O Bisfenol A (BPA) (figura 3) é um dos produtos químicos mais fabricados mundialmente, estando a sua produção estabelecida em torno das 3 milhões de toneladas por ano, com um crescimento esperado de 6-10% na demanda anual (29). Como resultado da sua produção em massa, um grande número de derivados do BPA são libertados para o ambiente, contribuindo para um aumento da poluição e contaminação dos solos e das águas subterrâneas (30). À temperatura ambiente, o BPA ocorre na forma de cristais brancos ou incolores de odor suave, apresentando baixa volatilidade e baixa solubilidade aquosa (31, 32). Diversas experiências *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o BPA atua como um disruptor endócrino (DE) no organismo humano (29). Considerado um xenoestrogénio, o BPA pode ligar-se a recetores de estrogénio (ER), apesar da sua afinidade para estes ser 1000 a 2000 vezes inferior que a do 17 β -estradiol (E2) (32).

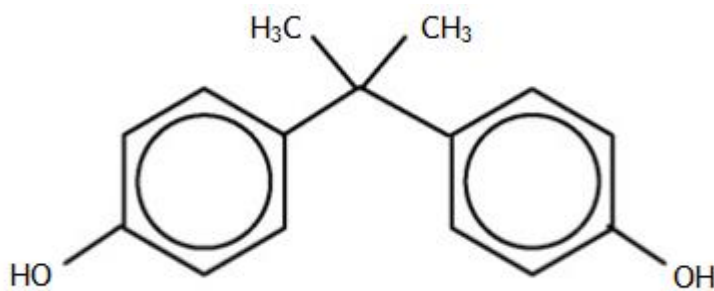


Figura 3 - Estrutura química do Bisfenol A (adaptado de 29).

O processo de manufatura do BPA envolve a reação entre acetona e fenol num processo contínuo e fechado sob determinadas condições de temperatura, utilizando um catalisador ácido (31). A substituição de átomos do BPA em diferentes números e posições resulta na formação de compostos análogos, devido à sua estabilidade química e térmica, geralmente possuem as propriedades desejadas para uma variedade de aplicações industriais (33).

O BPA é utilizado na produção de plásticos de policarbonato e resinas epoxídicas que são encontrados em inúmeros produtos da nossa vida diária, incluindo recipientes alimentares, garrafas de plástico, adesivos, produtos eletrónicos, brinquedos, equipamento de assistência médica, compósitos e selantes odontológicos, lentes de contacto, cosméticos, papel impresso e equipamento desportivo (11, 12, 13, 14, 30). A exposição ao BPA nos humanos ocorre principalmente através da dieta, uma vez que o calor e o contacto com compostos ácidos ou básicos pode hidrolisar as ligações éster que unem os monómeros do

BPA, levando ao transvasamento do químico a partir dos recipientes para os alimentos ou bebidas (14, 15, 29). A ingestão de água contaminada em regiões fortemente industrializadas representa outra importante fonte de exposição (9). O contacto dérmico e a inalação constituem vias suplementares de exposição humana ao BPA (14, 15).

Quando administrado por via oral em humanos, o BPA é extensamente absorvido, sendo metabolizado primariamente no fígado em glucoronídeo de BPA, forma inativa na qual é excretado pelo rim (31). Estima-se que o seu tempo de meia-vida no copo humano seja 5,6 horas (30). Adicionalmente, o BPA possui ampla distribuição no organismo e pode ser detetado no sangue, na urina, no fluido amniótico, no cordão umbilical e na placenta (31).

A preocupação gerada em torno do BPA está a aumentar, apoiada em diversos estudos que reportam um potencial efeito nocivo para a saúde humana, inclusive no sistema imunitário, não só no indivíduo exposto como também na sua descendência e futuras gerações. De facto, algumas medidas já foram tomadas, nomeadamente em toda a Europa, onde o BPA foi proibido de constar nas fórmulas das garrafas de plástico destinadas ao consumo infantil (9). Assim, o BPA representa um desafio importante para a nossa sociedade industrializada e merece o escrutínio do seu impacto geral na saúde humana, pois trata-se de um DE ao qual somos expostos continuamente.

5. Efeitos do Bisfenol A na Dinâmica da Imunidade Inata

O BPA, sendo um constituinte de diversos produtos de consumo, atraiu as atenções da comunidade científica devido o seu potencial para a exposição humana. No entanto, por ser considerado um xenoestrogênio, tem sido dada mais relevância aos efeitos do BPA na função reprodutora e só recentemente se começou a estudar a sua repercussão no sistema imunitário. Nesta parte do trabalho, procuram-se apurar os possíveis efeitos do BPA nos diversos aspetos da imunidade inata, incorporando dados provenientes de vários estudos realizados.

5.1. Interação com Recetores de Estrogénio

A sinalização celular estrogénica é mediada através de dois recetores de estrogénio (ER), o recetor de estrogénio alfa (ER α) e o recetor de estrogénio beta (ER β), ambos pertencentes à superfamília dos recetores nucleares de fatores de transcrição. Assim como muitos outros membros da família, os ERs contêm domínios distintos evolutivamente conservados estruturalmente e funcionalmente. O domínio central, de ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA), está envolvido no reconhecimento e ligação ao DNA, enquanto que a ligação ao ligando ocorre no domínio multifuncional localizado no terminal COOH, o domínio de ligação ao ligando (34). Após interação com o ligando, os ERs sofrem alterações conformacionais e ligam-se diretamente a elementos de resposta estrogénica (ERE) ou são indiretamente acoplados ao DNA ao formar complexos com outros fatores de transcrição que, por seu turno, se ligam ao DNA através das suas próprias sequências, levando ao início da transcrição e a modificações epigenéticas da cromatina (35).

Os mecanismos mediados por ERs influenciam tanto o desenvolvimento como a função das células do sistema imunitário. O ER α atua diretamente nos progenitores mielóides e linfóides para promover vias de maturação, induzindo mudanças epigenéticas que influenciam a resposta funcional de células maduras ou, por outro lado, comprometendo as células a uma diferenciação específica. O desenvolvimento de células da imunidade inata é particularmente suscetível a mudanças na concentração do ligando de ERs no hospedeiro, devido ao seu tempo de vida curto. Adicionalmente, diversas investigações mostraram que a produção de citocinas pro-inflamatórias é também influenciada pelo ER α em resposta à estimulação de TLRs de M Φ s e DCs (36).

Sendo um xenoestrogênio, o BPA tem a capacidade de interagir com os ERs e evidenciar atividade agonista ou antagonista (9, 14). Apesar da sua afinidade pelos ERs ser

cerca de 1000-2000 vezes inferior à do E2, o BPA pode exercer efeitos dramáticos por esta via (9).

No estudo realizado por Kim e Jeong, administrou-se diferentes doses de BPA, associadas ou não a LPS, para determinar os seus efeitos na produção de NO por MΦs isolados de ratinhos. Apesar de não ter afetado a gênese de NO quando administrado isoladamente, o BPA mostrou-se capaz de diminuir a produção de NO induzida por LPS em todas as concentrações utilizadas (1, 10 e 50 μM), sendo o efeito dose-dependente. Com o intuito de avaliar se os efeitos supressores do BPA na produção de NO induzida por LPS poderiam ser mediados por ERs, utilizou-se o anti-estrogénio puro ICI182.780. Verificou-se que os efeitos inibitórios do BPA foram antagonizados pelo ICI182.780, sugerindo que os ERs medeiam a atividade supressora do BPA (37).

Guo e os seus colaboradores investigaram o efeito do BPA, em combinação com o TNF- α , na indução de DCs humanas, com o propósito de determinar se o BPA poderia modular diretamente a função das DCs da mesma forma que o estrogénio. A produção e libertação de quimiocinas é um importante atributo das DCs maduras, razão pela qual os investigadores analisaram o seu perfil após o tratamento com 0.1 μM de BPA por 24 horas, na presença de 20 ng/ml de TNF- α . Verificou-se uma ampliação significativa na expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) CCL1 após a administração do BPA, que se mostrou maior e mais continuada no tempo quando comparada com o aumento gerado apenas pelo TNF- α . A utilização de 0.1 μM de E2 reproduziu os mesmos efeitos obtidos com o BPA. Na ausência de TNF- α , o BPA e o E2 não produziram resultados significativos na produção de quimiocinas. A adição do antagonista estrogénico ICI182.780 ao tratamento com BPA ou E2 aboliu completamente a ação estimuladora de ambos na produção de CCL1. Estes resultados indicam que o aumento na produção de CCL1 induzida pelo BPA é consequência de uma atividade semelhante à do estrogénio em DCs estimuladas por TNF- α . A afinidade do BPA para os ERs é 1000-2000 vezes menor que a do E2, indicando que o BPA pode ativar estes recetores apenas em doses mais altas. No entanto, o BPA exerceu o mesmo efeito que o E2 na mesma dose utilizada (0.1 μM), no que diz respeito à produção de CCL1 por DCs estimuladas com TNF- α . O mecanismo preciso pelo qual a exposição ao BPA resultou num efeito de igual extensão ao observado com a exposição ao E2 não é conhecido, mas é concebível que o BPA se ligue de forma diferente dentro do domínio de ligação ao ligando dos ERs e recrute cofatores distintos (38).

Com base nestes estudos, podemos afirmar que os efeitos do BPA no sistema imune podem ser mediados através dos ERs, atuando nestes como agonista ou antagonista estrogénico. Adicionalmente, podemos concluir que a afinidade do BPA para com os ERs não está diretamente relacionada com a sua atividade biológica. Assim, ao pensarmos nos possíveis efeitos do BPA, é interessante termos em consideração a vasta gama de ação dos ER na imunidade, uma vez que virtualmente todas as células deste sistema expressam pelo menos um subtipo destes recetores e estão suscetíveis a modulação pelo BPA.

5.2. Proliferação, Diferenciação e Migração de Células da Imunidade Inata

Sob condições de homeostase, a maioria das células estaminais hematopoiéticas (HSC) permanece quiescente. Todavia, conforme as necessidades do organismo, as HSCs exibem grande capacidade de proliferação e podem diferenciar-se e comprometer-se a uma linhagem sanguínea específica (3). A diferenciação e maturação subsequentes diferem entre os tipos celulares e normalmente implicam a expressão de novas proteínas, a síntese e liberação de novos fatores e a obtenção de novas capacidades efetoras, até se alcançar o fenótipo adulto.

Numa investigação conduzida por Pisapia e colaboradores, foram estudados os efeitos do BPA na diferenciação de células dendríticas da medula óssea (BMDC) de ratinhos. As BMDCs foram isoladas do fêmur e da tíbia de ratinhos fêmea com 8-12 semanas de vida, sendo posteriormente expostas ao BPA (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M) na presença de 200 U/ml de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Após 8 dias, o fenótipo das DCs foi avaliado utilizando-se o marcador CD11c, típico de DCs maduras. Observou-se que 10^{-5} M de BPA induziram a diferenciação de 91% das DCs para CD11c⁺, enquanto no grupo de controlo o valor observado foi de 49%. Nos grupos expostos a 10^{-6} e 10^{-7} M de BPA, a diferenciação das células ficou-se pelos 70 e 62%, respetivamente. Estes resultados parecem indicar que o BPA induz a diferenciação de DCs e que mantém essa capacidade mesmo em doses baixas (39). As vias pelas quais o BPA exerce este efeito necessitam ser elucidadas. Contudo, é sabido que a indução da diferenciação de DCs pode ter efeitos adversos, sensibilizando as funções do sistema imune e/ou estimulando a proliferação inadequada de linfócitos.

No estudo realizado por Watanabe *et al.*, promielócitos HL-60 foram induzidos a diferenciarem-se em células neutrofílicas na presença de 1,25% sulfóxido de dimetilo, 25 ng/ml de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e BPA em diferentes concentrações. Após 6 dias de cultura, a capacidade de produção de superóxido, uma das mais importantes funções dos neutrófilos, foi determinada. Em concentrações baixas (0.1 - 10 nM), o BPA aumentou significativamente a produção de superóxido, com valores 20-30% superiores aos do grupo controlo; concentrações mais elevadas (1 - 10 μ M) de BPA não produziram qualquer efeito estimulador. A expressão de CD18, um marcador típico da diferenciação dos granulócitos, foi também investigada e verificou-se que na concentração de 1 nM o BPA foi capaz de a aumentar em 20%, comparativamente com o grupo controlo. Não foram observáveis efeitos dose-dependentes quer na expressão de CD18 quer na produção de superóxido. Por fim, os investigadores produziram um vetor luciferase para avaliar a atividade do fator de transcrição PU.1, conhecido por estar envolvido especificamente na diferenciação de granulócitos, e introduziram-no nas células HL-60. Repetindo as condições iniciais, o BPA na concentração de 1 nM mostrou-se capaz de aumentar a atividade da luciferase em 60%, indicando claramente um efeito promotor na atividade do fator de transcrição PU.1. Os resultados deste estudo sugerem que o BPA possa exercer um efeito intensificador na

maturação neutrofílica de leucócitos através da ativação do fator de transcrição PU.1 por uma via independente dos ERs, pois o tamoxifeno não suprimiu os resultados obtidos com o BPA (40).

A migração, descrita como movimentação constante dos componentes celulares imunes entre o sangue e os tecidos, é uma propriedade única e distinta do sistema imunitário. Trata-se de um processo complexo e altamente regulado que permite às células executarem as suas funções onde realmente são necessárias (2).

Sugita-Konishi e os seus colaboradores examinaram o efeito do BPA nos mecanismos de defesa inata de ratos contra *Escherichia coli* (E. coli) K-12. O BPA (5mg/kg) foi dissolvido em óleo de milho e administrado no dorso de ratinhos por via subcutânea (0.1ml) durante 5 dias consecutivos; passados 3 dias da última dose de tratamento, os ratinhos foram injetados pela via intra-peritoneal com 1.0×10^8 E. coli K-12. O grupo controlo foi tratado com doses equivalentes de óleo de milho. Numa primeira análise, os investigadores determinaram o efeito do BPA no perfil das células imunes no baço, realizando medições no último dia de tratamento com BPA e no primeiro dia de exposição à E. coli. Verificou-se uma diminuição no número total de MΦs no baço em ambas as medições, quando comparado com o grupo controlo. Os resultados sugerem que o BPA causou uma redução na população de células imunocompetentes e que esse efeito teve continuidade após a cessação do tratamento. Adicionalmente, a acumulação de neutrófilos e MΦs no sítio de infeção foi analisada. A tendência foi a mesma para os neutrófilos em ambos os grupos, com um aumento marcado nesta população 6 horas após a infeção; no entanto, verificou-se um número maior de neutrófilos acumulados no grupo tratado com BPA. No que diz respeito aos MΦs, a população no grupo exposto ao BPA encontrava-se diminuída em relação ao controlo. Estes resultados demonstram que o tratamento com BPA promoveu a acumulação de neutrófilos na cavidade peritoneal e suprimiu a migração de MΦs para o local de infeção (41).

Os estudos anteriormente referidos apontam para uma possível interação do BPA na proliferação, na diferenciação e na migração de leucócitos, mesmo quando utilizado em concentrações consideradas baixas.

5.3. Apoptose

A apoptose é uma via de morte celular programada que ocorre em inúmeras situações fisiológicas e patológicas, na qual as células ativam enzimas que degradam o seu DNA e as suas proteínas nucleares e citoplasmáticas (23). Na imunidade, a apoptose exerce um papel fundamental no desenvolvimento e modulação das células efectoras, mais compreendido e estudado na vertente adaptativa, particularmente na diferenciação e seleção de linfócitos T no timo. Adicionalmente, a apoptose funciona como um mecanismo efetor da imunidade contra células infetadas, neoplásicas ou estranhas, podendo ser induzida por moléculas e proteínas solúveis ou células efectoras (42).

A apoptose resulta da ativação de caspases, que depende de um balanço estritamente ajustado entre proteínas pró e anti-apoptóticas. Duas vias distintas culminam na ativação das caspases: a via mitocondrial ou intrínseca e a via do recetor de morte ou extrínseca. Embora estas vias se possam intercepar, elas geralmente são ativadas sob diferentes condições, envolvem diferentes moléculas e servem diferentes propósitos fisiopatológicos (23).

As caspases são cisteína proteases sintetizadas na forma de zimogénios inativos que necessitam submeter-se a um processamento autocatalítico ou serem clivados por caspases ativas para adquirirem maturação (43). Após indução da apoptose, as caspases-8 e/ou -9 (caspases iniciadoras) processam proteoliticamente as caspases-3, -6 e -7 (caspases efetoras) que, por seu turno, clivam diversos alvos nucleares e do citoesqueleto, levando à fragmentação da célula (23, 43).

A ativação dos recetores de morte, nomeadamente o recetor Fas e o recetor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1), desencadeia a via extrínseca da apoptose (23). Após ligação ao ligando, os recetores sofrem mudanças conformacionais e unem-se a proteínas adaptadoras intracelulares que, por seu turno, ligam-se a caspases iniciadoras (maioritariamente à caspase-8) e formam o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A cascata de morte prossegue com a clivagem das caspases efetoras (43).

A via intrínseca depende da libertação de proteínas mitocondriais para o citoplasma, que ocorre em resposta a diversos estímulos, tais como radiação, stress oxidativo e fragmentação do DNA. O citocromo C é uma proteína envolvida na cadeia de transporte de eletrões da mitocôndria; uma vez no citoplasma, exerce uma função chave na indução da apoptose, ao ligar-se à Apaf-1 para formar o apoptossoma. A procaspase-9 é de seguida recrutada para o complexo, onde se torna ativa e cliva as caspases efetoras (43). A regulação desta via depende da permeabilidade da membrana da mitocôndria, que é controlada por um conjunto de proteínas pertencentes à família Bcl-2. Dentro da família Bcl-2 existem proteínas pró-apoptóticas, entre as quais a Bax e a Bak que se inserem na membrana mitocondrial e formam poros que permitem a passagem do citocromo C para o citoplasma, e proteínas anti-apoptóticas, das quais se destacam a Bcl-2 e a Bcl-xL que antagonizam os efeitos da Bax e da Bak (23).

No que diz respeito à inflamação, pouco se sabe acerca das vias exatas que levam à sua resolução, que, em condições normais, acontece sem lesão tecidual marcada. Um pré-requisito à cessação da inflamação é a remoção dos neutrófilos acumulados nas fases iniciais da mesma, algo que parece acontecer *in situ*. Com o passar do tempo, um número crescente de neutrófilos sadios experimenta mudanças morfológicas e expressa um padrão de fragmentação da cromatina indicativo de morte programada, podendo assim ser reconhecidos e fagocitados por MΦs (44). Assim, a apoptose parece também influenciar a extensão da resposta inflamatória estabelecida pela imunidade inata.

No estudo realizado por Li e os seus colaboradores, o bisfenol-A-glicidil-metacrilato (BisGMA), um análogo do BPA, foi utilizado em diferentes concentrações (0 - controlo, 0,1, 0,3, 1 e 3 µmol/L) para discriminar o seu efeito em MΦs, nomeadamente na atividade das

caspsases e no tipo de morte impingido. Após exposição ao BisGMA, a população de células em apoptose inicial encontrou-se aumentada, oscilando de 0.06% no grupo de controlo para 0.98%, 1.24% e 5.26% nos grupos tratados respetivamente com 0.3, 1 e 3 $\mu\text{mol/L}$ de BisGMA. A população de M Φ s em apoptose tardia também se mostrou aumentada em resposta ao tratamento, passando de 0.02% no grupo controlo para 1.39% e 4.89% nos grupos tratados com 1 e 3 $\mu\text{mol/L}$ de BisGMA, respetivamente. Verificou-se ainda uma indução na atividade das caspsases, expressa em unidades relativas de fluorescência (RFU), após a exposição ao BisGMA, sendo o efeito dose-dependente. A atividade da caspase-3, avaliada em 119 RFU no grupo controlo, mostrou-se aumentada nos grupos tratados com 0.1-3 $\mu\text{mol/L}$ de BisGMA, oscilando entre 274 e 537 RFU. A caspase-8 também exibiu maior atividade, passando de 239 RFU no grupo de controlo para 372 e 426 RFU nos grupos tratados com 1 e 3 $\mu\text{mol/L}$ de BisGMA, respetivamente. A caspase-9 sofreu estimulação semelhante, verificando-se valores entre 184 e 259 RFU na população de células tratada com 0.1-3 $\mu\text{mol/L}$ de BisGMA, em contraste com as 110 RFU apuradas no grupo de controlo. Finalmente, confirmou-se os resultados obtidos por Western blot; o BisGMA diminuiu a expressão de procaspase-3, -8, e -9 e aumentou a expressão de caspase-3, -8 e -9 clivadas, de uma forma dose-dependente (45). Estes achados indicam que o BisGMA pode induzir apoptose em M Φ s e que a via pela qual exerce esse efeito é através da estimulação da atividade das caspsases, podendo causar cito e genotoxicidade por este mecanismo.

Numa outra investigação, Kim *et al.* testaram as influências de diversos DEs nas respostas imunes de M Φ s isolados de ratinhos. O BPA foi adicionado às células, previamente estimuladas com LPS por 12 ou 18 horas, nas concentrações de 20 e 200 μM . O grupo controlo foi tratado apenas com LPS. Posteriormente, as células foram coradas com Anexina V e Iodeto de Proídeo (PI) e sujeitas a citometria de fluxo. Verificou-se que a maioria das células tratadas com 20 μM de BPA em combinação com o LPS era negativa para a Anexina V e PI, resultado comparável ao das células do grupo de controlo. No entanto, mais de 30% das células tratadas com 200 μM de BPA mostraram-se Anexina V⁺ / PI⁻, fenótipo associado à apoptose (46).

Assim, a indução da apoptose após exposição ao BPA constitui uma das possíveis vias pela qual este composto atua no organismo, afetando a qualidade das respostas imunitárias.

5.4. Síntese de Óxido Nítrico

O NO é um radical livre inorgânico gasoso que se difunde livremente das células que o produzem para o local de ação (47). A importância do NO no funcionamento biológico é evidente a partir dos inúmeros processos fisiológicos que são regulados por esta molécula. Além do seu papel na regulação do relaxamento do músculo liso e da pressão arterial, o NO está envolvido em muitas outras funções do organismo, incluindo na imunidade inata. Três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) são conhecidas e são codificadas por genes específicos. A NOS2 é uma isoforma induzível que foi originalmente identificada em M Φ s e é

referida como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (48). A expressão de iNOS é regulada por citocinas e determinada principalmente pela síntese de novo de mRNA iNOS em resposta a estímulos específicos, contrastando com as restantes isoformas que existem nas células como proteínas preformadas e cuja atividade é estimulada pela elevação de cálcio intracelular e a ligação da calmodulina (47, 49). Na presença dos cofatores essenciais à reação, de entre os quais se destaca o oxigénio molecular, as NOS convertem L-arginina em NO e L-citrulina numa proporção estequiométrica de 1:1 (48).

A produção de NO é uma característica das células do sistema imunitário, tais como CDs, NKs, MCs e fagócitos (49). O NO é um mediador chave na imunidade inata, particularmente na resposta inflamatória, onde participa na vasodilatação, na adesão dos neutrófilos, na produção de citocinas e na morte de microrganismos fagocitados (47, 48). A toxicidade do NO para o invasor patogénico está relacionada, pelo menos em parte, à sua capacidade de inibir a ribonucleotídeo redutase e interferir com a síntese do DNA. Apesar do seu poder tóxico natural, a reatividade do NO leva a formação de outros intermediários com maior toxicidade, destacando-se novamente o papel do oxigénio nestas reações (48).

Kim e Jeong estudaram os efeitos do BPA na produção de NO e nos níveis de mRNA iNOS em MΦs peritoneais e MΦs RAW 264.7 isolados de ratinhos. Para isso, separaram as células em cultura e adicionaram doses distintas de BPA, associado ou não a LPS (conhecido estimulador da produção de NO e de mRNA iNOS em MΦs), e colheram os dados após 24 horas de incubação. O tratamento apenas com 50 µM de BPA não mostrou ter qualquer efeito na produção de NO. No entanto, verificou-se um decréscimo na produção de NO induzida por 0,5 µg/ml de LPS nos grupos tratados com 1, 10 e 50 µM de BPA, de uma forma dose-dependente. Verificaram-se ainda os mesmos resultados para a produção de mRNA iNOS induzida por LPS, que se mostrou diminuída nos grupos tratados com BPA (37). O mecanismo exato pelo qual o BPA suprimiu a expressão tanto de NO como de mRNA iNOS não é conhecido, mas os autores sugerem que possa envolver uma interação direta entre os ERs e o fator nuclear Kappa B (NF-κB).

Num outro estudo, Byun e os seus colaboradores, dissolveram BPA em óleo de milho e administraram a ratinhos por via oral, durante 5 dias consecutivos num período de 4 semanas, nas doses de 100, 500 e 1000 mg/kg/dia. O grupo controlo foi tratado com doses semelhantes de óleo de milho. Após extração do fluido peritoneal e isolamento dos MΦs, adicionaram 1 µg/ml de LPS e incubaram durante 4 dias, após os quais mediram os níveis de NO. Para todas as doses de BPA administradas, a produção de NO pelos MΦs peritoneais encontrou-se diminuída, com a depleção a ser mais significativa no grupo que foi sujeito à dose de 500 mg/kg/dia. Para avaliar os efeitos *in vitro* do BPA, os MΦs peritoneais isolados de ratinhos do grupo de controlo, estimulados com 1 µg/ml de LPS, foram expostos a doses de 1, 10 e 100 µM de BPA durante 4 dias, após os quais verificou-se uma diminuição na quantidade de NO produzida (27.3, 39.2 e 54.1%, respetivamente, em comparação com a cultura controlo sem adição de BPA) (50).

Por seu lado, Hong *et al.* conduziram uma experiência para investigar os possíveis efeitos de diversos DEs na produção de NO por MΦs de ratinhos, *in vitro* e *ex vivo*, em resposta à endotoxina bacteriana LPS. No ensaio *in vitro*, os MΦs foram expostos a 10 µg/ml de diversos DEs, incluindo o BPA, e posteriormente estimulados com 10 ng/ml de LPS, sendo os níveis de NO avaliados 24 horas depois. A produção de NO induzida por LPS nas células tratadas com BPA mostrou-se ligeiramente aumentada ($9.1 \pm 2.9\%$) em comparação com o grupo controlo, não exposto a qualquer DE. No ensaio *ex vivo*, os ratinhos foram injetados por via subcutânea com 1mg de DE, sendo os MΦs extraídos 1 dia depois e estimulados com 1 ou 10 ng/ml de LPS e 1000 U/ml IFN-γ durante 20 horas adicionais. Os níveis de NO nos MΦs tratados com BPA, apesar de ligeiramente aumentados ($5.5 \pm 21.9\%$ para 1 ng/ml de LPS e $1.6 \pm 7.7\%$ para 10 ng/ml de LPS), não diferiram significativamente dos do grupo de controlo (51).

No seu conjunto, os resultados dos diferentes estudos mostram que o efeito do BPA na ativação de MΦs induzidos por LPS e, conseqüentemente, na produção de NO, varia de acordo com o tipo de ensaio realizado e concentração de BPA utilizada. Apesar da superprodução de NO ser prejudicial para o organismo devido aos seus efeitos citotóxicos, a subprodução de NO também pode provocar efeitos deletérios, uma vez que este mediador tem um papel fundamental nos mecanismos de defesa inata, nomeadamente na eliminação de bactérias. Assim, ao interferir na produção de NO, o BPA parece ter o potencial de alterar a qualidade da resposta imune do hospedeiro em resposta a estímulos bacterianos. Os mecanismos pelos quais o BPA exerce os seus efeitos necessitam ainda ser clarificados.

5.5. Fagocitose

No estudo supracitado realizado por Sugita-Konishi e seus colaboradores, examinou-se o efeito do BPA nos mecanismos de defesa inata de ratinhos BALB/c contra *E. coli* K-12. O BPA, utilizado numa dose de 5mg/kg, mostrou reduzir a população de células imunocompetentes, favorecendo a acumulação de neutrófilos e suprimindo a migração de MΦs para o local de infeção. Ainda no mesmo estudo, a eliminação da *E. coli* da cavidade peritoneal e do baço foi quantificada. Os resultados mostram que o número de bactérias na cavidade após 24 horas de infeção encontrava-se reduzido a 5.0×10^3 células por ratinho no grupo controlo, em contraste com as 5.0×10^4 células por ratinho encontradas no grupo tratado com BPA. O número de bactérias que migraram desde a cavidade peritoneal para o baço era de 5×10^2 células por ratinho no grupo controlo e de 5×10^4 células por ratinho no grupo sujeito à exposição ao BPA. Estes achados sugerem que o tratamento com BPA reduziu a atividade de depuração bacteriana na cavidade peritoneal e no baço. Como os neutrófilos desempenham um papel importante na fagocitose e conseqüente morte das bactérias em fases iniciais da infeção, seria de supor que o BPA aumentasse a depuração de *E. coli* na cavidade peritoneal; na verdade, verificou-se uma redução da mesma no grupo tratado com BPA. Finalmente, os efeitos do BPA na fagocitose de bactérias por neutrófilos foram avaliados

in vitro. Verificou-se que os neutrófilos do grupo controlo fagocitaram 30% das bactérias ligadas, enquanto os neutrófilos do grupo tratado com BPA fagocitaram apenas 5% (41).

Os resultados deste estudo indicam que o BPA possui imunotoxicidade, exercendo-a, pelo menos em parte, enfraquecendo a atividade fagocítica de neutrófilos. Os mecanismos e vias específicas pelos quais o BPA atua na fagocitose permanecem por ser elucidados.

5.6. Produção e Libertação de Citocinas

As citocinas regulam a intensidade e a duração da resposta imune, estimulando ou inibindo a ativação, proliferação e/ou diferenciação de células, regulando a secreção de outras citocinas ou anticorpos e, em alguns casos, induzindo apoptose nas células-alvo. Adicionalmente, as citocinas podem modular a expressão de vários recetores celulares específicos para quimiocinas, outras citocinas ou mesmo para elas próprias, podendo assim influenciar a atividade de inúmeras células envolvidas na resposta imunitária mesmo quando segregadas por um número ínfimo de células efectoras (3).

Num estudo recente, foi estudado o efeito do BPA na expressão de citocinas por MΦs THP1 humanos. As concentrações de BPA utilizadas variaram entre 0 (controlo) e 0.1µM, tendo sido administradas durante 24h. Verificou-se um aumento significativo na secreção e nos níveis de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6 após tratamento com 0.01 e 0.1µM BPA. Em contraste, a expressão da citocina anti-inflamatória TGF-β mostrou-se reduzida após administração das referidas doses. Por fim, o tratamento com 0.01µM de BPA não produziu efeitos significativos na expressão de interleucina-10 (IL-10); no entanto, na concentração de 0.1µM, o BPA mostrou-se capaz de reduzir significativamente os seus níveis basais, comparativamente ao controlo. As vias subjacentes envolvidas nesta ação do BPA aparentam envolver os ERs e o fator de transcrição NF-κB, visto que a adição de ICI182.780, antagonista dos ERs, ou de PDTC, inibidor relativamente específico da ativação do NF-κB, mostrou diminuir os níveis de TNF-α e IL-6 e aumentar os níveis de TGF-β e IL-10 (52).

Noutro estudo, demonstrou-se que a administração de BisGMA induziu a expressão de IL-6 e IL-1β em MΦs RAW264.7 de uma forma tempo e dose-dependente. Na incubação com 3µM de BisGMA por 0, 60 e 120 minutos, os níveis observados foram de 581.49, 817.39 e 1476.50 pg/ml para a IL6 e de 185.06, 323.06 e 654.13 pg/ml para a IL-1β, respetivamente. A administração de 0, 1 e 3 µM de BisGMA por 120 minutos revelou valores de 611.50, 1449.38 e 1430.15 pg/ml para a IL-6 e de 177.62, 634.19 e 724.67 pg/ml para a IL-1β, respetivamente (53).

Na investigação levada a cabo por Holladay *et al.* administrou-se 1mg/kg/dia de BPA via injeção intra-peritoneal a ratinhos fêmea prenhas, desde o dia 9.5 de gestação até ao fim da lactação, e avaliou-se a produção de citocinas pelas crias machos às 20 semanas de idade. Verificou-se uma estimulação generalizada na produção de citocinas após a exposição ao BPA, pois 16 das 21 citocinas avaliadas encontravam-se aumentadas no soro (ver Anexo I - Níveis de citocinas e quimiocinas no soro após exposição perinatal ao BPA) (14).

Com base nos resultados destes estudos pode-se concluir que o BPA afeta a produção e a secreção das citocinas mesmo em concentrações consideradas baixas e encontradas no meio ambiente. Os dados obtidos sugerem ainda que o BPA tenha uma função pró-inflamatória no organismo. As vias pelas quais o BPA altera a expressão das citocinas ainda não estão definidas, apesar de existir evidência para o envolvimento dos ERs e do NF- κ B na sua ação.

5.7. Inflamação

Num estudo realizado por Roy e os seus colaboradores, tentou-se determinar se a exposição materna ao BPA influencia a função a longo prazo do sistema imunológico da descendência utilizando um modelo de infecção do trato respiratório inferior por vírus Influenza A em ratos. Administrou-se 50 μ g de BPA/kg de peso corporal/dia por via oral a ratos fêmea prenhas desde o primeiro dia de gestação até ao 21º dia pós-natal. O grupo controlo recebeu doses equivalentes de óleo de amendoim. Ao 21º dia pós-natal, todas as crias foram desmamadas e agrupadas consoante o sexo até às 6-8 semanas de idade, altura em que foram infetadas por via intranasal com o vírus Influenza A. Verificou-se que o BPA não causou diferenças significativas no peso corporal, na sobrevivência neonatal, no tamanho nem no rácio macho-fêmea das crias, quando comparado com o grupo controlo. Do mesmo modo, a mortalidade e a depuração do vírus do pulmão não se mostraram afetadas no grupo exposto ao BPA. Por fim, examinou-se a inflamação e os níveis de expressão de genes de quimiocinas e citocinas nos tecidos pulmonares infetados. Verificou-se que as crias expostas ao BPA apresentavam o mesmo grau de inflamação broncopulmonar que aquele exibido pelo grupo controlo nas fases iniciais da infecção. No entanto, o grau de inflamação pulmonar ao 7º dia de infecção mostrou-se significativamente diminuído no grupo exposto ao BPA, retornando a extensão equivalente à do grupo controlo pelo 10º dia de infecção. Acompanhando estes achados, verificou-se ainda um padrão geral de expressão reduzida de genes para o TNF- α , INF- γ , iNOS, e para as quimiocinas CCL5, CXCL10 e CCL2 nos pulmões dos ratos expostos ao BPA durante o seu desenvolvimento (13).

Os dados referidos anteriormente sugerem que a exposição *in utero* e durante a lactação a doses baixas de BPA não afeta adversamente a resistência do hospedeiro à infecção primária por vírus Influenza A. Contudo, a mesma exposição pode diminuir transientemente certos aspetos da resposta inflamatória à infecção, ficando por esclarecer se este efeito resulta de uma ação direta do BPA nas HSC durante o período pré-natal ou de uma ação indireta através de mecanismos de disrupção endócrina. Apesar da eliminação do vírus não ter sido afetada, a diminuição da inflamação causada pela exposição ao BPA pode mostrar-se devastadora num cenário onde a resposta inflamatória é crítica para a eliminação do patógeno, nomeadamente em certas infeções bacterianas.

Apesar da resposta imunitária variar de acordo com o patógeno invasor, o efeito exercido pelo BPA na redução da inflamação não deixa de ser surpreendente, visto que, como

referido anteriormente, parece haver uma propensão do BPA em estimular a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias em detrimento de mediadores anti-inflamatórios.

6. Implicações da Ação do Bisfenol A no Contexto de Suscetibilidade à Doença

O BPA tem sido alvo de inúmeros estudos com vista à descoberta e compreensão dos seus efeitos na saúde dos seres humanos, dada a sua capacidade de atuar como um DE e influenciar o normal funcionamento do organismo, mais concretamente do sistema imunitário, onde o seu papel ainda está longe de ser conhecido na totalidade. Contudo, o resultado do esforço desenvolvido pela comunidade científica permitiu formular algumas teorias que correlacionam a exposição ao BPA e o possível aumento da suscetibilidade à doença.

A asma é caracterizada por uma resposta imunitária mediada por células TH₂ contra alérgenos ambientais comuns, resultando na inflamação e hiperreatividade das vias aéreas (12). Donohue *et al.* verificaram uma associação positiva entre as concentrações urinárias de BPA no período pós-natal de crianças do centro da cidade e a ocorrência de síbilos aos 5 e 6 anos de idade (54). Os MCs parecem ter um papel fundamental no desenvolvimento da asma, pois são capazes de iniciar uma resposta inflamatória aguda e libertar histamina e leucotrienos, que por sua vez causam broncoconstrição, secreção de muco e edema. Num estudo conduzido por O'Brien e os seus colaboradores concluiu-se que o tratamento de MCs com BPA nas concentrações de 1, 10 e 100 nM induziu um aumento na libertação de histamina e leucotrienos (55). Adicionalmente, a capacidade demonstrada pelo BPA em estimular a diferenciação de células envolvidas na resposta imune pode causar uma ativação escusada e inútil do sistema imunitário na ausência de condições patológicas e/ou motivar a polarização inadequada de linfócitos T, promovendo reações alérgicas (39). Por tudo isto e considerando apenas os seus efeitos nos mecanismos da imunidade inata, é plausível que o BPA atue como promotor no desenvolvimento da asma e de outras doenças inflamatórias, dependendo da concentração e do *timing* de exposição. No entanto, não existem dados que indiquem uma correlação direta entre a exposição ao BPA e o aparecimento de asma, sendo necessários estudos adicionais.

As doenças infecciosas permanecem entre as principais causas de morbimortalidade em todo o mundo. Evidências recentes sugerem que a exposição humana a químicos do nosso ambiente diário representa uma fração negligenciada para as diferenças observadas na capacidade do hospedeiro em resistir a infeções (13). A imunidade inata é essencial nas fases iniciais da defesa contra patógenos invasores, especialmente contra bactérias, e se os seus mecanismos não funcionarem em pleno, a suscetibilidade à infeção aumenta (41). O BPA mostrou ter efeito em diversos aspetos chave da defesa inata, nomeadamente na produção de citocinas, na inflamação e na fagocitose de microrganismos. Parece existir uma predileção do BPA para a estimulação de citocinas pro-inflamatórias, nomeadamente TNF- α e IL-6, e a

inibição de citocinas anti-inflamatórias, o que pode ter consequências não só na obtenção como também na severidade de uma doença infecciosa. Ao interferir na produção de NO e na atividade fagocítica de neutrófilos e MΦs, a exposição ao BPA pode diminuir a depuração e a morte de microrganismos, pondo em causa a efetividade da resposta imunitária e predispondo à infecção.

Apesar de não existirem estudos que vinculem o BPA ao aparecimento de doenças autoimunes, o potencial parece ser elevado, dadas as influências fisiológicas do BPA e os modelos imunológicos correntes em relação à perda de auto-tolerância e autoimunidade. A atividade estrogénica, a proliferação de DCs, a apoptose de células efectoras, a secreção de citocinas e a produção de NO estão envolvidas na patogénese da autoimunidade (15). Visto que o BPA mostrou ter a capacidade de atuar em todas as características anteriores, é admissível vaticinar uma possível ação gatilho deste DE nas doenças autoimunes.

Assim, ao considerarmos apenas os efeitos na imunidade inata, a exposição humana ao BPA pode aumentar a suscetibilidade a diversas doenças, principalmente do foro inflamatório, infeccioso e autoimune. Apesar de serem necessários mais estudos, é sensato concentrar esforços com vista à minimização da exposição ao BPA e outros DEs principalmente em períodos críticos do desenvolvimento humano.

7. Conclusão

Os dados revistos neste trabalho permitem concluir que o BPA pode afetar os mecanismos de defesa da imunidade inata e, dessa forma, aumentar significativamente a suscetibilidade à doença infecciosa, inflamatória e autoimune.

Há evidências significativas que demonstram os efeitos adversos nos vários aspectos da imunidade inata provocados pelo BPA (Figura 4), nomeadamente através da atuação como agonista estrogénico nos ERs, promoção da diferenciação de células efetoras, indução da apoptose, alteração da produção de NO, modulação dos padrões de libertação das citocinas e redução da atividade fagocítica.

Os estudos em animais sugerem que a exposição ao BPA está associada a alterações na qualidade da resposta imunitária. Através de uma atividade estrogénica envolvendo o fator de transcrição NF- κ B, o BPA provoca uma diminuição na produção de NO aquando do estímulo patogénico e estimula a libertação de citocinas pró-inflamatórias. Atuando por vias ainda desconhecidas, o BPA promove a diferenciação de DCs e neutrófilos, inibe a migração de M Φ s, diminui a fagocitose de microrganismos e induz a atividade das caspases efetoras da apoptose, perpetuando um estado de imunossupressão. Sendo um xenoestrogénio, o potencial do BPA para interferir com outros aspectos da imunidade inata é enorme, uma vez que virtualmente todas as células que a constituem expressam ERs e estão suscetíveis à sua ação. Contudo, são necessários mais estudos, inclusive em humanos, para se determinar com maior precisão se os efeitos observados com modelos animais se comprovam e se verificam na mesma extensão nos humanos.

Algumas das controvérsias encontradas nos estudos analisados neste trabalho justificam-se com as diferentes metodologias adotadas, os tempos de exposição variados e as distintas concentrações de BPA utilizadas, que muitas das vezes não refletem uma exposição plausível no ser humano. Assim, é essencial a realização de ensaios com maior grau de homogeneidade, com vista à obtenção de dados mais consistentes e viáveis que revelem a real influência do BPA na imunidade inata.

O trabalho realizado apresentou algumas limitações, sendo que a primeira prende-se com a escassez de informação referente ao efeito do BPA nos diversos aspectos da imunidade inata, comprometendo a abrangência do mesmo. A falta de acesso a artigos na íntegra, bem como a descrição incompleta da metodologia utilizada nas diversas investigações reunidas constituíram outro fator limitante.

Atendendo às enormes quantidades de BPA produzidas em todo o mundo, à sua ubiquidade e aos possíveis efeitos adversos para a saúde humana, torna-se imprescindível a tomada de medidas que visem a redução da exposição humana a este produto, principalmente nos grupos de maior risco, sendo que a sua substituição por substâncias inócuas deve ser fortemente incentivada.

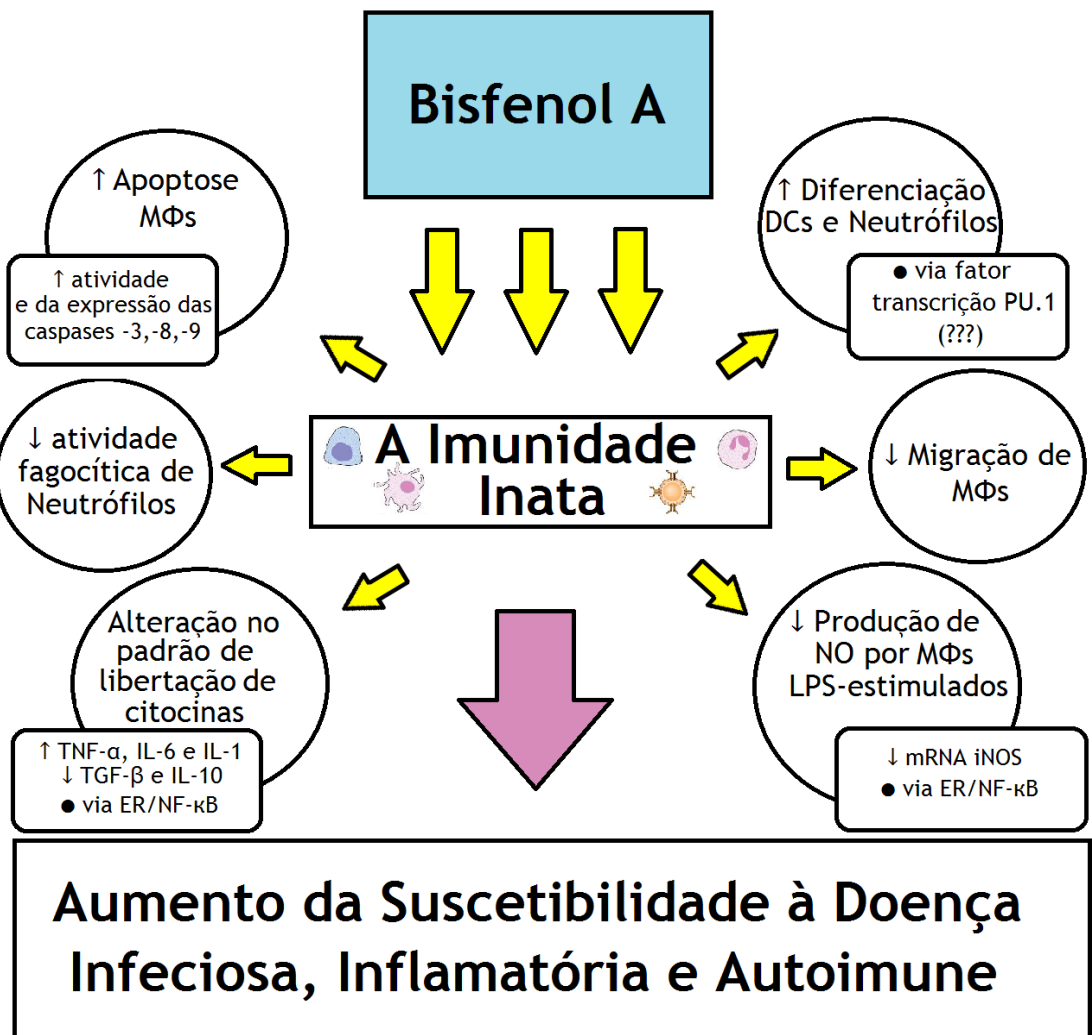


Figura 4 - Resumo do efeito do Bisfenol A na imunidade inata. DCs - Células dendríticas; MΦs - Macrófagos; NO - Óxido nítrico LPS - Lipopolissacarídeo; mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro; ER - recetores de estrogénio; NF-κB - fator nuclear kappa B; TNF-α - fator de necrose tumoral alfa; IL - interleucina; TGF-β - fator de crescimento tumoral beta;

8. Bibliografia

- (1) Arosa FA, Pacheco FC, Cardoso EM. Fundamentos de Imunologia. 2ª Edição. Lidel; 2012. 640 pp.
- (2) Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th edition. Elsevier Saunders; 2015. 560 pp.
- (3) Owen JA, Punt J, Stranford SA. Kuby Immunology. 7th edition. W. H. Freeman; 2013. 574 pp.
- (4) Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Oct 12;366(1579):2748-55.
- (5) Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* Elsevier Ltd; 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-32.
- (6) Snyder SA, Westerhoff P, Yoon Y, Sedlak DL. Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry. *Environ Eng Sci.* 2003;20(5):449-69.
- (7) Salián S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring-an overview. *Reprod Toxicol.* Elsevier Inc.; 2011 Apr;31(3):359-62.
- (8) Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Elsevier Ltd; 2011;127(3-5):204-15.
- (9) Rogers J a, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol.* Elsevier Ltd; 2013 Apr;53(4):421-30.
- (10) Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Elsevier Ltd; 2011;127(1-2):27-34.
- (11) Larsson K, Ljung Björklund K, Palm B, Wennberg M, Kaj L, Lindh CH, et al. Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children. *Environ Int.* Elsevier B.V.; 2014 Dec;73:323-33.

- (12) Petzold S, Averteck M, Simon JC, Lehmann I, Polte T. Lifetime-dependent effects of bisphenol A on asthma development in an experimental mouse model. *PLoS One*. 2014 Jan;9(6):e100468.
- (13) Roy A, Bauer SM, Lawrence BP. Developmental exposure to bisphenol A modulates innate but not adaptive immune responses to influenza A virus infection. *PLoS One*. 2012 Jan;7(6):e38448.
- (14) Holladay SD, Xiao S, Diao H, Barber J, Nagy T, Ye X, et al. Perinatal bisphenol A exposure in C57B6/129svj male mice: potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Jul;7(7):2845-52.
- (15) Kharrazian D. The Potential Roles of Bisphenol A (BPA) Pathogenesis in Autoimmunity. *Autoimmune Dis*. 2014 Jan;2014:743616.
- (16) Moral R, Wang R, Russo IH, Lamartiniere C a, Pereira J, Russo J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol*. 2008 Jan;196(1):101-12.
- (17) Abdullah Z, Knolle P a. Scaling of immune responses against intracellular bacterial infection. *EMBO J*. 2014 Oct 16;33(20):2283-94.
- (18) Martin SF. Adaptation in the innate immune system and heterologous innate immunity. *Cell Mol Life Sci*. 2014;4115-30.
- (19) St John AL, Abraham SN. Innate immunity and its regulation by mast cells. *J Immunol*. 2013 May 1;190(9):4458-63.
- (20) Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2010;10(6):440-52.
- (21) Bryceson YT, Chiang SCC, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, et al. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun*. 2011 Jan;3(3):216-26.
- (22) Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-10.
- (23) Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. 9th edition. Elsevier Saunders; 2013. 928 pp.

- (24) Netea MG. Training innate immunity: The changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(8):881-4.
- (25) Netea MG, Quintin J, Van Der Meer JWM. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe.* Elsevier Inc.; 2011;9(5):355-61.
- (26) Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York V a, et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(36):14725-32.
- (27) Ostuni R, Piccolo V, Barozzi I, Polletti S, Termanini A, Bonifacio S, et al. Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell.* Elsevier Inc.; 2013;152(1-2):157-71.
- (28) Quintin J, Saeed S, Martens JH a, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe.* 2012;12(2):223-32.
- (29) Richter C a, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):199-224.
- (30) Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to bisphenol a (BPA). 2015;66(1):5-11.
- (31) Gowder SJT. Nephrotoxicity of Bisphenol A (BPA) - An Updated Review. 2013;(1):163-72.
- (32) Goto M, Takano-Ishikawa Y, Ono H, Yoshida M, Yamaki K, Shinmoto H. Orally administered bisphenol A disturbed antigen specific immunoresponses in the naïve condition. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 Sep;71(9):2136-43.
- (33) Zhuang S, Zhang C, Liu W. Atomic insights into distinct hormonal activities of Bisphenol A analogues toward PPAR γ and ER α receptors. *Chem Res Toxicol.* 2014 Oct 20;27(10):1769-79.
- (34) Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Treuter E, et al. Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets. 2007;905-31.

- (35) O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. 2004;18(8):1859-75.
- (36) Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol*. Elsevier Inc.; 2015;1-7.
- (37) Young Kim J, Gwang Jeong H. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α expression by bisphenol A via nuclear factor- κ B inactivation in macrophages. *Cancer Lett*. 2003 Jun;196(1):69-76.
- (38) Guo H, Liu T, Uemura Y, Jiao S, Wang D, Lin Z, et al. Bisphenol A in combination with TNF- α selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. *Cell Mol Immunol*. Nature Publishing Group; 2010;7(3):227-34.
- (39) Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, Caputo L, Mita L, Viggiano E, et al. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *Gen Comp Endocrinol*. Elsevier Inc.; 2012 Aug 1;178(1):54-63.
- (40) Watanabe H, Adachi R, Kusui K, Hirayama A, Kasahara T, Suzuki K. Bisphenol A significantly enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells. *Int Immunopharmacol*. 2003 Nov;3(12):1601-8.
- (41) Sugita-Konishi Y, Shimura S, Nishikawa T, Sunaga F, Naito H, Suzuki Y. Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. *Toxicol Lett*. 2003 Jan;136(3):217-27.
- (42) Williams GT. Role of apoptosis in the immune system. *J Pathol*. 1994;173(1):1-4.
- (43) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 6th edition. Garland Science. 2014; 1464 pp.
- (44) Savill JS, Wyllie a. H, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*. 1989;83(3):865-75.
- (45) Li YC, Kuan YH, Huang FM, Chang YC. The role of DNA damage and caspase activation in cytotoxicity and genotoxicity of macrophages induced by bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate. *Int Endod J*. 2012 Jun;45(6):499-507.

- (46) Kim KH, Yeon SM, Kim HG, Choi HS, Kang H, Park HD, et al. Diverse influences of androgen-disrupting chemicals on immune responses mounted by macrophages. *Inflammation*. 2014;37(3):649-56.
- (47) Ali EMM, Hamdy SM, Mohamed TM. Nitric Oxide Synthase and Oxidative Stress : Regulation of Nitric Oxide Synthase. *Oxidative Stress - Mol Mech Biol Eff*. 2012.
- (48) Billack B. Macrophage Activation: Role of Toll-like Receptors, Nitric Oxide and Nuclear Factor kappa B. *Am J Pharm Educ* 2006;70(5).
- (49) Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-16.
- (50) Byun J-A, Heo Y, Kim Y-O, Pyo M-Y. Bisphenol A-induced downregulation of murine macrophage activities in vitro and ex vivo. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2005 Jan;19(1):19-24.
- (51) Hong C-C, Shimomura-Shimizu M, Muroi M, Tanamoto K. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(7):1136-9.
- (52) Liu Y, Mei C, Liu H, Wang H, Zeng G, Lin J, et al. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2014;451(4):592-8.
- (53) Kuan Y-H, Huang F-M, Li Y-C, Chang Y-C. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NFκB activation via PI3K/Akt pathway. *Food Chem Toxicol*. Elsevier Ltd; 2012 Nov;50(11):4003-9.
- (54) Donohue KM, Miller RL, Perzanowski MS, Just AC, Hoepner LA, Arunajadai S, et al. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and asthma development among inner-city children. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Mar;131(3):736-42.
- (55) O'Brien E, Dolinoy DC, Mancuso P. Bisphenol A at concentrations relevant to human exposure enhances histamine and cysteinyl leukotriene release from bone marrow-derived mast cells. *J Immunotoxicol*. 2014;11(1):84-89.

Anexo I - Níveis de citocinas e quimiocinas no soro após exposição perinatal ao BPA

Anexo I - Níveis de citocinas e quimiocinas no soro após exposição perinatal ao BPA (14)

Citocina/Quimiocina	Soro do grupo controlo (pg/ml)	Soro do grupo exposto ao BPA (pg/ml)
G-CSF	541.4 ± 58.2	1311.4 ± 315.4
GM-CSF	3.4 ± 0.3	6.8 ± 2.0
IFN-γ	24.6 ± 4.3	21.0 ± 2.7
IL-10	8.8 ± 1.6	11.3 ± 0.9
IL-12p70	9.8 ± 1.7	16.0 ± 2.1
IL-13	13.0 ± 1.9	12.6 ± 1.4
IL-15	17.0 ± 1.5	20.4 ± 1.0
IL-17	15.6 ± 3.1	18.5 ± 5.0
IL-1α	56.7 ± 5.7	104.6 ± 18.4
IL-1β	4.5 ± 0.7	8.4 ± 0.4
IL-2	5.0 ± 1.0	5.0 ± 0.8
IL-4	4.1 ± 0.5	5.1 ± 0.5
IL-5	42.5 ± 2.5	40.0 ± 7.7
IL-6	72.6 ± 29.6	66.9 ± 14.3
IL-7	8.5 ± 1.3	9.9 ± 0.8
IP-10	170.9 ± 25.8	217.9 ± 47.4
KC	76.9 ± 31.0	98.8 ± 27.4
MCP-1	12.5 ± 1.6	14.7 ± 2.0
MIP-1α	5.0 ± 0.6	5.1 ± 0.5
Rantes (CCL5)	117.9 ± 25.5	203.2 ± 43.1
TNF-α	5.1 ± 0.8	7.9 ± 2.0

Os valores com aumento $\geq 33\%$ encontram-se assinalados a negrito. G-CSF - fator de estimulação de colónias de granulócitos; GM-CSF - fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos; IFN-γ - Interferão gama; IL - interleucina; IP-10 - proteína 10 induzida por interferão gama; KC - quimioatraente de queratinócitos; MCP-1 - proteína quimiotática 1 de monócitos; MIP-1α - proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa; CCL5 - (motivo c-c) ligando 5; TNF-α - fator de necrose tumoral alfa.