



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

# **BISFENOL A**

Substans med tänkbar cancerogen effekt på hundens  
juver

*Carolina Falkman*

*Uppsala  
2017*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2017:19*



# **Bisfenol A - substans med tänkbar cancerogen effekt på hundens juver**

## **Bisphenol A - substance with possible carcinogenic effect on the canine mammary glands**

*Carolina Falkman*

**Handledare:** *Eva Hellmén, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, SLU*

**Examinator:** *Eva Tydén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU*

**Omfattning:** *15 hp*

**Nivå och fördjupning:** *grund nivå, G2E*

**Kurstitel:** *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

**Kurskod:** *EX0700*

**Program:** *Veterinärprogrammet*

**Utgivningsort:** *Uppsala*

**Utgivningsår:** *2017*

**Serienamn:** *Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

**Delnummer i serie:** *2017:19*

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *bisfenol a, juvertumör, hund, bröstcancer, mekanismer*

**Key words:** *bisphenol A, mammary tumour, canine, breast cancer, mechanisms*

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi



## **INNEHÅLLSFÖRTECKNING**

SAMMANFATTNING.....	1
SUMMARY.....	2
INLEDNING.....	3
MATERIAL METODER.....	4
LITTERATURÖVERSIKT.....	4
Hundens juvertumör.....	4
Hundens, råttans och människans östralcykel.....	5
BPA.....	7
BPAs verkningsmekanismer.....	7
Cancerogena effekter av BPA.....	8
DISKUSSION.....	9
LITTERATURFÖRTECKNING.....	11



## SAMMANFATTNING

Bisfenol A (BPA) är i vår miljö en ständigt närvarande organisk förening som används vid plastframställning. Vattendrag, hushållsdamm, elektronik och tuggleksaker av plast är bara en bråkdel av källorna där vi och våra husdjur utsätts för denna östrogenlika substans. BPA räknas som endokrinstörande och har i flertal studier visats kunna vara cancerframkallande. BPAs målreceptorer är de nukleära östrogenreceptorerna  $ER_{\alpha}$  och  $ER_{\beta}$ , och den membranbundna G-proteinkopplade östrogenreceptorn GPER. BPAs aktivering stimulerar på så sätt bland annat proliferation av mjölkkörtlarna. Dock har BPA selektivitet för  $ER_{\beta}$  som visats sig ha en antiproliferativ effekt.

Estradiol, progesteron, prolaktin och tillväxtfaktorer samspelar vid utveckling av juvret under puberteten, östralcykeln och vid dräktighet. Hur en östrogenlik substans som BPA kan påverka mjölkkörtlarna tillsammans med de endogena hormonerna är en komplex fråga. Studier har gjorts till största del på möss, råttor och humana bröstcancerceller, där BPA visats kunna ha en cancerogen effekt. Eftersom våra hundar lever i samma miljö som vi är det troligt att de utsätts för samma miljögifter och med det kan få liknande sjukdomar. Cancerutveckling i endokrina organ som mjölkkörtlarna består av en avancerad samverkan av hormoner. Dels utsätts kvinnor, tikar och andra hondjur naturligt i sin östralcykel för hormoner som ska förbereda mjölkkörteln för digivning, men också för exogena endokrinstörande hormoner. Hundens unika östralcykel med en förlängd lutealfas och progesteronproduktion kan möjligtvis utgöra en riskfaktor vid exponering för BPA. Men samtidigt har hunden en lång anöstrus, vilofas, som eventuellt kan ha en skyddande effekt.

Denna litteraturstudie syftar till att undersöka huruvida BPA skulle kunna ha en cancerogen påverkan på hundens juver. Eftersom litteratur saknas angående just hund och BPA-exponering, kommer diskussionen föras kring jämförelser och verkningsmekanismer.

BPA har bland annat visat sig påverka perinatalet och därefter ge upphov till brösttumör hos råttor under puberteten, detta genom att göra bröstvävnaden mer känslig för östrogen och få den att uttrycka fler progesteronreceptorer. BPA inducerar till exempel också uttryck av en bröstcancerassocierad gen *in vitro* i bröstcancerzellkultur och *in vivo* i råttor.

Slutsatsen av denna litteraturstudie är tvetydig. BPAs effekt på hundens juver är å ena sidan antagligen cancerogen. En slutsats baserat till största del på att BPA antagligen ger ett ökat antal progesteronreceptorer i juvervävnaden och att hunden står under ett längre progesteronpåslag under sin cykel, jämfört med mus, råttor och människa, och på så sätt kan tumörutveckling stimuleras. Medan det å andra sidan skulle kunna vara helt tvärtom med tanke på BPAs selektivitet för den antiprolifererande östrogenreceptorn  $ER_{\beta}$ , och då skulle BPA till och med kunna fungera som ett behandlingsalternativ mot juver/brösttumör.

## SUMMARY

Bisphenol A (BPA) is a chemical used in the production of different plastics. It is an organic compound constantly present in our environment. Watercourses, house dust, electronics and plastic canine toys are just some examples out of the large number of sources from which we are exposed to this estrogenic substance. BPA is an endocrine disrupter and several studies have demonstrated its cancerogenic properties. The target receptors of BPA are the estrogenic nuclear receptors ER<sub>α</sub> and ER<sub>β</sub>, and also the membrane bound G-protein coupled estrogenic receptor (GPER) where BPA activation often leads to proliferation of the mammary glands. However, BPA has high affinity for ER<sub>β</sub> which appear to have an antiproliferative effect.

The interaction between estradiol, progesterone, prolactin and growth factors plays an important roll in the development of the mammary gland during puberty, the estrous cycle and gestation. How the influence of BPA together with the endogenous hormones affects the mammary glands is a complex question. Today's research has been done mostly on mice, rats and breast cancer cells, where BPA has been shown to have a cancerogenic effect. Since our dogs share our environment it is presumable that they also are exposed to the same environmental toxins as we are and can undergo similar diseases. The progress of cancer in an endocrine organ like the mammary glands is an advanced interplay of different hormones. Females are naturally subject to endogenous hormones during their estrous cycle, but in addition they are exposed of exogenous hormones that might be endocrine disrupters. The canine estrous cycle is unique with its prolonged luteal phase, and the extended progesterone production together with BPA exposure, might represent a risk factor. However, the estrous cycle also includes a long anestrous that instead might have a protective effect.

The aim of this study is to examine whether BPA might have a cancerogenic effect on the canine mammary glands. Because of the absence in literature regarding BPA's effect on the canine mammary glands, this study will discuss around comparisons with studies already made and BPA's mechanisms of action.

For example, perinatal exposure to BPA have been found to give rise to breast tumour in rats during puberty, this because a capacity of BPA is to make the mammary tissue more sensitive to estrogens and upregulate the expression of progesterone receptors. BPA has also been found to induce the expression of a gene highly associated with breast cancer.

The conclusion of this study is equivocal. The effect of BPA on the canine mammary glands is probably cancerogenic on one hand, based on the fact that BPA probably promotes a higher number of progesterone receptors in the canine mammary tissue and that the dog has a long time span of progesterone production. On the other hand, if looking at BPA's affinity to the antiproliferative ER<sub>β</sub>, it might be the other way around and BPA might even work as a treatment option for mammary tumours.



## INLEDNING

De flesta hundar lever i samma miljö som vi människor och utsätts därför också för samma miljögifter. Det finns idag forskning som sammanlänkar den östrogenlika substansen bisfenol A (BPA) och bröstcancer (Deb *et al.*, 2016). Kan det då även finnas ett samband hos våra hundar? Denna litteraturstudie syftar till att undersöka om BPA möjligtvis har en cancerogen inverkan på hundens juver. På grund av bristande forskning gällande just BPAs effekt på hundens juver, så kommer studien att diskutera kring risken att BPAs östrogena effekt kan leda till juvertumör hos hund, via adult eller fetal exponering, baserat på BPAs verkningsmekanismer, juvrets normala hormonpåverkan, juvertumörens egenskaper, gnagarstudier (mus och råttor) och humanstudier (bröstcancer celler) gällande BPA och tumörutveckling.

Till diskussionen hör hundens unika östralcykel, som i studien jämförs med mus, råttor och människa. Hundens östralcykel ger eventuellt andra förutsättningar för xenoöstrogen. Till exempel finns det studieresultat som visat att långvarig östrogenbehandling inte ökar tumörincidensen hos hund (Rutteman, 1992). Det sägs också att risken för bröstcancer hos människa och likaså juvertumör hos hund är korrelerat till antalet östralcykler som går igenom (Schneider, 1970). Progesteron har visats sig, efter flertalet studier, vara en stor hormonell riskfaktor för utveckling av juvertumör hos hund. Progesteron verkar för alveolutveckling och stimulerar till en lokal tillväxtfaktorproduktion i juvervävnaden (Rutteman, 1992). Utgör då en östrogenlik substans som BPA någon risk?

Yttrycket den 'östrogena paradoxen' talar om hur östrogen visats kunna utgöra en riskfaktor för bröstcancer medan höga doser av östrogen har visat sig ha en motverkande effekt (Bennink *et al.*, 2017). Liknande resultat har också fåtts vid olika höga doser med BPA (Jenkins *et al.*, 2011), så här är paradoxen ett faktum som gör diskussionen än så komplex. Dessutom spelar tidpunkten för exponering av xenoöstrogen roll eftersom hormonpåverkan beror på i vilket utvecklingssteg (perinatalet, postnatalet, pubertet, anöstrus etc) mjölkkörteln befinner sig i. Enligt en jämförande studie mellan mus och människa menar författarna att BPA-exponering *in utero* ökar risken för tumörutveckling under det vuxna livet. En potentiell mekanism sägs vara att BPA, precis som endogent estradiol i normal utveckling, ger en ökad känslighet för progesteron genom att öka antalet progesteronreceptorer och på så sätt ökas det proliferativa svaret av progesteron för varje östruscykel (Brisken *et al.*, 2015). Bland alla BPAs komplexa egenskaper så får den sin huvudsakliga effekt genom sin selektivitet för östrogenreceptorer (Wetherill *et al.*, 2007) och har visats i flertal studier ha möjliga cancerogena effekter i mjölkkörtlarna hos möss och råttor (Vandenberg *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2007).

I den här litteraturstudien används estradiol som benämning för det endogena östroget, östroget för exogent/syntetiskt östroget, progesteron för det endogena progesteronet och progestiner för exogent/syntetiskt progesteron. Hundens mjölkkörtlar benämns juver och de andra arternas mjölkkörtlar benämns bröst. Studien är också medvetet avgränsad att endast se till hundens juvertumör generellt och hur yttre faktorer kan påverka, eftersom det i denna studie inte finns utrymme för de olika tumörformerna eller hur eventuell ärftlighet påverkar tumörutveckling.

## MATERIAL OCH METODER

Databaser : Web of Science, Pubmed, Scopus och Google Scholar.

Söktermer : Bisphenol A, BPA, canine, mammary (tumour OR tumor OR cancer), breast, mechanisms, "estrous cycle" AND (human OR rat OR canine), steroids, (estrogen OR oestrogen), (progesteron OR progestin), hormones, xenoestrogens, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPER. Dessa termer i olika kombinationer.

Referenser från översiktsartiklar har också använts. Översiktsartiklar har använts för att få en överblick över de olika östralcyklarna. När översiktsartiklarna refererar till en översiktsartikel eller refererar till en referens som ej går att finna så har jag använt den senast publicerade översiktsartikel som referens.

Lärobok : Sjaastad, O.V., Sand, O., Hove. K. (2010) *Physiology of Domestic Animals. 2nd edition*. Enstaka litteratur från biblioteket har också använts för att finna referenser.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Hundens juvertumör

Juvertumör är den vanligast förekommande tumören hos okastrerade tikar och cirka femtio procent av tumörerna är maligna (Sleecx *et al.*, 2011). Studier har visat hur risken för juvertumör minskas drastiskt ju tidigare tiken kastreras. Då den cykliska hormonutsöndringen av bland annat estradiol och progesteron tas bort, dras slutsatsen att juvertumörer till viss del kan vara steroidberoende (Schneider, 1970). Långvarig oral östrogenbehandling i olika doser har inte setts öka tumörincidensen medan det samtidigt finns observationer som indikerar att östrogener kan öka effekten av progestiner och på så sätt indirekt ge upphov till tumörutveckling. Till exempel har det visats att olika doser av progestin och östrogen i kombination har gett en hög ökning av tumörincidensen jämfört med den något mindre ökningen av tumörincidensen när olika doser av endast progestin gavs (Rutteman, 1992).

Endogena hormoner är essentiella vid mammär utveckling men hur exponering av exogena östrogener, till exempel BPA under eller efter fosterutveckling, påverkar mjölkkörtlarna är ett aktuellt forskningsämne på grund av BPAs ständiga närvaro i vår miljö (Vaughn, 2010). Östrogenreceptorerna regleras normalt av estradiol och progesteronreceptorerna av progesteron och spelar stor roll vid utveckling och proliferation av mjölkkörtlarna (Delfosse *et al.*, 2012). Progesteronreceptorerna ger, vid aktivering av progesteron eller progestiner, alveolutveckling och en ökad produktion av tillväxthormon (GH), något som sker i den normala cykeln men som också kan verka för tumörutveckling. Forskning har visat att juvercellerna själva kan producera GH, som verkar auto-/parakrint (van Garderen *et al.*, 1997). Samspelet mellan progesteron, estradiol, GH och insulinliktilväxtfaktor (IGF-1) vid juvertumörutveckling har studerats och korrelation finns. Maligna tumörer jämfördes med normal, benign och dysplastisk vävnad och resultaten visade att de maligna tumörerna hade högre koncentrationer av GH, IGF-1, progesteron och estradiol och att dessa hormoner samverkar lokalt. Även i denna studie visades hur progesteron kan inducera en lokal autokrin

GH-produktion i juvervävnaden och att det i sin tur triggar en ökad produktion av IGF-1, systemiskt och/eller lokalt. Ett liknande samband har setts mellan estradiol och IGF-1, därav potentiell tumörutveckling (Queiroga *et al.*, 2008). Progestiner verkar också öka juvervävnadens känslighet för cancerogener eftersom progestiner driver vävnaden mot ett proliferativt stadie (Mol *et al.*, 1995).

Det som ofta studeras är uttrycket av östrogenreceptorer och progesteronreceptorer i tumörcellerna. Det har visats att receptoruttrycken är förhöjda i benigna tumörer medan maligna tumörer har minskat receptoruttryck, vilket indikerar att juvertumören initialt är hormonberoende för att sedan utvecklas mot ett mer malignt och självförsörjande stadie som producerar mer egna tillväxtfaktorer och på så sätt frångår steroidbehovet (Rutteman *et al.*, 1988).

Tamoxifen, en antiöstrogen i mjölkkörtelvävnad, har setts motverka brösttumöraktivitet hos människor men både försök *in vitro* och *in vivo* indikerar att tamoxifen har marginella effekter på juvertumör hos hund. Samma studie undersökte om tamoxifen hade någon preventiv verkan på juvertumörutveckling hos hund, men fann slutligen inget svar förutom att substansen gav bieffekter som liknade mer en agonistisk effekt på östrogenreceptorer i andra vävnader (Morris *et al.*, 1993). En annan studie som studerat tamoxifens bieffekter hos hund konstaterar att det finns artskillnader mellan hund och människa, där hunden verkar vara känsligare för tamoxifens agonistiska effekt på östrogenreceptorer i endometriet och därav lättare utvecklar pyometra och andra agonistiska bieffekter (Tavares *et al.*, 2010).

### **Hundens, rättans och människans östralcykel**

Utveckling av mjölkkörtlarna under puberteten stimuleras till största del av estradiol men också av progesteron, som båda huvudsakligen produceras i äggstockarna. Estradiolökning sker under varje follikelfas under östralcykeln, då tillväxt och förgrening av mjölkkörtelgångarna stimuleras. GH och glukokortikoider måste också finnas för denna utveckling. För att alveolerna ska utvecklas krävs i tillägg progesteron och prolaktin. Prolaktinsekretion från hypofysen stimuleras av estradiol. I sin tur utsöndras IGF-1 från levern efter stimulering av GH, som ger mitotisk aktivitet i mjölkkörtelcellerna (Sjaastad *et al.* 2010). GH-produktion stimuleras av progesteron (vanGarderen *et al.*, 1997).

De varierande halterna av estradiol under cykeln är avgörande för progressionen. Tidigt till mitten av follikelfasen inhiberas det gonadotropinfrisättande hormonet (GnRH) av estradiol från granulosa cellerna i de mognande folliklarna, och därmed inhiberas också det luteniserande hormonet (LH). I sen follikelfas producerar de mogna folliklarna större mängder estradiol som då ger en positiv feed-back på "surge center" i hypothalamus som leder till en ökad produktion av GnRH och en LH-våg kan uppstå som inducerar ovulationen (Sjaastad *et al.* 2010).

Hunden är en monoöstral cyklare, det vill säga endast en östrus och sedan en viloperiod (anöstrus). Cykeln är inte säsongsbunden och har ett intervall på 6-7 månader. Hunden skiljer sig från andra däggdjur med sin förlängda lutealfas med fortsatt progesteronutsöndring som

liknar en dräktighetslängd och med det uppstår en skendräktighet som ofta leder till förstoring av mjölkkörtlarna och i vissa fall även till laktation. Hundens östralcykel delas in i 4 faser.

1. Proöstrus (follikelfas): cirka 9 dagar lång med estradiolökning som avslutas med en LH-våg.
2. Östrus (follikelfas): cirka 9 dagar lång med estradiolsänkning och progesteronökning. Ovulation sker ca sextio timmar efter LH-vågen.
3. Metöstrus/Diöstrus (luteal fas): cirka 45-70 dagar lång. Ungefär vid dag 25 sker en progesterontopp för att sakta minska när regressionen av gulkroppen sker och cykeln går in i den sista fasen. Hundens lutealfas saknar den omedelbara luteolytiska avslutningsmekanismen där endometriet utsöndrar prostaglandin vid obefruktat ägg.
4. Anöstrus: cirka 5 månader lång vilofas (Concannon, 2011).

Råttan är en polyöstral cyklare, det vill säga att cykeln inte innehåller någon anöstrus. Östralcykel har ett intervall på cirka 4-5 dagar.

1. Proöstrus (follikelfas): 12-14 timmar lång. Estradiolökning som ger en LH-våg. Progesteronstegring startar.
2. Östrus (follikelfas): 25-27 timmar lång. Ovulering 12-14 timmar efter LH-våg. Gulkroppen börjar producera progesteron.
3. Metöstrus/Diöstrus (luteal fas): 61-75 timmar lång. Regression av gulkroppen och minskning av progesteronet sker (Westwood, 2008; Goldman *et al.*, 2007). Vid obefruktad ägg hos råttan och mus utsöndras prostaglandin från endometriet och verkar luteolytiskt så att cykeln kan gå över i proöstrus igen (Stocco *et al.*, 2007). Råttan har visats sig extra känslig för den östrogena inhiberingen av dopaminsekretion från hypotalamus vilket resulterar i prolaktinproduktion (Neumann, 1991). Till exempel har behandling med östrogener gett ökad prolaktinutsöndring. Prolaktin är det luteotrofa hormonet och därmed sker ett bevarande av gulkroppen, och en förlängd progesteronutsöndring som ger en skendräktighet. Musen är också polyöstral cyklare med liknande intervall som råttan (Goldman *et al.*, 2007).

Människan kan också benämnas polyöstral med ett cykelintervall på cirka 28 dagar. Cykeln delas in i två faser.

1. Follikelfas: cirka 14 dagar lång och startar på menstruationens första dag. I mitten av den follikulära fasen börjar en estradiolstegring som inducerar en LH-våg som börjar cirka 36 timmar innan ovulering. Ovulering sker cirka 12 timmar efter LH-vågen.
2. Luteal fas: cirka 14 dagar lång och startar vid ovuleringen. Gulkroppen bildas, och därmed en progesteronstegring som samtidigt inhiberar estradiolsyntes. Efter cirka 9 dagar börjar regression av gulkroppen som inducerats av endometriet som signalerar obefruktad genom prostaglandinproduktion och därmed sker en sänkning av progesteronproduktionen. Samtidigt sker också en andra estradioltopp, som tros vara ett tillägg till luteolysinduktion. Den luteala

fasen avslutas med sammandragningar i endometriet som stöter ut slemhinnan och det obefruktade ägget genom menstruation som varar i cirka 6 dagar. Människan har alltså två estradioltoppar i sin cykel (Reed *et al.*, 2015).

## **BPA**

BPA är en industrikemikalie som produceras i enorma volymer världen över och används vid framställning av polykarbonat- och epoxyplaster. BPA är en ständigt närvarande organisk förening och återfinns bland annat i vattendrag, sediment, hushållsdamm, matbehållare, plastflaskor och andra hushållsartiklar av plast, konservburkar, elektronik, kvitton, flamskyddsmedel och mobiltelefoner. BPA är en syntetisk kemikalie som ursprungligen utvecklades som en syntetisk östrogen och har därför endokrinstörande egenskaper. Det finns data från 'Centers for disease control and prevention' som visar på detekterbara nivåer av BPA i nittio procent av humana urinprov (Vaughn, 2010), vilket talar för en utbredd exponering. Eftersom våra hundar lever i samma miljö som vi människor kan det förväntas att de också utsätts för liknande ämnen som finns runt omkring oss. Hundarna har vidare ett tuggbeteende som möjliggör eventuellt större risker. Det har visats att tuggleksaker och träningsutrustning i plast släpper ifrån sig BPA och på så sätt kan utgöra en endokrin fara för hunden (Wooten & Smith, 2013). BPA kontrolleras numera i till exempel nappflaskor och andra plastartiklar för humant bruk medan det fortfarande råder brister i kontroll för våra husdjur. Det har till exempel visats sig att hundmat på burk utgör en risk för BPA-exponering (Koestel *et al.*, 2017). Dessutom finns forskning som menar att sublinguallt upptag av BPA hos hund ger nästan total biotillgänglighet eftersom den hepatiska första-passage effekten kringås (Gayraud *et al.*, 2013).

## **BPAs verkningsmekanismer**

Fakta om BPAs verkningsmekanismer har framkommit av studier *in vitro* med hjälp av olika cellkulturer och *in vivo* på mus och råtta. BPAs verkningsmekanismer inkluderar de två nukleära östrogenreceptorerna  $ER_{\alpha}$  och  $ER_{\beta}$  där BPA primärt fungerar som en selektiv partiell kompetitiv agonist, och kan på så sätt starta en estradiollik cellsignalerings i sin målcell som bland annat inkluderar proliferation (Wetherill *et al.*, 2007). De nukleära östrogenreceptorerna aktiveras när en ligand binder in, då sker en konformationsändring, receptordimerisering och fosforylering och till sist en nukleär translokation där östrogenreceptor-ligandkomplexet binder till DNA och gentranskribering sker. Det finns också extranukleära effekter från samma östrogenreceptorer som vid aktivering kan leda till en icke-genomisk cellsignalerings som ger ett snabbt svar som till exempel aktivering av tillväxtfaktorreceptorer (Marino *et al.*, 2012). Jämfört med estradiol, har BPA lägre affinitet till både  $ER_{\alpha}$  och  $ER_{\beta}$  (Kuiper *et al.*, 1998), och BPA har högre affinitet till  $ER_{\beta}$  än  $ER_{\alpha}$  (Marino *et al.*, 2012). Det har också visats sig att estradiol har lägre affinitet till  $ER_{\beta}$  än  $ER_{\alpha}$ . Dessutom verkar  $ER_{\beta}$  binda till exempel fytoöstrogen (östrogenlikt växtämne) med högre affinitet jämfört med  $ER_{\alpha}$  (Kuiper *et al.*, 1996).  $ER_{\alpha}$  har en proliferativ effekt och  $ER_{\beta}$  inhiberar proliferation genom att motverka proto-onkogenen myc och aktivera de antiproliferativa generna p21 och p27. Det verkar också som om  $ER_{\beta}$  kan störa  $ER_{\alpha}$ :s signalväg och  $ER_{\alpha}$ :s målgener nedregleras. På så sätt kan eventuellt en  $ER_{\beta}$ -selektiv östrogen vara mer antiproliferativ än en icke-ER-selektiv östrogen (Paruthiyil *et al.*, 2004).

G-proteinkopplade östrogenreceptorn (GPER) har också visats sig vara en av BPAs målreceptorer i bröstcancer celler där BPA verkar agonistiskt och bidrar till tumörutveckling (Pupo *et al.*, 2012). BPA genererar ett snabbt svar via GPER och en icke-genomisk cellsignaleringsväg som leder till proliferation och migration av bröstcancer cellerna (Dong *et al.*, 2011).

BPA har visats kunna förändra mjölkkörtelvävnaden perinatalt så den senare vid puberteten har en större känslighet för estradiol och uttrycker fler progesteronreceptorer (Munoz-de-Toro *et al.*, 2005). BPAs verkningsmekanism under den fetala utvecklingen verkar vara på det stroma som omger epitelcellerna i den begynnande mjölkkörteln, eftersom det är den vävnaden som uttrycker östrogenreceptorer vid den tidpunkten. Sedan förändrar det påverkade stromat epitelcellerna i mjölkkörtlarna under mammogenesen. Det finns också teorier om att BPA direkt kan påverka hypothalamus, som i sin tur får en störd hormonreglering gällande hypofys och äggstockar under puberteten och senare (Paulose *et al.*, 2015).

### **Cancerogena effekter av BPA**

En studie har visat att BPA inducerar förändring och ökad proliferation i råttans mjölkkörtlar. Vuxna råttor som sonderats med BPA i 8 veckor hade ökat antal och storlek i sina acini och körtelgångar, plus hyperplasi av epitelcellerna som linjerar gångarna (Ibrahim *et al.*, 2016). Likaså rapporterar ett försök på 5-6 veckor gamla råttor att BPA inducerar de mammar epitelcellerna till proliferation och differentiering, och att BPA stör cellcykeln (Colerangle & Roy, 1997). I en studie där råttor exponerats för BPA vid 21 dagars ålder sågs inte någon direkt effekt, men därefter vid 50 dagars ålder sågs en ökad proliferation och minskad apoptos av bröstcellerna och det uttrycktes också fler progesteronreceptorer (Jenkins *et al.*, 2009). En annan studie som utförts på vuxna möss indikerar att alla orala doser av BPA gav ökad cellproliferation i mjölkkörtlarna medan högre doser i tillägg ledde till ökad apoptos av epitelcellerna. Alltså gav låga doser endast en ökad proliferation medan högre doser gav ökad proliferation men samtidigt också en ökad apoptos i epitelcellerna och på så sätt gav bara de låga doserna tumörutveckling. Därav visas det att olika doser av BPA kan ge olika svar, och att högre doser verkar ha en antiproliferativ effekt (Jenkins *et al.*, 2011).

Vidare finns indikation att exponering under dräktighet kan leda till brösttumör hos avkomman senare i livet. I en studie på råttor blev resultaten, efter fetal exponering av BPA, körtelgångshyperplasi och carcinom med ökat uttryck av ER $\alpha$ -positiva celler (Murray *et al.*, 2007). Liknande försök har genomförts med möss under dräktighet och digivning, och gett resultat där körtelgångshyperplasi endast sågs hos de möss som exponerats för BPA (Vandenberg *et al.*, 2008). En perinatal studie, där mössen exponerats för BPA *in utero*, visar på förändringar av mjölkkörtlarna under puberteten. Mjölkkörtlarna hos kasttrade möss fick en större känslighet för endogent estradiol och visade också ett ökat uttryck av progesteronreceptorer. Hur BPA kan verka så lång tid efter exponering är oklart men en hypotes verkar vara att BPA har en direkt verkan på de fetala mjölkkörtlarnas genuttryck som sedan reglerar utvecklingen under puberteten (Munoz-de-Toro *et al.*, 2005). Ytterligare en perinatalstudie, där möss exponerats för BPA, gav liknande resultat. Avkomman hade fler terminala "end buds" (toppen på de förgrenande mjölkkörtelgångarna under utveckling) och

likaså fler progesteronreceptorer i de mammära epitelcellerna vid 6 och 12 månaders ålder, jämfört med kontrollgruppen (Ayyanan *et al.*, 2011).

Det har demonstrerats att BPA (och estradiol) inducerar uttryck av HOXB9 *in vitro* i bröstcancer celler och *in vivo* i kastrerade råttor. HOXB9 är en gen som spelar stor roll vid mjölkörtelutveckling och är associerad med bröstcancer. HOXB9 har visat sig överrepresenterad i bröstcancer celler och reglerar bland annat i cellproliferation och angiogenes (Deb *et al.*, 2016).

## DISKUSSION

Eftersom hunden har en längre progesteronfas än råttor, mus och människa, kan hunden möjligtvis redan innan BPA-exponering vara predisponerad för juvertumörutveckling. Detta på grund av att progesteron stimulerar till alveolutveckling och en lokal GH-produktion som leder till prolifering av juvercellerna (van Garderen *et al.*, 1997). Om hunden i tillägg utsätts för BPA, som ökar uttrycket av progesteronreceptorer i juvret (Jenkins *et al.*, 2009), leder det till ett mer progesteronkänsligt juver och därmed möjlig tumörutveckling. En ökning av juvertumörincidensen sågs vid långvarig oral administrering av östrogen och progestin i kombination (Rutteman, 1992). Detta skulle möjligtvis kunna tala för att BPA-exponering tillsammans med en långvarig progesteronproduktion, som i hundens fall, skulle kunna öka risken för tumörbildning. Och då progestiner möjligen ger en mer cancerogenkänslig vävnad (Mol *et al.*, 1995), gör det i så fall hunden mer utsatt jämfört med råttor, mus och människa. Å andra sidan har hunden en anöstrus som eventuellt fungerar som en skyddande faktor då vävnaden är i vilofas och då mindre mottaglig för cancerogener.

Att BPA har lägre affinitet till östrogenreceptorn än estradiol (Kuiper *et al.*, 1998) talar för att BPA får mest effekt vid frånvaro av estradiol. Det kan utgöra en risk för hunden då den har få estradiolstegringar över tid vid jämförelse med råttor, mus och människa. Det gäller förstås om BPA ger en proliferativ effekt via GPER, ER $\alpha$  och perinatal exponering. BPAs affinitet till GPER har inte framkommit i litteraturen. Å andra sidan om BPA nu är selektiv för ER $\beta$  så skulle det inte vara någon ökad risk för juvertumörutveckling eftersom ER $\beta$  visat sig ha antiproliferativ verkan (Paruthiyil *et al.*, 2004).

BPA exponering *in utero* har visats ge brösttumör hos möss senare i livet, studien extrapolerades till människa genom jämförelser som också talade för liknande resultat. Detta förklarades med att BPA-exponering under den fetala utvecklingen gör bröstvävnaden mer känslig för sitt endogena estradiol och på så sätt ökade risken för varje östruscykel. Resultaten visade också att fler progesteronreceptorer uttrycktes i bröstvävnaden (Brisken *et al.*, 2015). Återigen kan man fråga sig om denna studie kan extrapoleras till hund med tanke på det tidigare resonemanget angående hundens färre estradiolstegringar över tid. Men om nu BPA-exponeringen skulle fortsätta under hela livet, vilket den mycket troligt gör, kan man ju tänka sig att det blir ett annorlunda svar, då det finns en östrogenlik substans som BPA ständigt närvarande och möjligen då ger prolifering av de mer östrogenkänsliga juvercellerna. Resultaten om att fler progesteronreceptorer uttrycktes i juvervävnaden efter perinatal exponering talar återigen för att hunden är utsatt för högre risk på grund av sin förlängda progesteronproduktion.

Studien som visat på att BPA inducerar råttans mammära epitelceller till både proliferation och differentiering (Colerangle & Roy, 1997) ger BPA en dubbeltydig egenskap eftersom BPA-exponeringen i denna studie verkar ha en stark cancerogen effekt om man ser till proliferationens ökade risk för mutationer, men å andra sidan borde en ökad differentiering leda mot ett mer benigt tumörstadium.

Något som visar på skillnad mellan human brösttumör och hundens juvertumör är skillnaden i svaret vid tamoxifenbehandling. Tamoxifen ska verka antagonistiskt på östrogenreceptorer i mjölkörtelvävnad och har inom humanvården fungerat framgångsrikt. Dock har hunden inte svarat lika bra på denna behandling (Morris *et al.*, 1993), och visar också en större känslighet för agonistiska bieffekter i andra vävnader (Tavares *et al.*, 2010), vilket kan tala för att hunden möjligen uttrycker en annan uppsättning av de olika östrogenreceptorerna än människan. Därav bör dessa artskillnader vägas in i spekulationerna om huruvida BPA har en cancerogen effekt på hundens juver när man jämför med humanstudier. En teori skulle kunna vara att hundens juvertumör uttrycker fler GPER som inte låter sig inhiberas av tamoxifen och då fortsätter sin prolifererande effekt, och kanske till och med får stimulering från det ständigt närvarande BPA i vår miljö.

Då BPA är en östrogenlik substans och studier visat att östrogen inte har så stor effekt på hundens juver (Rutteman, 1992) kan man kanske anta att BPA inte heller skulle ha det. Frågan är om man kan jämföra hunden med försök på råttor, där BPA visats sig ha en prolifererande effekt på råttans bröstkörtlar (Jenkins *et al.*, 2009), när råttor har visats sig vara extra känsliga för östrogener som i sin tur ger ökad prolaktinproduktion (Neumann, 1991). Prolaktin stimulerar, med sin luteotrofa effekt, progesteronproduktionen och råttan får på så sätt en östralcykel med förlängd lutealfas som då är mer lik hundens östralcykel. Detta talar återigen för att hundens normala cykel, utan BPA-exponering, redan utgör en predisponering för ökad proliferation av juvercellerna. Och hur då BPA i tillägg skulle påverka hundens juver, om jämförelsen görs med råttor, är svårt att säga. Därav bör en extrapolering av studieresultat, från råttor till hund, ha denna aspekt i beaktande.

Vidare har det ju visats att tumörincidensen ökade när östrogen och progestin gavs i kombination och att östrogener ökar progestinernas effekt (Rutteman, 1992). Ett samband har också setts mellan estradiol och produktion av IGF-1 i hundens juvertumör (Queiroga *et al.*, 2008). Om man då antar att BPA skulle fungera med samma östrogena effekt som i de utförda studierna, är hunden återigen i en cancerogen riskzon om BPA också stimulerar till produktion av IGF-1 och att hundens långvariga progesteronutsöndring bidrar till kombinationseffekten tillsammans med BPA och därmed ger upphov till möjlig juvertumörutveckling. Detta resonemang kan uppfattas motsägelsefullt när studier visat att östrogen inte har gett upphov till ökad tumörincidens. Dock framgår det inte i studierna vilken affinitet/selektivitet de olika östrogenerna har för vilka receptorer så diskussionen måste hållas öppen huruvida dessa studiers östrogener kan jämföras med BPA.

Den "östrogena paradoxen" har också observerats i studier med BPA (Jenkins *et al.*, 2011). Detta kan hypotetiskt förklaras med att BPAs affinitet till GPER kanske är högre än ER $\beta$  och då vid låga doser av BPA så blir det en prolifererande effekt eftersom mest aktivering av GPER sker, medan det vid höga doser också kan ske en aktivering av ER $\beta$ , eftersom BPA har



högre affinitet till ER $\beta$  än ER $\alpha$  (Marino *et al.*, 2012), och då fungerar antiproliferativt. Och om man vidare antar att BPAs affinitet är högre till GPER än ER $\beta$ , förklarar det varför många studier med BPA gett cancerogena resultat trots att BPA har sagts ha högst affinitet till ER $\beta$ . Å andra sidan, om nu ER $\beta$  verkar antiproliferativt (Paruthiyil *et al.*, 2004) och BPA hypotetiskt kanske har högst affinitet för ER $\beta$ , jämfört med ER $\alpha$  och GPER, så skulle det betyda att BPA absolut inte gav upphov till juvertumörer utan tvärtom motverkade dessa, och att man till och med skulle kunna använda BPA som ett behandlingsalternativ.

Att jämföra BPAs effekt på hund med BPAs effekt på människa är i denna studie svårt eftersom forskning som gjorts gällande människa har varit på humana bröstcancerceller i kultur eller humana bröstcancerceller i möss eller råttor. Det gör det svårt att spekulera kring BPAs effekter eftersom dessa celler inte kunnat visa hur de påverkas som normala och heller inte varit under en human östralcykkel.

Sammanfattningsvis talar forskningsresultaten både för att BPA borde ha en cancerogen inverkan på mjölkkörtlarna och samtidigt, om man ser till verkningsmekanismerna, så talar det för att BPA skulle kunna ha en motverkande effekt på tumörutveckling. Hur dessa resultat ska kunna extrapoleras till hund är komplext och man skulle kanske kunna säga att BPA har en möjlig cancerogen verkan på hundens juver om man antar att BPA ökar progesteronreceptorerna även i hundens juvervävnad. Eller om BPA hypotetiskt har högst affinitet till GPER. Medan kontradiktoriskt skulle BPA kunna verka antiproliferativt med sin affinitet till ER $\beta$  och då inte alls ha en cancerogen effekt på hundens juver. Till frågorna hör BPAs affinitet till GPER och det som skulle underlätta diskussionen vore en studie på förhållandet mellan ER $\alpha$ , ER $\beta$  och GPER i hundens juver. Eftersom de östrogena receptorerna verkar kunna ha olika funktion så måste hänsyn tas till östrogena substansers selektivitet och affinitet gällande tolkning av studieresultat. Självfallet krävs studier på hund innan ett säkert svar finns gällande BPAs tänkbara cancerogena effekt på hundens juver.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Ayyanan, A., Laribi, O., Schuepbach-Mallepell, S., Schrick, C., Gutierrez, M., Tanos, T., Lefebvre, G., Rougemont, J., Yalcin-Ozuysal, O. & Brisken, C. (2011). Perinatal Exposure to Bisphenol A Increases Adult Mammary Gland Progesterone Response and Cell Number. *Molecular Endocrinology* 25(11), 1915-1923.
- Bennink, H., Verhoeven, C., Dutman, A.E. & Thijssen, J. (2017). The use of high-dose estrogens for the treatment of breast cancer. *Maturitas* 95, 11-23.
- Brisken, C., Hess, K. & Jeitziner, R. (2015). Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis. *Endocrinology* 156(10), 3442-3450.
- Colerangle, J.B. & Roy, D. (1997). Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of noble rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 60(1-2), 153-160.
- Concannon, P.W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* 124(3-4), 200-210.

- Deb, P., Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K.I., Bobzean, S.A., Pandita, T.K., Perrotti, L.I. & Mandal, S.S. (2016). Endocrine disrupting chemical, bisphenol-A, induces breast cancer associated gene HOXB9 expression in vitro and in vivo. *Gene* 590(2), 234-243.
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J.L., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., Labesse, G., Bourguet, W. & Balaguer, P. (2012). Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(37), 14930-14935.
- Dong, S., Terasaka, S. & Kiyama, R. (2011). Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental Pollution* 159(1), 212-218.
- Gayraud, V., Lacroix, M.Z., Collet, S.H., Viguie, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.-L. & Picard-Hagen, N. (2013). High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. (Research). *Environmental Health Perspectives* 121(8), 951.
- Goldman, J.M., Murr, A.S. & Cooper, R.L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. In: Chapin, R. (Ed.). Hoboken. pp. 84-97.
- Ibrahim, M.A.A., Elbakry, R.H. & Bayomy, N.A. (2016). Effect of bisphenol A on morphology, apoptosis and proliferation in the resting mammary gland of the adult albino rat. *International Journal of Experimental Pathology* 97(1), 27-36.
- Jenkins, S., Raghuraman, N., Eltoum, I., Carpenter, M., Russo, J. & Lamartiniere, C.A. (2009). Oral Exposure to Bisphenol A Increases Dimethylbenzanthracene-Induced Mammary Cancer in Rats. *Environmental Health Perspectives* 117(6), 910-915.
- Jenkins, S., Wang, J., Eltoum, I., Desmond, R. & Lamartiniere, C.A. (2011). Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice. *Environmental health perspectives* 119(11), 1604.
- Koestel, Z.L., Backus, R.C., Tsuruta, K., Spollen, W.G., Johnson, S.A., Javurek, A.B., Eilersieck, M.R., Wiedmeyer, C.E., Kannan, K., Xue, J., Bivens, N.J., Givan, S.A. & Rosenfeld, C.S. (2017). Bisphenol A (BPA) in the serum of pet dogs following short-term consumption of canned dog food and potential health consequences of exposure to BPA. *Science of the Total Environment* 579, 1804-1814.
- Kuiper, G., Enmark, E., Peltola-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12), 5925-5930.
- Kuiper, G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, P. & Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139(10), 4252-4263.
- Marino, M., Pellegrini, M., La Rosa, P. & Acconcia, F. (2012). Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids* 77(10), 910-917.
- Mol, J.A., Van Garderen, E., Selman, P.J., Wolfswinkel, J., Rijnberk, A. & Rutterman, G.R. (1995). Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *Journal of Clinical Investigation* 95(5), 2028-2034.
- Morris, J.S., Dobson, J.M. & Bostock, D.E. (1993). Use of Tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Veterinary Record* 133(22), 539-542.
- Munoz-de-Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C. & Soto, A.M. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146(9), 4138-4147.
- Murray, T.J., Maffini, M.V., Ucci, A.A., Sonnenschein, C. & Soto, A.M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reproductive Toxicology* 23(3), 383-390.

- Neumann, F. (1991). Early indicators for carcinogenesis in sex-hormone-sensitive organs. *Mutation Research* 248(2), 341-356.
- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G.R., Firestone, G.L. & Leitman, D.C. (2004). Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G(2) cell cycle arrest. *Cancer Research* 64(1), 423-428.
- Paulose, T., Speroni, L., Sonnenschein, C. & Soto, A.M. (2015). Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. *Reproductive Toxicology* 54, 58-65.
- Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M.F., De Francesco, E.M., Abonante, S., Rosano, C. & Maggiolini, M. (2012). Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* 120(8), 1177-1182.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C.S. & Illera, J.C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 $\beta$ -estradiol) in canine mammary tumours. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 110(1), 76-82.
- Reed BG, Carr BR. (2015). The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. I: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com. Tillgänglig: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/>
- Rutteman, G.R., Misdorp, W., Ma, B. & We Van Den, B. (1988). Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer* 58(5), 594.
- Rutteman, G.R. (1992). Contraceptive steroids and the mammary gland - is there a hazard - insights from animal studies. *Breast Cancer Research and Treatment* 23(1-2), 29-41.
- Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26(2), 419-+.
- Sjaastad, O.V., Sand, O., Hove, K. (2010) *Physiology of Domestic Animals*. 2nd edition. Oslo: Scandinavian veterinary press. 238, 704-706, 715-715, 741-744
- Sleeckx, N., De Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E., Van Ginneken, C. & Van Brantegem, L. (2011). Canine Mammary Tumours, an Overview. In. Oxford, UK. pp. 1112-1131.
- Stocco, C., Telleria, C. & Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews* 28(1), 117-149.
- Tavares, W.L.F., Lavalle, G.E., Figueiredo, M.S., Souza, A.G., Bertagnolli, A.C., Viana, F.A.B., Paes, P.R.O., Carneiro, R.A., Cavalcanti, G.A.O., Melo, M.M. & Cassali, G.D. (2010). Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52:67.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Schaeberle, C.M., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. & Soto, A.M. (2008). Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reproductive Toxicology* 26(3), 210-219.
- vanGarderen, E., deWit, M., Voorhout, W.F., Rutteman, G.R., Mol, J.A., Nederbragt, H. & Misdorp, W. (1997). Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors - Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *American Journal of Pathology* 150(3), 1037-1047.
- Vaughn, B.C. (2010). *Bisphenol A and Phthalates: Uses, Health Effects and Environmental Risks (Chemical Engineering Methods and Technology)*. Hauppauge: Nova Science Publishers Incorporated. ProQuest Ebook Central, 85-108.
- Westwood, F. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. In: *Toxicol. Pathol.* pp. 375-384.

- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T. & Belcher, S.M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology* 24(2), 178-198.
- Wooten, K.J. & Smith, P.N. (2013). Canine toys and training devices as sources of exposure to phthalates and bisphenol A: Quantitation of chemicals in leachate and in vitro screening for endocrine activity. *Chemosphere* 93(10), 2245-2253.