

VI-194 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DE SUBSTÂNCIAS SIMPLES E MISTURAS PELO ENSAIO YES (*Yeast Estrogen Screen*)

Giselle Gomes⁽¹⁾

Graduada em Biologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2012), mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2015); doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Louise Felix⁽¹⁾

Graduada em Gestão Ambiental pelo Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca (2012), graduada em Engenharia Cartográfica pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2015). Atualmente é bolsista PROATEC (Programa de apoio técnico as atividades de ensino, pesquisa e extensão) Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Allan dos Santos Argolo⁽¹⁾

Graduando em Engenharia Civil com ênfase em Sanitária pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro, bolsista CNPq de iniciação científica no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) na Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Daniele Maia Bila⁽¹⁾

Graduada em Engenharia Química pela UFRRJ (1998), mestre em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ (2000) e doutora em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ (2005). Realizou Pós-doutorado em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ (2005-2006). Desde 2006 é professor adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da UERJ (DESMA/UERJ). Desde 2010 é chefe do Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da Faculdade de Engenharia da UERJ.

Endereço⁽¹⁾: Rua Rua São Francisco Xavier 524, 5029-F., Maracanã - Rio de Janeiro - Cep: 20550-900 – Brasil. - e-mail: gisellegomesms@gmail.com

RESUMO

Diversos ensaios *in vitro*, *in vivo* e métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a análise de desreguladores endócrinos. É sabido que para analisar o efeito das concentrações destas substâncias no meio, não basta considerá-las individualmente, sendo importante a consideração dos efeitos de misturas, haja vista a existência de efeitos sinérgicos e aditivos. Neste contexto, o bioensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*) se caracteriza como uma importante ferramenta para fornecer evidência inicial de contaminantes estrogênicos no meio ambiente. Assim, neste trabalho foi investigada a atividade estrogênica, pelo ensaio YES, de amostras sintéticas individuais - estrogênios naturais e sintéticos: E1, E2, E3, EE2 - e misturas desses estrogênios. Os resultados mostraram um equivalente estradiol (EQ-E2) para a mistura maior do que o esperado, presumindo um efeito sinérgico entre os compostos. O EE2 foi o mais estrogênico com uma potência relativa de 1,25, seguido por E1 (0,39), E3 (5×10^{-3}). É importante ressaltar que a potência relativa dos estrogênios, assim como de qualquer outro composto, varia dependendo do ensaio usado para análise, e que ensaios *in vitro* presumem a resposta de ensaios *in vivo*. Assim, a análise *in vitro* das potências relativas dos estrogênios estudados são indicativos dos efeitos que podem acontecer *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Desreguladores endócrinos, Ensaio *in vitro* YES, Atividade Estrogênica, efeitos aditivos e sinérgicos,

INTRODUÇÃO

Diversos ensaios *in vitro*, *in vivo* e métodos analíticos foram e estão sendo desenvolvidos para a análise de desreguladores endócrinos. É sabido que para analisar a relevância das concentrações detectadas no meio ambiente, não é suficiente considerá-las individualmente, sendo igualmente importante considerar os efeitos das misturas e a persistência dessas substâncias estrogênicamente ativas (ESTEBAN et al., 2013).

As misturas de substâncias químicas geralmente induzem maiores efeitos biológicos que os compostos isolados (European Inland Fisheries Advisory Commission 1987; Scientific Committee on Problems of the Environment

1987), visto que elas podem apresentar efeito sinérgico, o que potencializa a resposta, sendo assim, existe a necessidade de estudar o efeito e a resposta das misturas.

É também de conhecimento geral que nas análises químicas o efeito sinérgico dos compostos não é levado em consideração e, conseqüentemente, para conhecimento dos efeitos biológicos é necessário o uso de outros tipos de ensaios (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996), sendo assim, o ensaio YES (Yeast Estrogen Screen) se caracteriza como uma importante ferramenta e um dos mais comuns bioensaios *in vitro* utilizados para fornecer evidência inicial de contaminantes estrogênicos no meio ambiente, sendo uma ferramenta robusta e sensível para avaliar a atividade estrogênica em amostras ambientais. (BECK; BRUHN; GANDRASS, 2006) e sintéticas (KOLLE et al., 2010).

O ensaio YES tem sido usado para avaliar a atividade estrogênica em águas e águas residuárias (BRIX et al., 2010; Li et al., 2014; DIAS et al., 2015), permitindo o conhecimento da atividade estrogênica total da amostra, a qual é expressa em EQ-E2 (equivalente estradiol). Porém para a utilização desse bioensaio para amostras ambientais de forma a obter resultados seguros e confiáveis é necessário um prévio conhecimento dele como ferramenta para a análise de atividade estrogênica. Para isso a análise de substâncias simples e misturas se torna de essencial importância e necessidade para o entendimento do ensaio.

Desse modo, o objetivo do trabalho foi estudar a determinação da atividade estrogênica, pelo ensaio YES em amostras sintéticas individuais - estrogênios naturais e sintéticos: E1, E2, E3, EE2 - e misturas desses estrogênios, visto que a ausência de análise de misturas pode levar à subestimação dos riscos que existem em situações de exposição real no meio ambiente, resultando em conclusões errôneas de ausência de risco.

MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio YES utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada (cepa BJ1991), onde foi inserido um plasmídeo contendo o gene humano ERE (elemento de resposta ao estrogênio) in tandem (ladeado) ao gene da enzima β -galactosidase (Lac-Z), sendo ambos regulados pelo promotor PGK (promotor forte, regulado pela presença de lactose). A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada tem também o gene humano (hER) incorporado ao genoma.

O ensaio YES foi realizado segundo metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996), onde, resumidamente, a solução padrão 17β -estradiol (usada como controle positivo para a curva de calibração) e os extratos das amostras, ou compostos são diluídos serialmente em etanol e 10 μ L de cada diluição são transferidos (em duplicata) para a placa de 96 poços onde se deixa evaporar até a secura e adiciona-se 200 μ L do meio de cultivo semeado com a levedura. A placa é incubada por 72 horas à 30 °C. A absorbância é lida a 575 nm (cor) e 620 nm (turbidez). O etanol e o 17β -estradiol são usados como controle negativo e positivo, respectivamente, em cada ensaio. O resultado do ensaio é expresso em EQ-E2 (equivalente estradiol), o qual é calculado através da interpolação com a curva do 17β -estradiol. Também é possível calcular a potência do composto em comparação ao controle positivo (17β -estradiol), para o cálculo da potência relativa (PR) divide-se o EC50 do 17β -estradiol pelo EC50 do composto analisado.

Foi realizada a análise de substâncias simples, 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), estrona (E1), estriol (E3), e a mistura dessas substâncias. Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza, obtidos da Sigma Aldrich.

Os compostos estudados abrangeram as faixas de concentrações de acordo com a Tabela 1, tanto para as análises dos compostos isolados como em conjunto, sendo referentes à concentração dos compostos no poço da placa de ensaio.

Tabela 1: Faixas de concentrações dos compostos estudados

Composto	Faixa de concentração (ng.L ⁻¹)
E2	2724 – 1,33
EE2	2724 – 1,33
E1	7500 – 3,66
E3	5x10 ⁶ – 2441

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitas substâncias químicas lançadas no meio ambiente podem interferir na regulação dos estrogênios endógenos e com isso afetar o sistema endócrino de diversos seres vivos. Embora essas substâncias químicas sejam encontradas em concentrações consideráveis para provocar danos aos seres vivos, sua potência geralmente é muito pequena para contribuir significativamente para a atividade estrogênica total observada em amostras complexas (SUMPTER e JOHNSON, 2008).

Há uma forte evidência de que os estrogênios naturais e sintético, incluindo estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estriol são geralmente responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica em estações de tratamento de esgoto, efluentes e rios receptores (JAROSOVÁ et al., 2014). Portanto, a estrogenicidade e a potência relativa dos estrogênios: E2, EE2, E1, E3, foram investigadas pelo ensaio YES, assim como das misturas desses estrogênios.

Os resultados mostram que esses compostos tem a capacidade de se ligar ao receptor de estrogênio presente na levedura e produzir uma resposta, ou seja, fazer com que ocorra a produção da β -galactosidase e essa na presença do substrato cromogênico CPRG o degrada em CPR produzindo a resposta colorimétrica do ensaio. Sendo assim, todos esses compostos possuem o mesmo mecanismo de ação e são compostos agonistas que atuam se ligando ao receptor de estrogênio e elucidando uma resposta estrogênica, sendo capazes de atuar na desregulação do sistema endócrino podendo provocar efeitos diversos.

A mistura destes compostos também foi analisada e comparando o EQ-E2 encontrado para esta mistura com a soma da concentração utilizada para cada composto vezes a respectiva potência, os resultados mostraram que o EQ-E2 observado foi maior do que o esperado, o que presume ser um efeito sinérgico entre os compostos. O EE2 foi o mais estrogênico com uma potência relativa de 1,25, seguido por E1 (0,39), E3 (5×10^{-3}) (Figura 1).

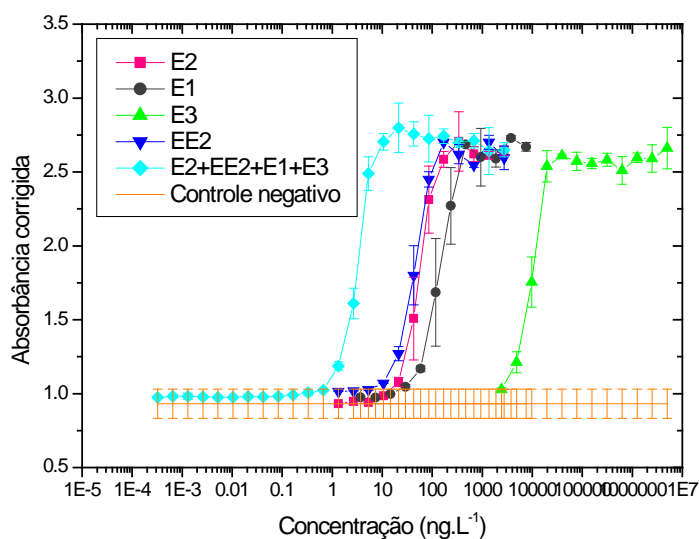


Figura 1: Curvas dose-respostas de substâncias simples: 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), Estrona (E1), Estriol (E3) e das misturas dessas substâncias.

É importante ressaltar que a potência relativa dos estrogênios, assim como de qualquer outro composto, varia dependendo do ensaio usado para análise. Van den Belt et al. (2003) relata que a potência relativa do composto E1 no ensaio MVLN-assay (transformed MCF-human breast cancer cell line) é de 0,2, no OSI (ovarian somatic index) é de 0,5 e no VTG (vitelogenina) é de 0,8. Enquanto que para o composto EE2 o mesmo autor descreve que para o ensaio MVLN-assay a potência relativa é de 1,6, no OSI é 32,6e no VTG é 30,6.

Isso demonstra como esses compostos podem agir de forma diferente nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Quando uma substância apresenta resposta estrogênica positiva em um ensaio *in vitro*, provavelmente, terá também

uma resposta estrogênica positiva no ensaio *in vivo*, porém a intensidade dessa resposta dependerá do tipo de composto. Por exemplo, o EE2 por possuir o grupo 17 α -etnil ele está menos susceptível a metabolização que os estrogênios endógenos (GUENGERICH, 1990) e, portanto, apresentará uma maior resposta estrogênica nos ensaios *in vivo*. Além disso, os ensaios *in vitro* não avaliam a bioacumulação (FOLMAR et al., 2000) o que também influencia numa maior resposta estrogênica dos compostos nos ensaios *in vivo*. Desse modo, os ensaios *in vitro* funcionam como um indicativo da atividade e efeitos do que acontecerá em situações de exposição real no meio ambiente.

As análises de misturas demonstram como os efeitos desses estrogênios pode ser acentuado, visto que no meio ambiente eles não são encontrados isolados e, portanto, o efeito *in vivo* será ainda maior, já que as misturas podem ter efeitos aditivos ou sinérgicos.

CONCLUSÕES

Os testes realizados até o momento como ensaio YES são de extrema importância e significância, visto que reforçam a acurácia dos resultados. A análise de substâncias simples e misturas se torna de essencial importância e necessidade para o entendimento do ensaio. Além de que a análise *in vitro* das potências relativas dos estrogênios estudados são indicativos dos efeitos que podem acontecer *in vivo*. Além disso, a ausência de análise de misturas pode levar à subestimação dos perigos que existem em situações de exposição real no meio ambiente, resultando em conclusões errôneas de ausência de risco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECK, I.-C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, v. 63, n. 11, p. 1870–1878, 2006.
2. BRIX, R. et al., Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International*, v. 36, n. 4, p. 361–367, 2010.
3. DIAS, A. C. V. et al., Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 120, p. 41–47, 2015.
4. ESTEBAN, S. et al., Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *The Science of the total environment*, v. 466-467, p. 939–51, 2013.
5. European Inland Fisheries Advisory Commission. 1987. EIFAC Technical Paper 37, Rev. 1. Rome:Food and Agriculture Organisation (FAO).
6. FOLMAR, C. et al., Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an *in vivo*, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquatic Toxicology* v. 49, p. 77–88, 2000.
7. GUENGERICH, F.P., Metabolism of 17 α -ethynylestradiol in humans. *Life Sciences*. v. 47, p. 1981–1988, 1990.
8. JAROŠOVÁ, et al., What level of estrogenic activity determined by *in vitro* assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environment International*, v. 64, p. 98–109, 2014.
9. KOLLE, S.N.; et al., In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays. *Toxicology in Vitro*, v. 24, p. 2030–2040, 2010.
10. LI, B. et al., Assessing estrogenic activity and reproductive toxicity of organic extracts in WWTP effluents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 39, n. 2, p. 942–952, 2014.
11. ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241–248, 1996.
12. SUMPTER, J.P., JOHNSON, A.C., 10th Anniversary Perspective: reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: from known knowns to unknown unknowns (and many things in between). *Journal of Environmental Monitoring*, v. 10(12), p.1476–1485, 2008.
13. VAN DEN BELT, K; et al., Comparative study on the *in vitro/in vivo* estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquatic Toxicology*. v. 66, p 183–195, 2004.