

AÇÃO DE ESTROGÊNIOS NATURAIS (β -ESTRADIOL) E SINTÉTICOS (17 α -ETINILESTRADIOL) SOBRE DISTINTAS COMUNIDADES DE PEIXES: SOB ÊNFASE GENOTÓXICA

ACTION OF NATURAL (β -ESTRADIOL) AND SYNTHETIC (17 α -ETINYLSTRADIOL) ESTROGENS ON DIFFERENT COMMUNITIES OF FISH UNDER GENOTOXIC

LUARA LUPEPSA¹, DURINÉZIO JOSÉ DE ALMEIDA^{2*}, FERNANDA VIEIRO DIAS³

1. Acadêmico de mestrado do programa de pós graduação em biotecnologia ambiental – Universidade Estadual de Maringá; 2. Professor Doutor, da Disciplina de Bioquímica da Faculdade Campo Real. 3. Professora Doutora, da Faculdade Campo Real.

* Avenida Colombo, 6808, zona 7, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-000. luara_95@hotmail.com

Recebido em 24/05/2017. Aceito para publicação em 09/06/2017

RESUMO

Os disruptores endócrinos são substâncias capazes de interagir com os receptores hormonais presentes na membrana plasmática e no núcleo celular, interferindo na síntese do RNAm. A regulação hormonal em mulheres se dá pela ingestão de 17 α -etinilestradiol (EE2), hormônio sintético similar ao β -estradiol, ambos caracterizados por serem disruptores endócrinos em animais aquáticos. Esta revisão visa abordar as análises mutagênicas em diversos peixes quando expostos a um dos contaminantes em diversas concentrações em âmbito laboratorial. Os testes de micronúcleo, ensaio do cometa e alterações morfológicas nucleares foram utilizadas como parâmetro de análise. Diversos resultados foram evidenciados nessa revisão, alguns organismos analisados não demonstraram estatisticamente diferenças, sendo que foram explicadas como organismos resistentes aos contaminantes, entretanto outros demonstraram susceptibilidade em todas as concentrações analisadas, evidenciando o potencial mutagênico em peixes, em conformidade com as substâncias classificadas pela IARC (International Association For Research On Cancer) como classe 1 de carcinógenos.

PALAVRAS-CHAVE: Disruptores endócrinos, contaminante ambiental, estrogênio, bioindicadores, micronúcleo.

ABSTRACT

Endocrine disruptors are substances capable of interacting with the hormonal receptors present on the plasma membrane and the cell nucleus, interfering in mRNA synthesis. The hormonal regulation in women is due to the ingestion of 17 α -ethinylestradiol (EE2), a synthetic hormone similar to β -estradiol, both characterized by being endocrine disruptors in aquatic animals. This review aims to address mutagenic analyzes in several fish when exposed to one of the contaminants in various concentrations in the

laboratory. Micronucleus tests, comet assay and nuclear morphological changes were used as a parameter of analysis. Several results were evidenced in this review, some organisms analyzed did not statistically demonstrate differences and were explained as organisms resistant to contaminants, however others demonstrated susceptibility in all concentrations analyzed, evidencing the mutagenic potential in fish according to substances classified by the IARC (International Association For Research On Cancer) as class 1 carcinogen.

KEYWORDS: Endocrine disruptors; environmental contaminant; estrogen; bioindicators; micronucleus

1. INTRODUÇÃO

A toxicidade de inúmeras substâncias consideradas poluentes ambientais vem sendo investigada quanto sua ação nos seres humanos e demais espécies, entretanto nas ultimas décadas essas substâncias vem despertando interesse sobre as possíveis alterações no sistema endócrino dos animais que entram em contato (FONTENELE et al., 2010). São os disruptores endócrinos, caracterizados por não serem venenos clássicos, entretanto que interferem no sistema hormonal, alterando mensageiros químicos dentro de determinado organismo (SANTAMARTA, 2001).

O fato do ecossistema aquático ser, na maioria das vezes, o receptor final de fármacos torna as populações ali residentes biomarcadores de qualidade ambiental, devido a sensibilidade para detectar diversos poluentes em baixas concentrações, o que irá resultar em alterações fisiológicas e genéticas, podendo comprometer a sua sobrevivência (MACEDA et al., 2014).

O uso de peixes como bioindicadores de contaminação ambiental é de ampla aplicação devido à similaridade de resposta a agentes tóxicos quando comparados aos grandes vertebrados (SCALON et al.,

2010). Esses organismos apresentam características de bioacumulação, semelhante aos mamíferos, respondendo fisiologicamente as alterações químicas do meio, sendo de fácil manipulação quando realizadas pesquisas laboratoriais (MACEDA et. al, 2014).

O sistema endócrino em conjunto com o sistema nervoso desempenha funções vitais, influenciando tanto em células próximas quanto agindo em tecidos distantes, modulando suas atividades (BERNE et. al., 2010). A ação do sistema endócrino ocorre por meio da síntese de hormônios, os quais são considerados sinalizadores químicos, atuando quando lançados à corrente sanguínea na comunicação com receptores específicos e, consequentemente, interferindo em determinada resposta biológica (GOODMAN et al. 2005).

Hormônios estrógenos naturais como o β -estradiol, são produzidos por todos os mamíferos fêmeas, tendo uma estimativa de excreção diária de 2,3 a 259 microgramas/mulher, chegando em meio aquático principalmente através do esgoto doméstico. Outra fonte de E2 são os efluentes de produção agrícola (PEREIRA e TALES, 2006). Durante a última década as concentrações de E2 nos efluentes têm aumentado significativamente, sendo detectados em zonas urbanas 200 ng/L (BOWMAN et. al., 2000). Segundo Ying et. al., (2003), o β -estradiol em condições aeróbias é degradado rapidamente, sendo estipulado seu tempo de meia-vida de 2 dias.

Outra substância com características estrogênica e considerada emergente é o 17 α -etinilestradiol (EE2). É um hormônio sintético utilizado principalmente em contraceptivos orais, fármacos e aditivos de ração animal, chegando ao ambiente aquático em sua maior totalidade das vezes via esgoto doméstico e industrial. Esse hormônio é excretado pelas mulheres na sua forma inativa, ou seja, conjugado, sendo que para ser reativado necessita de desconjugação, processo este realizado por bactérias (VAN DEN BELT et. al., 2004). O mecanismo de ação dessa substância é similar ao β -estradiol, sendo que interage com receptores de estrogênio ER α e ER β , localizados no citoplasma e no núcleo celular, alterando a conformação desses receptores e por consequência interagindo na síntese de RNAm (BRZOZOWSKI et. al., 1997, GAIDO et. al., 1997).

Alterações no material genético, muitas vezes provenientes de químicos e fármacos, resultam em efeitos mutacionais e em longo prazo em efeitos negativos hereditários (KIRSCH-VOLDERS et. al., 2009; SCHRADER, 2016). Os estudos da indução dessas mutações são de extrema relevância, visando que estas se expressam de diferentes formas (ARALDI et. al., 2015).

1. MATERIAIS E MÉTODOS

Baseado na sensibilidade do método, o ensaio do cometa é aplicado em diferentes tecidos de peixes expostos a químicos que são considerados

contaminantes ambientais, o princípio do método parte da análise de fragmentos de DNA, via eletroforese, analisando a integridade da cadeia de DNA, demonstrando ser uma ferramenta útil para a análise de efluentes (DHAWAN, BAJPAYEE, PARMAR, 2008; COLLINS et. al., 2014). Já o teste de micronúcleo (MN), principal parâmetro de análise dessa revisão é considerado um teste genotóxico e mutagênico, pois detecta interferência no fuso mitótico, formando micronúcleos, que nada mais é extrusões de cromossomos inteiros ou parte deles formados durante a mitose (YAMAGUCHI E FLORES, 2008; ARALDI et al., 2015).

Sabe-se que o estradiol provoca um aumento no nível hepatossomático e consecutivamente a produção de vitelogenina em machos (COSTA et. al., 2010), efeito antioxidante no fígado e produção de acetilcolinesterase no cérebro de *Geophagus brasiliensis* (YAMAMOTO, 2011), entretanto o propósito dessa revisão é evidenciar as alterações genotóxicas em peixes decorridas devido a ação do β -estradiol (E2) e do 17 α -etinilestradiol (EE2), alertando seus riscos para essas populações.

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Sendo assim, essa revisão se inicia com os resultados de Sponchiado et. al. (2010), o qual avaliou a presença de alterações em células sanguíneas de *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como tilápia, mediante teste de micronúcleo, ensaio cometa e aberrações morfológicas nucleares quando expostos a 6 ng/L de E2, durante 24h 48h e 10 dias, cada grupo contendo 8 indivíduos.

Os resultados obtidos nos grupos 24h e 48 h não foram estatisticamente relevantes, entretanto houve diferença quanto à presença de micronúcleos com 10 dias de exposição ($P=0.036$) quando comparados ao grupo controle. Quanto a análise de alterações morfológicas nucleares, houve diferença estatística nos grupos 24h (0,227), entretanto não se tornou relevante em 48h e 10 dias. A comparação entre os tratamentos indica diferença estatística apenas para os núcleos em *notched*, se mostrando indiferente quanto as demais classificações estabelecidas por Carrasco e colaboradores em 1990, *lobed*, *blebbed* e núcleos vacuolados. No que diz respeito ao ensaio cometa, os resultados se mostraram relevantes apenas no grupo 48h ($P<0,001$), entretanto as migrações de classe 1 e classe 2 foram observadas em ensaios de 24 h, o que se tornou ausente em 48 horas.

A exposição de *O. niloticus* a 6 ng/L, demonstrou não haver diferenças entre o grupo controle e os grupos 24h e 48 h, quando o teste em análise era o de MN, entretanto a cinética de renovação celular se mostrou efetiva quando o grupo analisado era de 10 dias, evidenciando que os eritrócitos de peixes tendem a diminuir a frequência de MN em exposições crônicas (SPONCHIADO et. al., 2010).

Os efeitos crônicos do β -estradiol foram avaliados

também por Teles, Pacheco e Santos (2005), utilizando como animal modelo exemplares adultos de *Dicentrarchus labrax* L. As concentrações estabelecidas foram de 200 ng/L e 2000 ng/L do E2 dissolvidos na água e 0,5 mg/kg e 5 mg/kg injetados via peritoneal. Os autores avaliaram respostas bioquímicas e para o estresse genotóxico, utilizando também o teste de micronúcleo e anormalidades nucleares, onde foi analisado 1000 hemácias/peixe.

Os resultados demonstraram não haver relação dose-tempo de alterações morfológicas nucleares, entretanto houve um aumento da frequência de micronúcleos quando comparados ao grupo controle (7 vezes para os expostos a 200 ng/L e 6 vezes para os expostos a 2000 ng/L). Aos indivíduos cuja exposição se deu de forma intraperitoneal, houve uma diferença de 0,5 vezes a menos no grupo exposto a 5 mg/kg, quando comparados aos indivíduos expostos a 0,5 mg/kg, evidenciando a não relação entre dose-tempo, demonstrando ser um contaminante aquático, já que aumentou a frequência de micronúcleos em todas as doses testadas.

Teles, Pacheco e Santos conduziram outro experimento em 2005, utilizando 5 exemplares por grupo de *Sparus aurata* L, sob a exposição de 4000 ng/L de β -estradiol durante 4, 8, 12, 16 horas e controle, avaliando atividades bioquímicas a alterações morfológicas nas hemácias (1000/indivíduo). A frequência de alterações morfológicas nucleares das hemácias analisadas se mostraram similares ao do grupo controle, tendo a maior diferença nos grupos expostos com os tempos de 8 horas e 4 horas respectivamente, indicando que o organismo de *Sparus aurata* L possui mecanismo eficiente para remoção das células alteradas, não havendo assim diferença significativa entre os grupos teste e controle.

Sabendo que a exposição de peixes ao EE2 causa a produção de vitelogenina em machos Yamamoto (2011), avaliou os efeitos desse composto, cujo modo de exposição foi por injeção peritoneal (0,1; 1,0 e 20 mg de EE2/Kg de peixe), estabelecendo o tempo de 15 dias de exposição em exemplares de *Geophagus brasiliensis*, objetivando detectar alterações bioquímicas e genotóxicas, estes através de teste de micronúcleo analisando 2000 células/indivíduo, levando em consideração padrões como coloração, formato e tamanho.

A quantidade máxima de micronúcleos encontrada por lamina foi de 3, sendo que não foi observado alterações morfológicas nucleares, nem diferença significativa entre os grupos analisados e o controle, entretanto houve uma maior prevalência de MN nos indivíduos expostos a 10 mg/kg, demonstrando em uma das hipóteses que a espécie *G. brasiliensis* possui mecanismos de defesa eficientes contra esse tipo de composto, e em uma segunda hipótese que o EE2 possua um efeito protetivo para esse tipo de célula analisada.

Os experimentos de Micael et al. (2007), onde utilizaram duas gerações de Zebra fish (*Danio rerio*),

para avaliar os efeitos a longo prazo de EE2. No 21 dia após a fertilização as larvas foram transferidas para aquários aerados de 30L e adicionados 3,5 ng/L de 17 α -etinilestradiol, sendo que por punção cardíaca foi retirado o material para as respectivas análises de 6 dos 12 animais em teste. As alterações morfológicas nucleares e a presença de micronúcleos foi 4 a 6 vezes superior quando comparadas com o controle, evidenciando que o potencial negativo do hormônio sintético vai além de distúrbios na reprodução, induzindo também danos no DNA.

A utilização de exemplares de *Crassostrea gigas* em sua fase embrionária levou Rousseau e colaboradores (2007) a verificar a atividade do 17 α -etinilestradiol em baixas concentrações (5 ng/L), utilizando ensaio do cometa o qual se mostrou não haver alterações significativas, devido a baixa concentração testada, cujo período de incubação das larvas (n =400), foi de 16 horas em provetas com capacidade de 2L.

3. CONCLUSÃO

Os estrogênios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2), recebem uma atenção especial devido ao seu descarte diário em esgoto doméstico, aos quais em muitos casos não são removidos completamente pelas estações de tratamento de esgoto (BILA E DEZOTTI, 2007). Considerando que segundo informações do IARC (International Association For Research On Cancer), a terapia de reposição hormonal com EE2, se enquadraria no grupo 1 aos quais pertencem as substâncias reconhecidamente carcinogênicas para a espécie humana, envolvida esta também no desenvolvimento de câncer do endométrio (IARC, 2012), demonstrando a importância desta revisão em relatar seus mecanismos de ação.

Os diferentes peixes e doses utilizadas para elaborar esta revisão, demonstram os mais variados mecanismos de defesa contra essas substâncias químicas, sugerindo o potencial genotóxico dessa substância para os seres humanos, e o potencial de desregulação endócrina para os peixes em contato, sendo que é necessário acoplar testes de micronúcleo, ensaio do cometa a alterações histológicas e bioquímicas para um resultado mais preciso.

A importância ecológica dessas respostas dependerá se a competência reprodutiva dessas populações será comprometida, ou seja, sabe-se que a exposição ao E2 e EE2, causa feminização e produção de vitelogenina por parte dos machos, alterações nas gônadas e alterações bioquímicas hepáticas. Os possíveis efeitos desses produtos químicos sobre a diversidade genética dessas populações têm implicação na manutenção em longo prazo dessas espécies, sendo que a produção e liberação de gametas na época apropriada é essencial para a sua atividade reprodutiva (TYLER ; FILBY, 2011).

REFERÊNCIAS

- [01] ARALDI, R.P.; DE MELO, T.C.; MENDES, T.B.; DE SÁ JÚNIOR, P.L.; NOZIMA, B.H.N.; ITO, E.T.; STOCCO, R.C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. *Biomed Pharmacother* 72:74–82, 2015.
- [02] BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, 30(3):651–666, 2007.
- [03] BOWMAN, C.J.; KROLL, K.J.; HEMMER, M.J.; FOLMAR, L.C.; DENSLOW, N.D. Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Gen Comp Endocrinol*. 120:300–313; 2000.
- [04] BERNE, R. M.; KOEPPEN; STANTON, B. A. Berne & Levy physiology. Philadelphia, PA: Mosby/ Elsevier, 2010.
- [05] BRZOZOWSK, A. M. *et al.* Molecular basis of agonism and antagonismo in the oestrogen receptor. *Nature*, v. 389, n. 6652, p. 753–758, 1997.
- [06] COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MÖLLER, P.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutat Res Rev Mutat Res* 759:27–39, 2014.
- [07] CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assesment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological Indicator os Chemical Contaminant Effects. *Can. J. Fish Aquatic. Sci.* 47 : 2123 -2136. 1990.
- [08] COSTA, D. D. M.; NETO, F. F.; COSTA, M. D. M.; MORAIS, R. N.; GARCIA, J. R. E.; ESQUIVEL, B. M.; RIBEIRO, C. A. O. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology*. Curitiba. Vol 151. p 248-257. 2010.
- [09] DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*, 25:5–32. 2008.
- [10] INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100A (2012) – A Review of Human Carcinogens: Pharmaceuticals.
- [11] GAIDO, K. W. *et al.* Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 143, n.1, p. 205-212. 1997.
- [12] GOODMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. G. (ed.). Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica. Tradução: Carla de Mello Vorsatz**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.
- [13] FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; JUNIOR, R. M. M. Environmental contaminants and endocrine disruptors. **Arq. Bras. Endocrinol Metab**. 2010.
- [14] TYLER, C. R.; FILBRY, A. L. *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches*. Chapter 13 Feminized Fish, Environmental Estrogens, and Wastewater Effluents in English Rivers. Springer Science+Business Media. 2011.
- [15] KIRSCH-VOLDERS, M., GONZALEZ, L., CARMICHAEL, P., KIRKLAND, D., 2009. Risk assessment of genotoxic mutagens with thresholds: a brief introduction. *Mutat. Res.* 678, 72–5. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.05.001
- [16] YAMAGUCHI, M. U.; FLORES, M. Artigos de revisao: teste do microncleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.
- [17] MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S. Uso de biomarcadores para o monitoramento das águas do córrego arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Rev. Ambient, Água**. vol 10, n.1 Taubaté –Jan /Mar. 2014.
- [18] MICAEL, J.; REIS-HENRIQUE, R. A.; CARVALHO, A. P.; SANTOS, M.M. Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental International*. Porto.2007.
- [19] YING, G.; KOOKANA, R.S.; DILLON, P. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Res.* 37:3785-3791; 2003.
- [20] SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecol.e Desenv.Rur.Sustent.,Porto Alegre*, v.2, n.3, jul./set. 2001.
- [21] SCALON, M. C. S.; RECHENMACHER, C.; SIEBEL, A. M.; KAYSER, M. L.; RODRIGUES, M. T.; MALUF, S. W.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Brazilian Journal of Biology*, v.70, n.4, p.1217-1222, 2010.
- [22] SCHRADER, T.J. *Encyclopedia of Food and Health*, *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. 2016.
- [23] SPONCHIADO, G.; REYNALDO, E. M. F. L.; ANDRADE, A. C. B.; VASCONCELOS, E. C.; ADAM, M. L.; OLIVEIRA, C. M. R. Genotoxic Effects in Erythrocytes of *Oreochromis niloticus* Exposed to Nanograms-per-Liter Concentration of 17 β -Estradiol (E2): An Assessment Using Micronucleus Test and Comet Assay. Curitiba. *Water air Soil Pollunt.* Springer Science+Businnes (2010).
- [24] PEREIRA, M.; TELES, M. Efeitos fisiológicos e genotóxicos induzidos por contaminantes ambientais em peixes. *Dissertação de mestrado de biologia*. Universidade de Aveiro. 2006.
- [25] VAN DEN BELT, K.; BERCKMANS, P.; VANGENECHTEN, C.; VERHEYEN, R.; WITTERS, H. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethinylestradiol and nonylphenol. *Aquat Toxicol*. 66:183-195; 2004.
- [26] TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Sparus aurata L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17h-estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. *Science of the total environment*. Portugal. 2005.
- [27] WESSEL, N.; ROUSSEAU, S.; CAISEY, X.; QUINIOU, F.; AKCHA, F. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic toxicology*. France, August. 2007
- [28] YAMAMOTO, F. Y. Efeitos do 17 A-etinilstradiol em *Geophagus brasiliensis* e expressão de vitelogenina como biomarcador de desregulação endócrina em peixes. *Dissertação de mestrado*, UFPR, Biologia celular e molecular. Curitiba, 2011.