

# Tópicos Especiais

## Estudos Avançados

Micropoluentes e Microplásticos no Ambiente

Aula - Bioensaios

Prof<sup>a</sup>. Daniele Maia Bila

PEAMB e DEAMB

# Sumário

→ **Bioensaios**

— *In vitro* e *in vivo*

✓ **Mecanismos de ação**

✓ **Mais usados**

## MICROPOLUENTES, PRESENÇA E EFEITO NO AMBIENTE

- ✓ Micropoluentes são ativos em concentrações que não são detectáveis por algumas análises químicas. Ex os estrogênios
- ✓ Apesar dos avanços, nem todos os métodos analíticos são sensíveis o suficiente para monitorar alguns micropoluentes em baixíssimas concentrações, além de não avaliar o efeito de mistura
- ✓ Bioensaios complementam a análise química, detectam o efeito global de misturas complexas
- ✓ Bioensaios detectam efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos dos micropoluentes
- ✓ Bioensaio com diferentes mecanismos de ação
- ✓ Um dos efeitos mais estudados é a estrogenicidade ou atividade estrogênica
- ✓ Bioensaios detectam os efeitos estrogênicos de outros EDC que não apenas os estrogênios na água

## MÉTODOS BASEADOS EM EFEITOS OU BIOENSAIOS

# Alguns tópicos importantes - Bioensaios

- ✓ Criação, desenvolvimento, validação e utilização
- ✓ Aplicabilidade em amostras ambientais - limitações e interferências (efeito matriz)
- ✓ Mecanismo de ação e *end point*
- ✓ Usados como triagem para diversas matrizes ambientais

# Aplicabilidade em amostras ambientais

Os bioensaios podem quantificar os efeitos biológicos de uma substância química ou uma mistura e são usados para quantificar efeitos tóxicos há décadas.

- ✓ Desvantagens metodológicas podem levar a resultados falsos negativos/positivos
- ✓ Capacidade de respostas rápidas e adaptável ao meio (amostras complexas)
- ✓ Menos oneroso
- ✓ Diferenças da composição química das amostras
- ✓ Diferenças biológicas entre os ensaios
- ✓ Conjunto de bioensaios (*in vitro* e *in vivo*) com características metodológicas e biológicas diferentes devem ser aplicados de acordo com condições específicas de cada amostra.

✓ Por razões técnicas e econômicas, não é possível analisar todas as substâncias químicas presentes em uma matriz

SUBSTÂNCIAS PRIORITÁRIAS – as legislações, normalmente, estabelecem apenas concentrações limites seguras para cada substância e para um grupo de substâncias conhecidas

A avaliação da qualidade da água ou de efluentes tem se concentrado em análises químicas da concentração de micropoluentes e em menor escala na quantificação de seus efeitos de mistura por bioensaios

✓ Efeitos de mistura

— Em matrizes complexas, ocorre a interação entre as substâncias, resultando em efeitos combinados  
- Efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos

Efeitos deletérios que uma substância causa nos organismos mesmo que suas concentrações isoladas sejam muito baixas

## COMBINAÇÃO DAS ANÁLISES QUÍMICAS COM OS BIOENSAIOS

# Efeito de misturas de substâncias químicas

Desafio para entender a resposta do bioensaio

**Realidade das matrizes ambientais:** a coocorrência de diversos DE em uma mesma amostra, com variedade de estrutura química e concentrações

Possibilidade da existência de sinergismos ou antagonismos ou efeito aditivo entre as substâncias

Micropoluentes causam efeitos deletérios em baixíssimas concentrações



Padrões de qualidade ambiental propostos são muito baixos



Os LQ seguros dos métodos analíticos químicos disponíveis, algumas vezes, não são suficientes para monitorar matrizes ambientais complexas onde há a presença de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos em maiores concentrações do que os micropoluentes

LQ – limite de quantificação

Estudos mostram que o EE2 induz a produção de VTG em peixes machos de 0,1 a 0,5 ng L<sup>-1</sup> (Purdom et al. 1994))

VTG - vitelogenina

Na EU, em 2021, foi proposta a inclusão dos estrogênios E2 e 17 $\alpha$ -etinilestradiol com valores máximos permitidos em águas superficiais de 0,4ng/L e 0,035ng/L, respectivamente

Métodos analíticos sensíveis (LQ adequado) e seguro que possam ser amplamente usados no monitoramento ambiental

Influência do efeito matriz

**ALGUNS BIOENSAIOS DETERMINAM O EFEITO EM ng/L OU pg/L**

# Bioensaio

- ✓ Tem sido usados para avaliar:
  - substâncias isoladas (por muitos anos)
  - Misturas de substâncias (mais recentemente)
  - Amostras ambientais (diferentes matrizes)
- ✓ Uso de conjunto de bioensaio com mecanismos de ação diferentes, níveis tróficos, *in vitro* e *in vivo*
- ✓ Podem ser usados para:
  - complementar a análise química
  - triagem (screening) visando a escolha de amostras com potencial para análise química
  - quando os métodos químicos não atingem os LD exigidos
- ✓ Mais empregados são para determinar o efeito de desregulação endócrina

**ESTUDOS TEM AVALIADO O DESEMPENHO DOS BIOENSAIOS, OS DIFERENTES MECANISMOS DE AÇÃO, A APLICABILIDADE NAS DIVERSAS MATRIZES AMBIENTAIS, LIMITES SEGUROS DE DETECÇÃO**

# Vantagens

Células são resistentes a variações de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, contaminantes ambientais (metais pesados e endotoxinas bacterianas).

Menores custos financeiros

Evita questões éticas relacionadas ao uso de animais experimentais

Resultados em menor tempo

Não negligencia substâncias desconhecidas com o mesmo mecanismos de ação do ensaio, além de determinar efeitos de combinação de substância em uma mistura

O limite de detecção muitas vezes é mais baixo que muitos métodos cromatográficos

# Desvantagens

Nem sempre preveem os efeitos que podem ser observados nos ensaios *in vivo*, pois estes permitem a análise de efeitos provenientes de múltiplos mecanismos, como biodisponibilidade, metabolismo e *crosstalk* entre via genômica e não genômica.

*crosstalk* – um ou mais componentes de uma via de sinal afetam outra

Giselle Gomes, 2020

## Bioensaios *in vitro* (Células e receptores)

✓ Determinação de estrogénicidade com base em células humanas e de levedura

✓ Expressam o receptor de estrogênio humano (hER):

### — Levedura

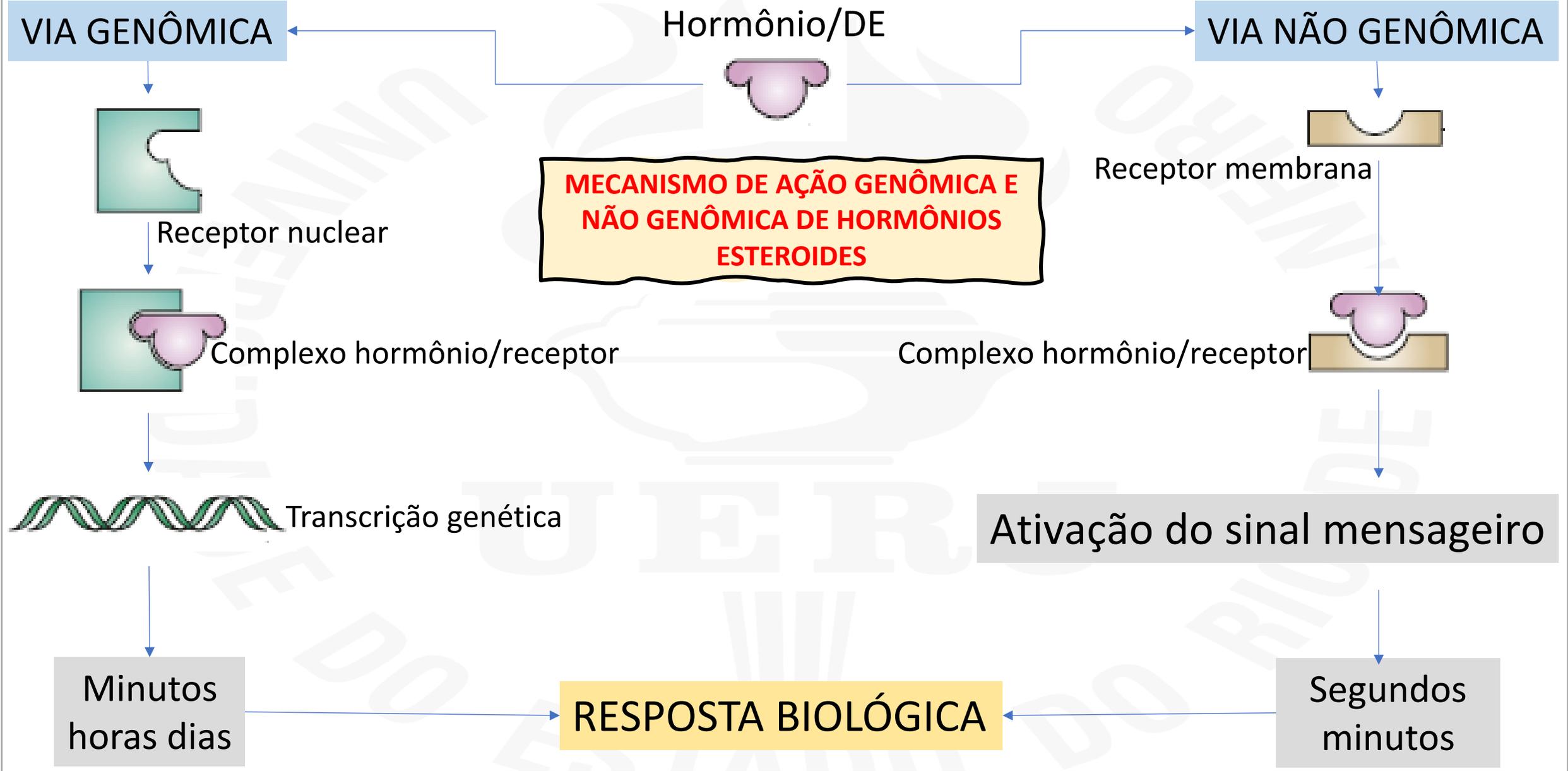
- Yeast Estrogen Screen (YES)
- Lyticase-based Yeast Estrogen Screen (LYES)
- ensaio do receptor de estrogênio de ligação ao ligante (LiBERA)
- Blyes - leveduras luminescentes

### — Células humanas

- ER $\alpha$ -CALUX (as células U2OS (osteossarcoma ósseo humano))
- Células hER $\alpha$ -HeLa-9903
- Células MELN - A linha de células MELN foi obtida por transfecção estável de células de câncer de mama humano MCF-7

## Bioensaios *in vivo* (Organismos inteiro)

✓ Com peixes de diferentes espécies é o bioensaio mais empregado



Giselle Gomes, 2020

Adaptado de Norman Norman, A.W., Mizwicki, M.T., Norman, D.P.G., 2004. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. <https://doi.org/10.1038/nrd1283>

# Bioensaio

Largamente utilizado →  
monitoramento da **ATIVIDADE  
ESTROGÊNICA** de amostras ambientais



Fornecem o resultado de uma mistura de compostos estrogênicos, mas expressam o resultado em equivalente de um estrogênio natural (E2) ou sintético (EE2) – EQE ou EEQ ou EQ-E2

EQE ou EEQ ou EQ-E2 – Equivalente estradiol

Relações concentração-resposta e uma série de diluição das amostras ou extratos ou substâncias



Curva dose-resposta (curva sigmoidal)

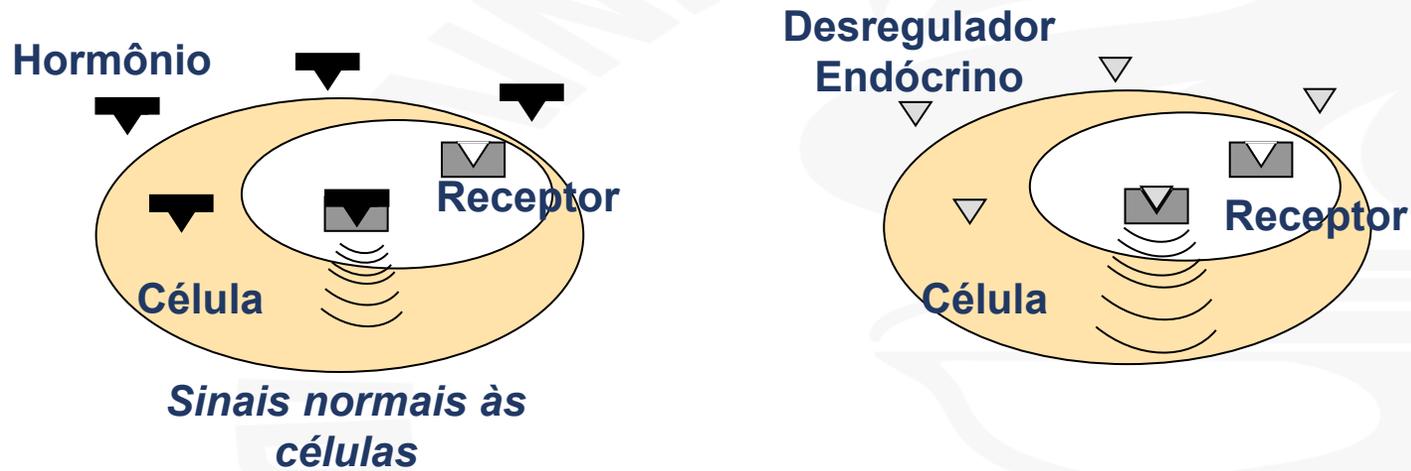


**Concentrações de equivalência biológica (BEQ)**

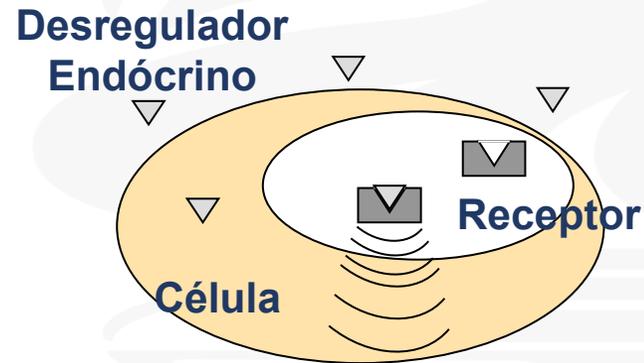
\*Bioequivalência

**Mais empregados: RESPOSTA DE LIGAÇÃO A RECEPTORES HORMONAIS ESPECÍFICOS EM LEVEDURAS TRANSGÊNICAS**

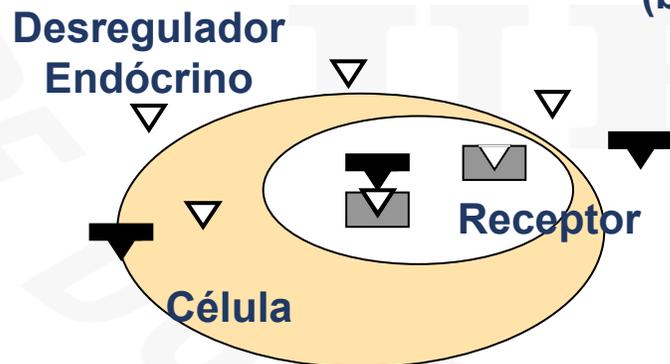
# Mecanismos de Ação de um Xenoestrogênio



(a)



(b)



*Bloqueios dos sinais normais às células*

(c)

**EFEITO AGONISTA** = DE atua mimetizando um hormônio natural, produzindo uma resposta diferente da natural.

**EFEITO ANTAGONISTA** = DE atua como um bloqueador, inibindo a resposta natural.

(a) Resposta natural,

(b) Efeito agonista e

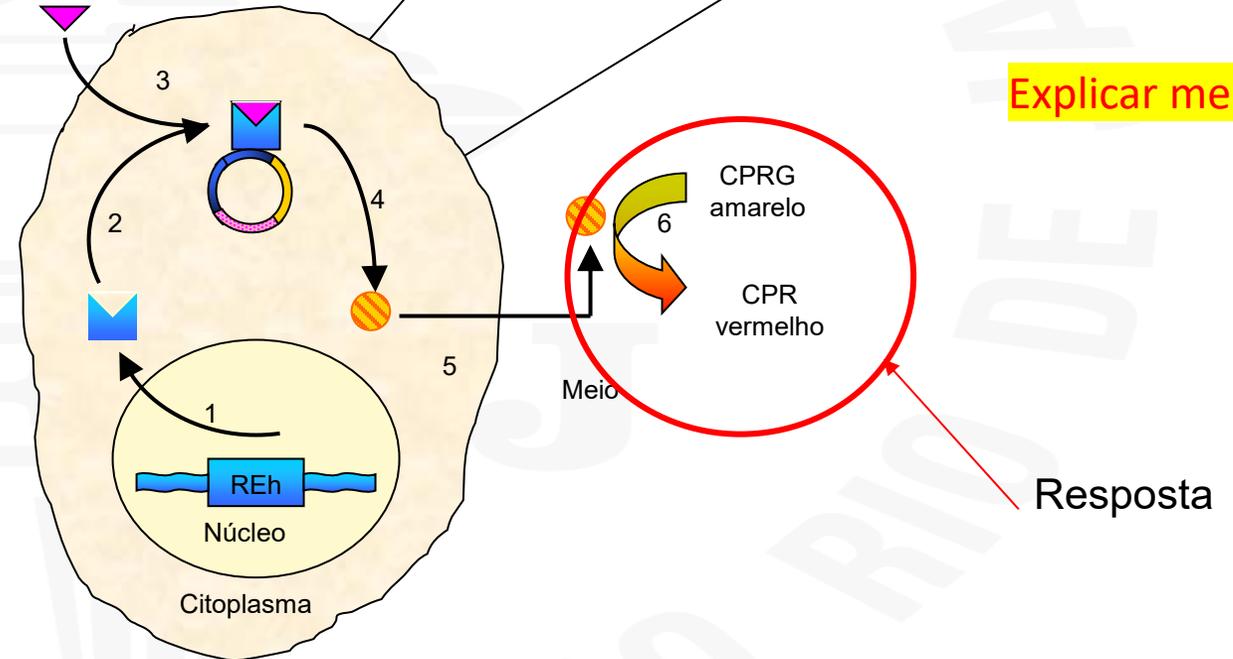
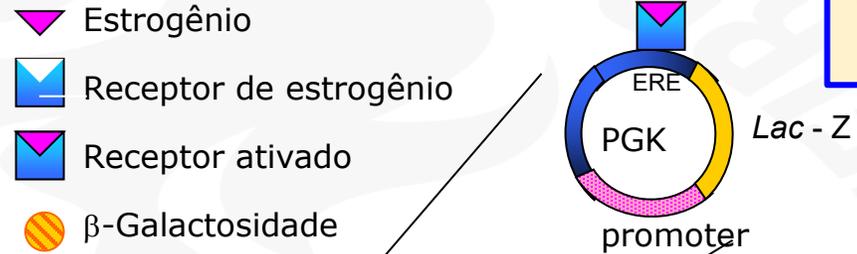
(c) Efeito antagonista.

# Ensaio *in vitro* YES

- 1 - ao genoma da *Saccharomyces cerevisiae* foram integrados o gene do receptor de estrogênio humano (REh) e um plasmídio de expressão com o gene reporter lac-z
- 2 - a ligação do receptor de estrogênio humano (REh) a um composto estrogênico causa a expressão do gene reporter lac-z
- 3 - o gene reporter lac-z codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase, que converte o corante amarelo CPRG num produto vermelho que absorve a 575 nm

## YES - YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY

### Símbolos



Ensaio de ativação transcrricional do Receptor de estrogênio humano (REh)

Explicar melhor

ESQUEMA DO SISTEMA DE EXPRESSÃO ESTROGÊNIO-INDUZÍVEL NA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

(ROUDLEDGE AND SUMPTER, 1996)

# ENSAIO YES: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

**Diluição serial das amostras**



Transferência para a  
placa do teste



Adição do meio de análise

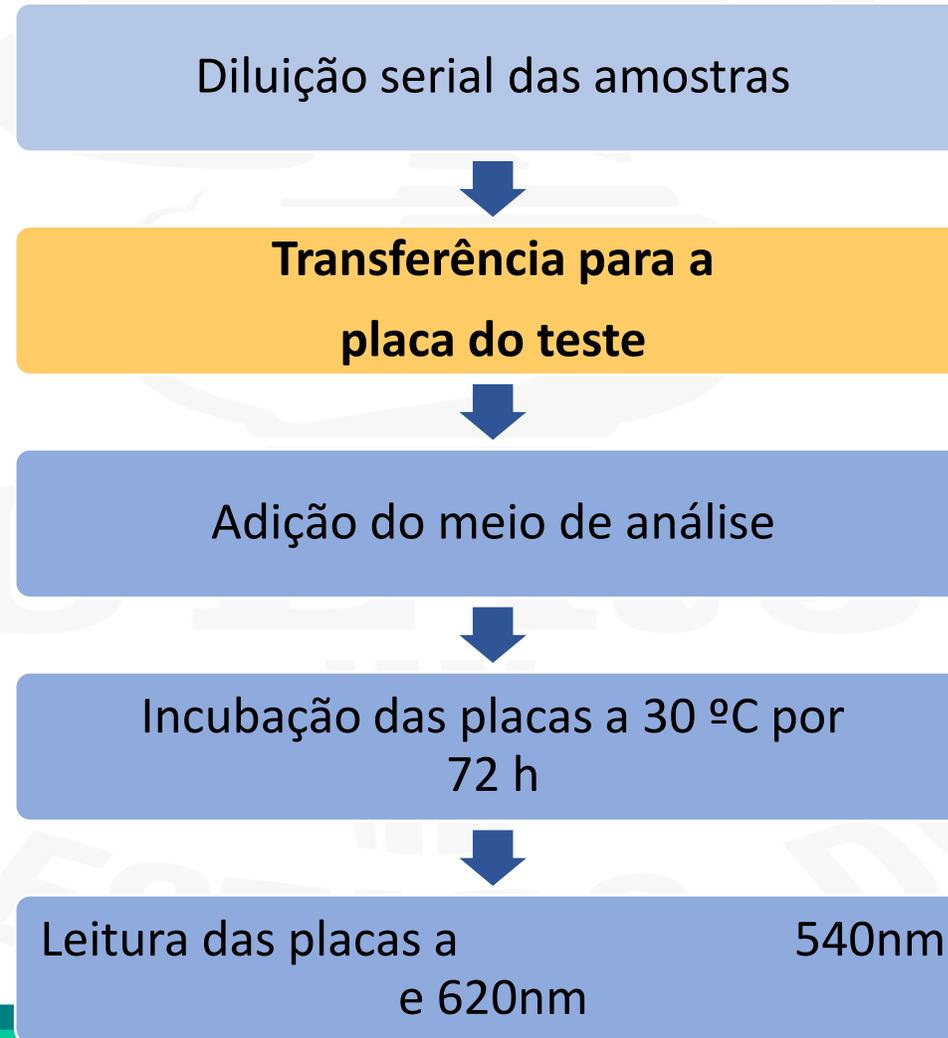


Incubação das placas a 30 °C por  
72 h

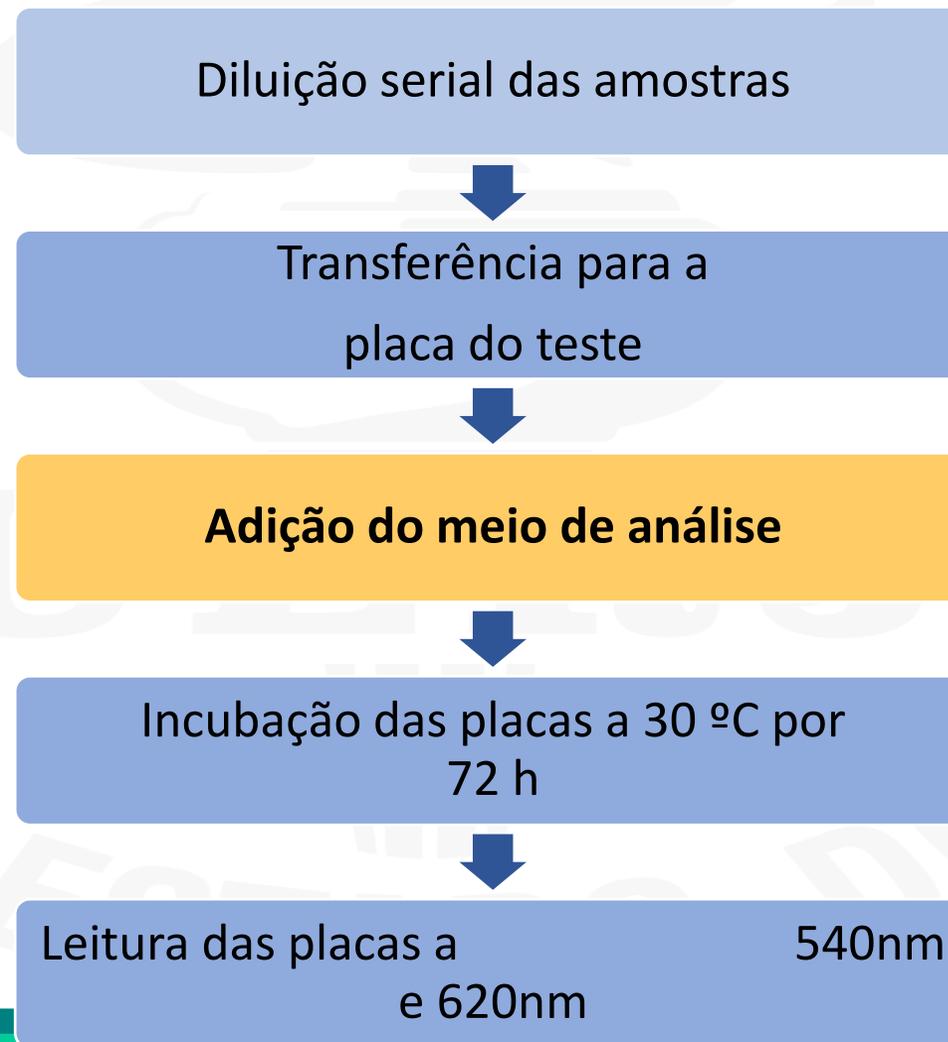


Leitura das placas a 540nm  
e 620nm

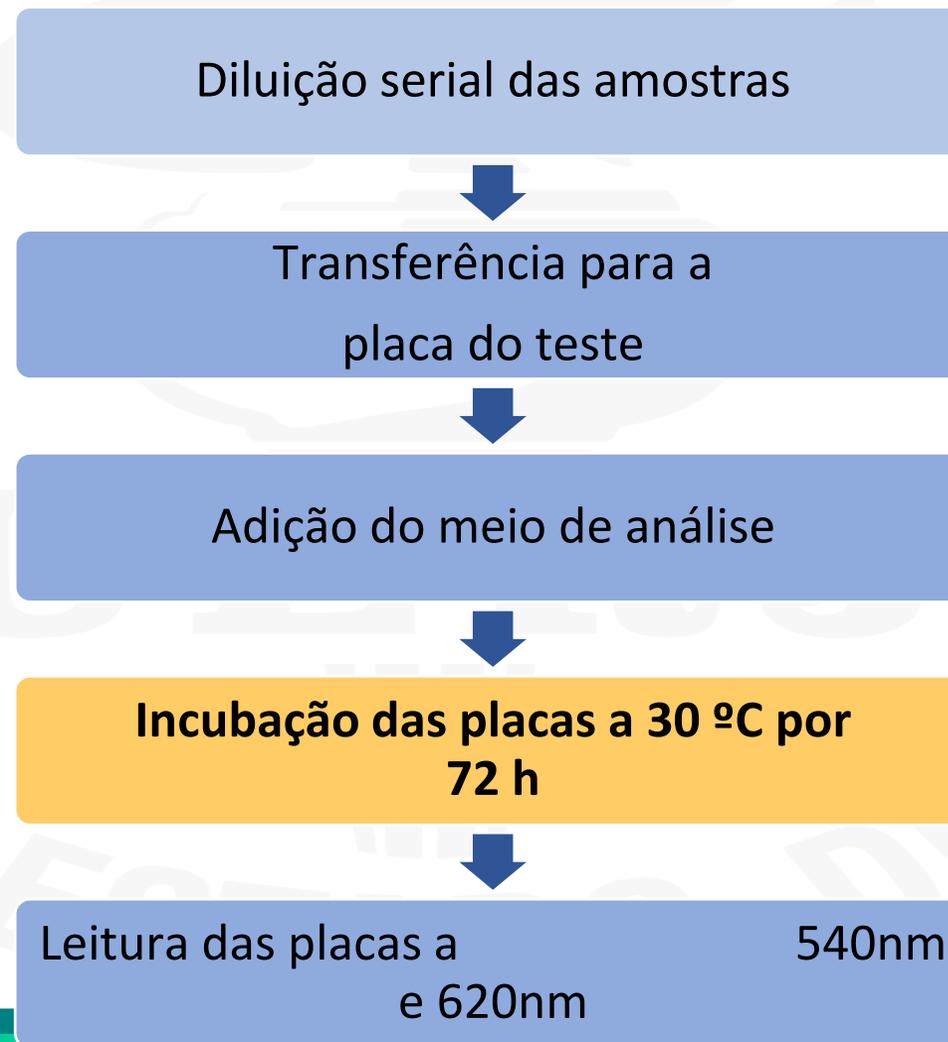
# ENSAIO YES: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



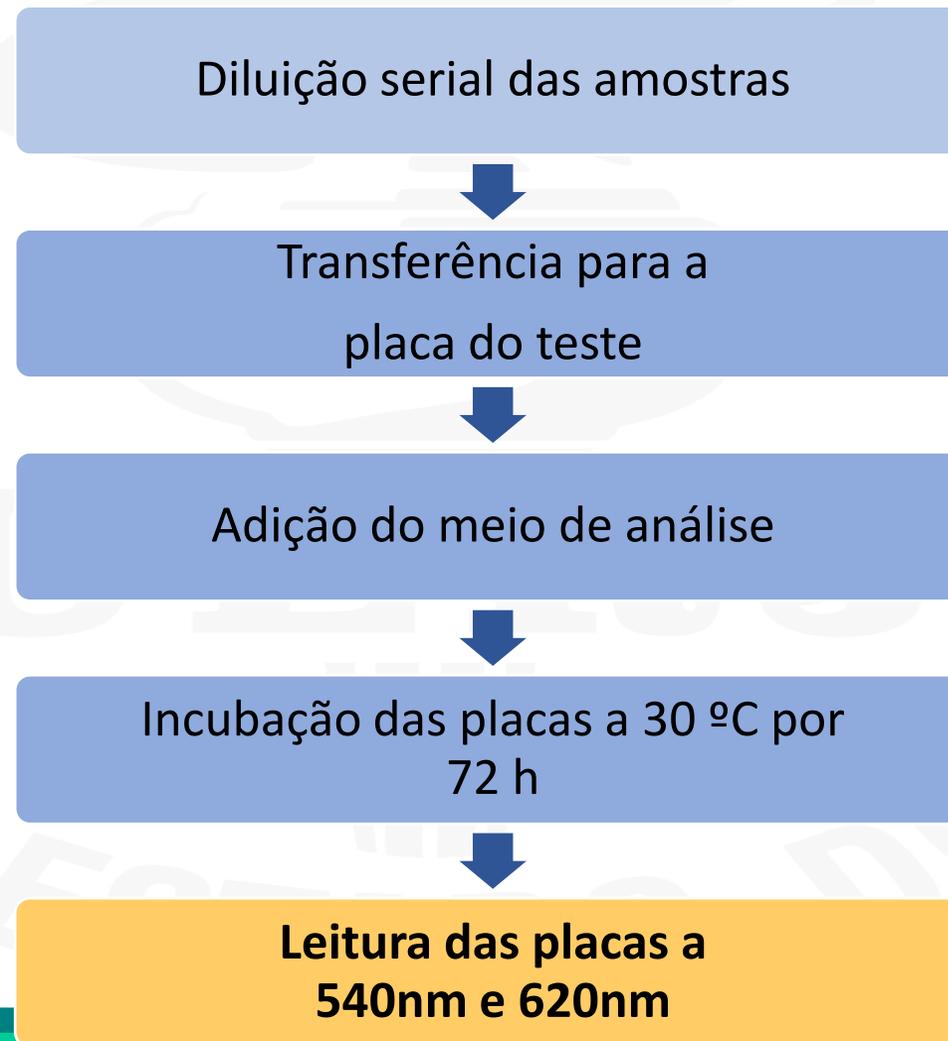
# ENSAIO YES: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



# ENSAIO YES: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



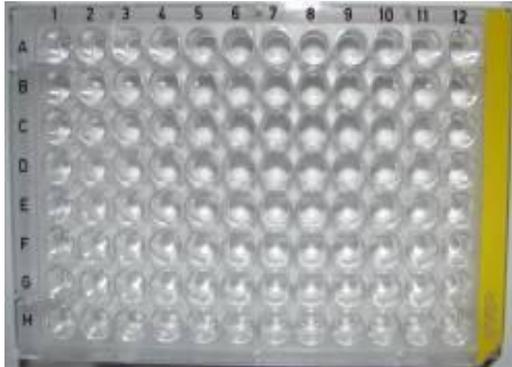
# ENSAIO YES: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



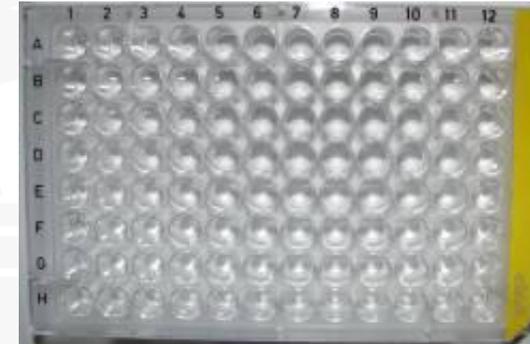
# Etapas do ensaio YES

Routledge e Sumpter (1996)

Placa de Diluição



Placa Ensaio



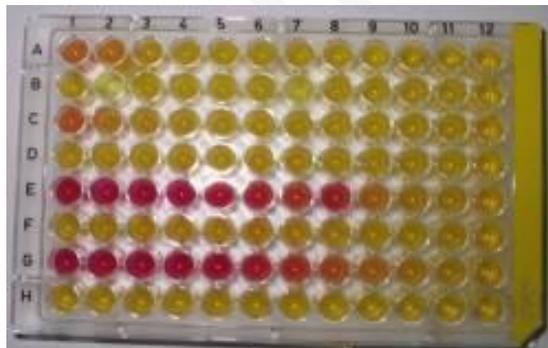
Transferência de 10  $\mu$ l de cada poço da placa de diluição para cada poço da placa de ensaio



Adição de 200  $\mu$ l de meio de análise em cada poço da placa de ensaio



Leitura das placas nos comprimentos de onda de 575 nm (cor) e 620 nm (turbidez)



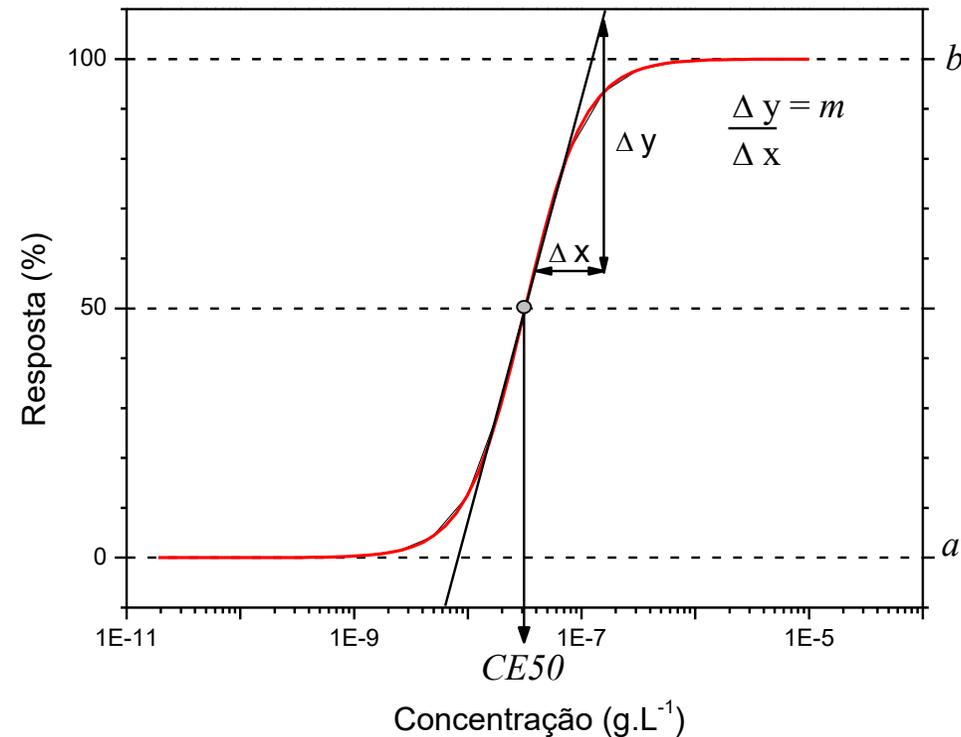
Incubadora a 30°C  
por 72 h



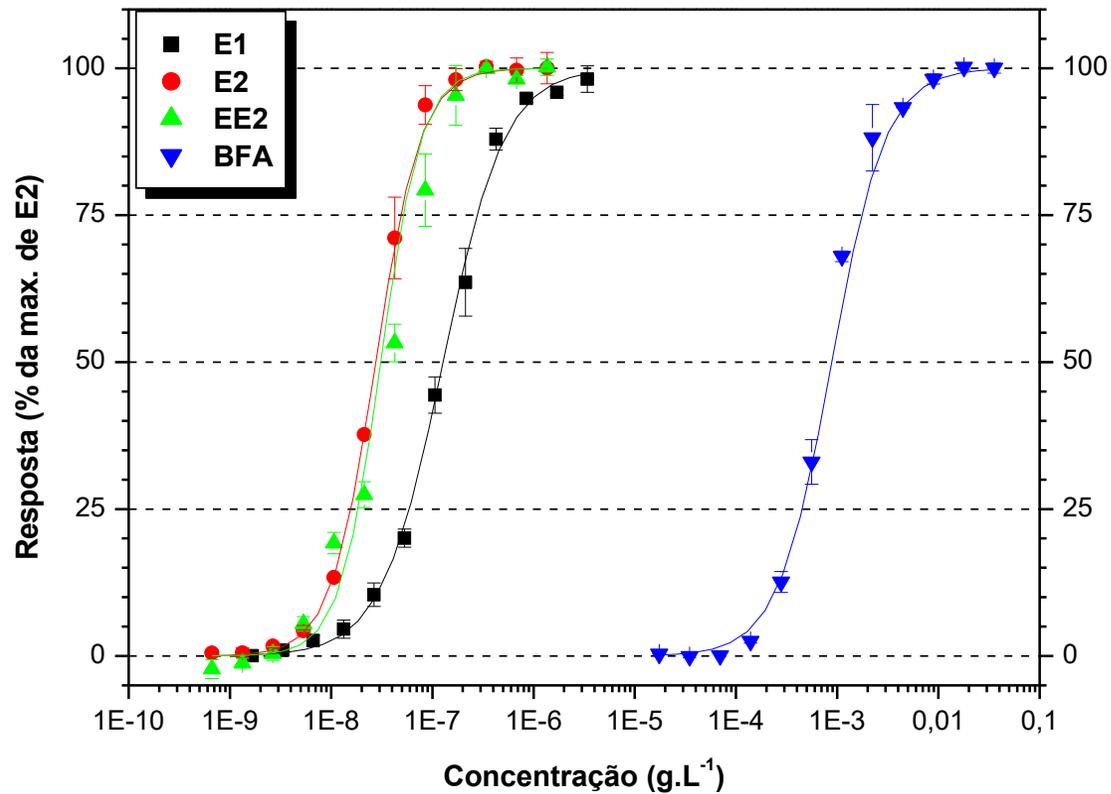
# ANÁLISE DOS DADOS ENSAIO YES

- ✓ RESPOSTA = porcentagem da resposta máxima obtida na curva de E2

$$\text{Resposta} = \frac{a - b}{1 + \left(\frac{c}{\text{CE50}}\right)^m} + b$$



# RESULTADOS - ENSAIO YES



E1 = Estrona

E2 = Estradiol

EE2 = Etilnilestradiol

BFA = Bisfenol

## POTÊNCIA RELATIVA

$$PR = \frac{CE50_{(17\beta\text{-estradiol})}}{CE50_{(subst\ancia)}}$$

Composto	PR
17 $\beta$ -estradiol (E2)	1
17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)	1.25
Estrona (E1)	0.39
Estriol (E3)	5.28E-03
Bisfenol-A (BPA)	7.31E-04

# Avanços nas últimas décadas na área.....

Várias metodologias foram desenvolvidas por organizações internacionais (OCDE - Organisation for Economic Co-operation and Development) e países (EUA, EU e Japão) para rastrear e detectar EDCs, principalmente em matrizes aquáticas

Uma das principais metodologias utilizadas para analisar os DE está baseada em bioensaios para detectar os efeitos adversos no sistema endócrino.

Uma das principais metodologias utilizadas para analisar os DE está baseada em bioensaios para detectar os efeitos adversos no sistema endócrino.

Têm sido usada uma combinação de bioensaios *in vitro* e *in vivo* de curto prazo abrangendo mamíferos e não mamíferos projetados para capturar as vias de estrogênio (E), andrógeno (A), hormônio da tireoide (T) e esteroidogênese\* (S) (EATS).

\*processo de produção de hormonas esteroides

# Avanços nas últimas décadas na área.....

Apesar dos bioensaio disponíveis determinarem misturas de DE, esses são projetados para identificar ou rastrear os potenciais DE em uma base química individual. Assim, ainda é necessário um avanço nas estratégias para avaliar misturas ambientalmente relevantes que reflitam com mais precisão os efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos quanto a exposição humana e de outros animais.

Misturas de substâncias químicas, tais como se encontram em amostras ambientais, podem produzir efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos que não seriam medidos em bioensaios com substâncias isoladas ou por análises químicas.

Além disso, devido à complexidade das inúmeras interações potenciais de múltiplos desreguladores endócrinos (DE) tanto nos bioensaios in vitro quanto nos in vivo, a escolha entre os bioensaios precisa ser criteriosa e a extrapolação dos resultados deve ser cuidadosamente estudada. Essas considerações são importantes ao selecionar bioensaios para estimar os riscos de efeitos adversos de misturas na biota

# Programas da EPA - USA

## ✓ Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP), criado para:

- ▶ Coletar informações necessárias para identificar as substâncias químicas com potencial de desregulação endócrina.
- ▶ Desenvolver, aperfeiçoar e validar os ensaios para reduzir ou substituir o uso animais.
- ▶ **Em relação sistema hormonal estrogênio, androgenio e da tireóide.**
- Utilizar os ensaios num processo de “screening” em dois níveis:
  - ❖ Nivel 1: Identificar substâncias químicas que possuem o potencial para interagir com o sistema endócrino.
  - ❖ Nivel 2: Determinar os efeitos no sistema endócrino causadas por cada substância química e obter informações sobre os efeitos em diferentes doses.

<https://www.epa.gov/endocrine-disruption>

# PROGRAMAS DA EPA - USA

## ✓ Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)

- Etapa 1- Definir uma lista com 67 produtos químicos prioritários para avaliar o potencial de desregulação endócrina.
- Etapa 2 - Nível 1.
- Etapa 3 – Nível 2.
- Para cada ensaio, tem-se as etapas:
  - Desenvolvimento do método,
  - Pré-validação,
  - Validação,
- Ensaio utilizados:
  - Metamorfose de anfíbios, ligação ao receptor de andrógeno, Aromatase (recombinante), Ligação ao receptor de estrogênio, ensaio com peixe (peixe com reprodução de curto prazo), teste de HERSHBERGER, desenvolvimento puberal masculino e feminino (ratos), Esteroidogênese (testículos), Esteroidogênese (célula H295R), uterotrófico, ensaio com rato macho adulto, ensaio com aves, ciclo de vida de peixe e invertebrados, mamíferos, dentro do útero, na lactação, no desmame e puberdade.
  - Aromatase: pertence ao grupo das enzimas do citocromo p450
  - teste de HERSHBERGER ratos pré-púberes machos castrados

<https://www.epa.gov/endocrine-disruption>

# PROGRAMAS DA EPA - USA

## ✓ Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)

- uso de novas metodologias/tecnologias que aceleram a triagem de substâncias sobre o conhecimento de seu potencial de interferir o sistema endócrino em seres humanos e animais, bem como reduzir o uso de animais na pesquisa.
- Mais rápido, menos oneroso do que metodologias convencionais
- O **TOX21 (pesquisa toxicologia computacional)** identifica de forma confiável o potencial de substâncias químicas que mimetizam o estrogênio natural. O método fornece uma alternativa a testes correntes de triagem.
- O **TOX21** usa modelos adicionais para prever as atividade andrógena e de tiroide, que irá fornecer alternativas para os outros testes.
- Reduz a necessidade de ensaios em animais, porque os testes seriam baseados em **células humanas e componentes celulares**.
- Sistema mais eficiente, informativo e menos onerosa para a avaliação dos riscos provocados por substâncias químicas.

<https://www.epa.gov/endocrine-disruption>

# Referências

- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. *Quimica Nova*, 30(3), 651–666.
- Birkett, J. W., & Lester, J. N. (2003). *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process* (1st ed.). CRC Press LLC.
- Cunha, D. L., Murito de Paula, L., Muylaert, S. C. S, Bila, D. M., Fonseca, E., F., Oliveira, J. L. M. (2017) Ocorrência e remoção de estrogênios por processos de tratamento biológico de esgotos *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, vol. 12 (2), 249-262.
- CUNHA, D. L. ; SILVA, S. M. C. ; Bila, Daniele Maia ; OLIVEIRA, J. L. M. ; LARENTIS, A. L. ; SARCINELLI, P. N. . Regulamentação do estrogênio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol em matrizes aquáticas na Europa, Estados Unidos e Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 32, p. 1-12, 2016.
- Bila, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia . Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 26, n.4, p. 523-530, 2003.
- Norman, A.W., Mizwicki, M.T., Norman, D.P.G., 2004. STEROID-HORMONE RAPID ACTIONS , MEMBRANE RECEPTORS AND A CON- FORMATIONAL ENSEMBLE MODEL. <https://doi.org/10.1038/nrd1283>
- Giselle Gomes Moreira da Silva. Avaliação dos fatores de interferência no ensaio in vitro Yeast Estrogen Screen (YES) para análise de estrogenicidade em amostras ambientais, compostos orgânicos e misturas. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental - Universidade do Estado do Rio de Janeiro)
- Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler and J.P. Sumpter. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8: 275–285. Doi:10.1080/02757549408038554
- <https://www.epa.gov/endocrine-disruption>