

**Universidade estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Medicina de Botucatu**



Carolina Vaccari

***ATIVIDADE IN VIVO DO POTENCIAL ESTROGÊNICO DE AMOSTRA  
DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO PRODUZIDA POR ESTAÇÃO DE  
TRATAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO***

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP– Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**Botucatu**

**2013**

**Carolina Vaccari**

***ATIVIDADE IN VIVO DO POTENCIAL ESTROGÊNICO DE AMOSTRA  
DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO PRODUZIDA POR ESTAÇÃO DE  
TRATAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO***

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP– Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Dr. João Lauro Viana de Camargo

Pesquisadora Associada: Ma. Marize de Lourdes Marzo Solano

**Botucatu**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Vaccari, Carolina.

Avaliação in vivo do potencial estrogênico de amostra de água para consumo humano produzida por estação de tratamento do estado de São Paulo / Carolina Vaccari. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Capes: 40105008

1. Água - Qualidade. 2. Água - Análise. 3. Desreguladores endócrinos. 4.  
Expressão gênica. 5. Toxicologia.

Palavras-chave: Água de beber; Contaminantes emergentes; Ensaio uterotrófico;  
Interferentes endócrinos.

## *Agradecimentos*

A todos do laboratório TOXICAM por terem me acolhido e me mostrado um caminho a seguir quando eu mais me senti perdida. Sou grata por todos os ensinamentos, risadas, ajuda e acima de tudo respeito e amizade. Tenho orgulho de dizer que fiz parte desse time.

Ao meu orientador Dr. João Lauro por toda experiência e conhecimento passado e à Marize, que se mostrou mais que uma professora, me ajudando sempre. Obrigada por todas as dicas, puxões de orelha, conselhos e pela paciência quando eu colocava os pés pelas mãos.

Sou grata a todos os gigantes que fizeram este trabalho acontecer: a FAPESP, pela bolsa de iniciação científica; Cassiana Montagner e Prof. Wilson Jardim do Laboratório de Química Ambiental da UNICAMP, Campinas; Daniela França e Gilson A. Quinaglia da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB); Profa. Janete Franci e Ruither Carolino da Faculdade de Medicina de Riberão Preto (USP); João Luvizutto da Faculdade de Medicina de Botucatu e Profa. Gisela Umbuzeiro da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP, Limeira.

Aos meus amigos, os verdadeiros, que sempre estiveram ao meu lado, nos melhores e piores momentos, me ajudando a levantar e juntar os cacos depois dos (muitos) tombos pelo caminho.

E finalmente, à minha família por todo o apoio e por terem acreditado em mim, quando nem eu mesma acreditava. Obrigada por me amarem acima de tudo e terem me preparado para bater as asas e enfrentar a vida lá fora, lutando com força e cabeça erguida, sempre.

É hora de voar.

## RESUMO

VACCARI, C; **ATIVIDADE IN VIVO DO POTENCIAL ESTROGÊNICO DE AMOSTRA DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO PRODUZIDA POR ESTAÇÃO DE TRATAMENTO ESPECÍFICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Tese (Monografia)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP, 2013.**

Introdução: O lançamento de esgoto *in natura* em rios e lagos têm chamado a atenção para uma questão importante nos dias de hoje: a qualidade da água. Substâncias com atividade estrogênica (xenoestrógenos) são os interferentes endócrinos mais conhecidos, e estes, bem como outros compostos, podem permanecer na água mesmo após tratamento convencional.

Objetivo: Este estudo investigou o potencial estrogênico de uma amostra de água proveniente de uma estação de tratamento do estado de São Paulo, utilizando um bioensaio padronizado: o ensaio uterotrófico (OECD; nº440), suplementado pela avaliação da cornificação vaginal.

Materiais e métodos: A água para consumo distribuída para a população foi coletada e concentrada utilizando-se um filtro em forma de cartucho capaz de reter substâncias orgânicas. Os extratos de água foram investigados quimicamente quanto à presença de contaminantes emergentes e também avaliados *in vitro* por um bioensaio com leveduras luminiscentes contendo receptores de estrógeno e andrógeno humanos (BLYES, BLYAS). O ensaio *in vivo* foi conduzido com ratas fêmeas Wistar, com 21 dias de vida, expostas via gavagem, aos extratos de água nas diferentes doses de 33,3; 166,65 e 330 ml/ kg por peso corpóreo, sendo equivalentes à ingestão diária de 2L, 5L e 10 L de água por um ser humano de 60 kg. Resultados: Concentrações de cafeína (0,056 ug/L), atrazina (0,081 ng/L), imidacloprida (0,88 ng/L) e fungicidas como carbendazim (0,22 ng/L), azoxistrubina (0,23 ng/L) e tebuconazol (0,19 ng/L) foram detectados no extrato de água por LC-MS/MS. Essas substâncias são contaminantes emergentes e potenciais interferentes endócrinos. As atividades estrogênicas e androgênicas do extrato de água foram negativas pelo bioensaio com leveduras luminiscentes (BLYES, BLYAS). O ensaio *in vivo* também foi negativo: não houve aumento significativo no peso do útero no ensaio uterotrófico, bem como nenhuma alteração histológica no útero ou no epitélio vaginal. Os níveis séricos de 17- $\beta$ estradiol, testosterona, FSH e LH não foram significativamente alterados pelo tratamento neste estudo. Também não houve alteração na expressão gênica do HOXA 10 e dos receptores de estrógeno (ER- $\alpha$ ) e progesterona no útero. Conclusão: Nosso estudo *in vivo* sugere que a amostra de água testada não exerce atividade estrogênica, o que pôde ser corroborado pelos dados do ensaio com leveduras luminiscentes *in vitro*.

**Palavras chave:** ensaio uterotrófico; água de beber; interferência endócrina; contaminantes emergentes.

## ABSTRACT

VACCARI, C. **IN VIVO ACTIVITY OF THE ESTROGENIC POTENTIAL OF A WATER SAMPLE FOR HUMAN CONSUMPTION PRODUCED BY A SPECIFIC WATER TREATMENT PLANT OF SAO PAULO STATE. Thesis (Monography) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP, 2013.**

Introduction: The release of raw sewage into rivers and lakes has drawn attention to an important issue nowadays: the water quality. Substances with estrogenic activity (xenoestrogens) are the best known endocrine disruptors, and these, as well as other chemical substances, may remain in the water even after the conventional treatment. Objective: This study investigated the estrogenic potential of a drinking water sample from a Sao Paulo State Water Treatment Plant, using a standardized bioassay: the uterotrophic assay (OECD; n° 440), supplemented by the vaginal cornification evaluation. Materials and methods: The drinking water distributed to the population was collected and concentrated as an extract using a cartridge filter for organic substances. Water extracts were chemically evaluated for emerging contaminants and also *in vitro* by a bioluminescent yeast assay with estrogen/androgen human receptors (BLYES, BLYAS). *In vivo* assay was conducted with female 21- day old Wistar rats that were exposed by gavage to drinking water extracts during 03 days at doses of 33.3, 166.5, and 333.0 mL equivalent of water/kg body weight, modeling a daily ingestion of 2 L, 5 L and 10 L of drinking water by a 60 kg human being. Results: Traces of caffeine (21 µg/L), atrazine (2.2 ng/L), imidacloprid (0.88 ng/L) and fungicides like carbendazim (0.22 ng/L), azoxystrobin (0.23 ng/L) and tebuconazole (0.19 ng/L) were detected in the water extract by LC-MS/MS. These substances are emerging contaminants and potential endocrine disruptors. Androgen or estrogen agonistic extract activities resulted negative by the bioluminescent yeast assay (BLYAS, BLYES). Accordingly, the *in vivo* assay was negative: there was no significant increase of the uterus wet weight in the uterotrophic assay and no histological alterations in the uterus nor vaginal epithelium. Serum levels of 17-βestradiol, FSH, LH and testosterone were not significantly influenced by treatment in this assay. There was also no alteration on gene expression of HOXA 10 and the receptors of estrogen (ER-α) and progesterone in the uterus. Conclusion: Our *in vivo* study suggests that the water sample tested didn't exert an estrogenic activity, which corroborates with the bioluminescent yeast assay (BLYES/BLYAS) *in vitro*.

**Keywords:** uterotrophic assay; drinking water; endocrine disruption; emerging contaminants.

## **SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	2
3. JUSTIFICATIVA .....	2
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	4
4.1 Amostragem .....	4
4.1.1 Coleta e caracterização do ponto amostral .....	4
4.1.2 Extração e pré- concentração das amostras .....	5
4.2 Análise química da água de beber .....	6
4.3 Bioensaio com leveduras luminescentes .....	6
4.3.1 Amostras .....	6
4.3.2 Protocolo de ensaio e análise dos resultados .....	6
4.4 Experimentação animal .....	7
4.4.1 Animais e ambiente de experimentação .....	7
4.4.2 Delineamento experimental .....	8
4.4.3 Eutanásia e Dosagens Hormonais .....	10
4.4.4 Processamento histológico .....	10
4.4.5 Análise morfométrica do útero .....	10
4.4.6 Avaliação da cornificação vaginal .....	11
4.4.7 qRT PCR em tempo real .....	11
4.4.8 Análise estatística .....	12
5. RESULTADOS .....	12
5.1 Análise química da amostra de água e Bioensaio com levedura luminescente .....	12
5.2 Experimentação animal .....	14
5.2.1 Mortalidade .....	14
5.2.2 Sintomas clínicos .....	14
5.2.3 Consumo de ração (Tabela 2) .....	14
5.2.4 Consumo de água destilada (Tabela 2) .....	14
5.2.5 Peso corpóreo (Tabela 3) .....	15
5.2.6 Peso de órgãos (Tabelas 4, 5 e 6) .....	17
5.2.7 Análise histológica e morfométrica do útero .....	21
5.2.8 Dosagens hormonais .....	22
5.2.9 qRT PCR .....	25
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	29

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
------------------------------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das questões mais importantes a serem discutidas é a qualidade da água. Esta é prejudicada pelo crescimento populacional desordenado, lançamento de esgoto doméstico não tratado em rios, falta de tratamento apropriado em estações de água, intenso uso de agrotóxicos nas lavouras e de outros poluentes (CETESB, 1999; 2007).

Várias são as substâncias que provocam efeitos adversos aos organismos, mesmo em baixas concentrações (BILA e DEZOTTI, 2007). Um exemplo delas são os denominados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPS), um grupo também variado de agentes químicos que apresentam ampla distribuição ambiental e resistência à degradação química e biológica, podendo permanecer no ambiente por muito tempo e ter efeito bioacumulativo (NOGUEIRA, 2003). Uma vez liberados na natureza, podem contaminar regiões distantes do seu local de origem ao atingir recursos hídricos, além de contaminar alimentos (MEYER *et al.*, 1999). A grande maioria dos POPS tem ação de interferência endócrina e, por isso, representam uma classe de especial interesse para este projeto, devido à sua capacidade de “interferir com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais, que são “responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (USEPA, 2007).

Os interferentes endócrinos (IE) são agentes individuais ou misturas, também encontrados na natureza, mas principalmente em agrotóxicos, alquilfenóis, ftalatos, bisfenol A, substâncias farmacêuticas, entre outros. “O lançamento de efluentes *in natura* ou mesmo processados são as principais vias de contaminação do ambiente aquático” (ERICKSON, 2002). Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta quando comparados a outros compostos orgânicos (como alguns pesticidas), os estrógenos naturais e sintéticos são continuamente liberados no ambiente, o que lhes confere caráter de persistência (JOHNSON e WILLIAMS, 2004).

Os IE mais conhecidos têm atividade estrogênica, sendo denominados xenoestrógenos. Embora seus efeitos não tenham sido ainda totalmente elucidados, há indícios de antecipação na idade da menarca (CASERTA *et al.*, 2008), diminuição na quantidade espermática em homens, e aumento da incidência de alguns cânceres (KOIFMAN *et al.*, 2002). Um caso emblemático ocorreu nas décadas de 40 a 70, quando a utilização em larga escala do hormônio sintético dietilestilbestrol (DES) por mulheres grávidas resultou no aumento significativo dos casos de câncer de vagina nas gerações descendentes (JANEX-HABIBI *et al.*, 2009).

Atualmente, as maiores preocupações são determinar exatamente quais são as substâncias que apresentam efeito de interferência endócrina no homem, se as quantidades encontradas desses interferentes no ambiente oferecem riscos e ainda se existiria um limite seguro para exposição a esses agentes. Assim, agências governamentais e transnacionais, como a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), a Agência Americana de Administração de Alimentos e Fármacos (USFDA) e a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), estão desenvolvendo ensaios *in vivo* e *in vitro* para identificar os agentes com potencial de interferência endócrina e testar seus efeitos sistêmicos no organismo (USEPA, 2007; OECD, 2007; USFDA, 2000).

No entanto, os ensaios disponíveis não conseguem abranger todos os efeitos. (CLODE, 2006; USEPA, 2007; OECD, 2007). Dentre os mais recomendados está o ensaio uterotrófico (OECD N°440), como um teste de triagem *in vivo* para detectar efeitos estrogênicos (OECD, 1999; 2007; BAKER, 2001). Ele consiste em quantificar modificações de peso e epitélio uterino em ratas imaturas ou ooforectomizadas após tratamento com a substância teste por período de 3-4 dias (ODUM et al., 1997; ASHBY et al., 1997; EDSTAC, 1998; ANDRADE et al., 2002). Também pode ser analisado o epitélio vaginal, para detectar mudanças dependentes da xenoexposição.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar em ratos fêmea pré-púberes da linhagem *Wistar* o potencial estrogênico de extrato concentrado de amostra de água para consumo humano de uma determinada Estação de Tratamento de Água do Estado de São Paulo.

## **3. JUSTIFICATIVA**

Embora o conhecimento sobre o papel dos IE no aparecimento de doenças, as relações dose-resposta e as metodologias utilizadas nos estudos ainda serem um desafio (USEPA, 1997), muitas são as evidências sobre efeitos adversos em diferentes espécies na natureza, principalmente no meio aquático. Esses efeitos podem variar desde súbitas mudanças na fisiologia e comportamento sexual, até alterações permanentes na diferenciação sexual. Há relatos de “diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, feminização de peixes machos e problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis e pássaros” (BILA e DEZOTTI, 2007).

Assim, fica clara a importância de estudos sobre a presença de IE em fontes como a água, pois é um risco real ao qual a população está exposta diariamente. Ainda são desconhecidos os níveis seguros de IE em água potável, sendo recomendável que estas substâncias sejam investigadas a fim de permitir ações preventivas para minimizar as fontes e os níveis de exposição. Portanto, o primeiro passo é verificar se a água tratada por cloroaminação e fornecida ao público exerce efeito estrogênico em sistemas mais complexos, como são os mamíferos.

Para isso, ratas fêmeas pré-púberes foram submetidas ao ensaio uterotrófico, nº440, proposto pela OECD, 2007. O ensaio uterotrófico é um teste de curta duração que se originou na década de 1930 e foi o primeiro padronizado para triagem de interferência endócrina por um comitê de especialistas em 1962. A partir de 1998, passou por extensas revisões, de modo que o protocolo nº 440, utilizado neste projeto, é resultado de diversos estudos de calibração e harmonização intra e interlaboratoriais que objetivaram estabelecer um ensaio para identificação de efeitos agonistas ou antagonistas estrogênicos, através de avaliações de aumento de peso uterino (OECD, 2007).

O útero responde com crescimento rápido e vigoroso à estimulação por estrógenos, principalmente em roedores de laboratório, sendo um órgão alvo para identificação *in vivo* de substâncias estrogênicas. Os efeitos predominantes são mediados por dois receptores nucleares (NR) distintos: receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) e beta ( $ER\beta$ ). Estes são membros de uma superfamília de receptores ligante-dependentes de fatores de transcrição (KLINGE, 2001). Após ligação e ativação do NR, ocorre ligação específica com elementos responsivos do DNA na cromatina nuclear. Há o recrutamento de uma variedade de cofatores que modificam a organização cromossomal. Estes então regulam a expressão de múltiplos genes através de comunicação com o aparato transcricional, alterando a taxa de transcrição dos genes alvo. (NACIFF e DASTON, 2004).

A sensibilidade do ensaio uterotrófico se baseia no uso de animais cujo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é afuncional, o que leva a baixos níveis endógenos de estrogênio circulante. Isto assegura um baixo peso uterino inicial e um alcance máximo de resposta às substâncias estrogênicas administradas. Se alguma substância estimular, direta ou indiretamente, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal precocemente, pode resultar em puberdade, ovulação e abertura vaginal precoces (OECD, 2007).

O ensaio uterotrófico já foi utilizado em nosso laboratório em um estudo sobre o potencial de interferência endócrina da água de beber de uma ETA do Estado de São Paulo. Os resultados (ainda não publicados) indicam intumescimento muito sutil do útero. Também houve alteração na esteroidogênese das ratas tratadas com extrato de água de beber em doses

equivalentes a um consumo humano de 2L, 5L e 10L de água por dia. Esses achados estão sob investigação, sob a hipótese de que sejam decorrentes da contaminação da água por atrazina, um herbicida muito utilizado e potente interferente endócrino.

A atrazina é capaz de afetar indiretamente a reprodução de múltiplas espécies através do Sistema Nervoso Central. Seu modo de ação não é via receptor de estrógeno ou andrógeno, mas afeta indiretamente as vias estrogênica e androgênica através da supressão de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e por modulação dos passos da via da esteroidogênese (WILLET, BISHOP e SULLIVAN, 2011).

Assim, a utilização da atrazina como tratamento em um dos grupos desse projeto serviu como referência para efeitos de IE que não atuam apenas via receptor. Portanto, além da coleta de órgãos como fígado, útero, ovário, adrenais, tireoide e hipófise para pesagem e processamento histológico dos úteros, foram determinados, por radioimunoensaio, os níveis de estradiol, testosterona, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH).

Este projeto está relacionado a um projeto em andamento em nosso laboratório TOXICAM (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana) na UNESP de Botucatu - Processo Fapesp 2010/09771-1. O preparo da amostra e análise química dos extratos (quantificação de contaminantes emergentes) foi realizado com a colaboração do Prof. Wilson Jardim (LQA, UNICAMP- Campinas). Este trabalho contou também com apoio da Prof<sup>a</sup>. Gisela A. Umbuzeiro (FT, UNICAMP- Limeira) e da CETESB, para caracterização da amostra e análise *in vitro* com leveduras luminescentes capazes de responder a agentes estrogênicos e androgênicos através do gene que codifica o receptor de estrogênio e androgênio humano, respectivamente.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Amostragem**

#### **4.1.1 Coleta e caracterização do ponto amostral**

Em novembro de 2012 coletou-se uma amostra de água tratada (12 litros) em um condomínio residencial de Barão Geraldo, Campinas/SP. O reservatório da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA) é abastecido pelas ETAs 1 e 2 locais, que captam água bruta do Rio Atibaia. Após tratada, a água é distribuída para os aproximadamente 950 mil habitantes de Campinas. O ponto de coleta faz parte do conjunto de

pontos amostrais investigados pelo Laboratório de Química Ambiental da Universidade Estadual de Campinas (LQA – UNICAMP), através do projeto temático coordenado pelo Dr. Wilson Figueiredo Jardim (Processo Fapesp 2007/58449-2). As águas brutas do Rio Atibaia, na região de Campinas, foram classificadas como péssimas em relatório da CETESB de janeiro de 2008, indicando ocorrência de poluição oriunda de esgotos domésticos e possivelmente industriais (CETESB, 2009). Isso permite supor a presença de compostos estrogênicos associados.

#### **4.1.2 Extração e pré- concentração das amostras**

A determinação e quantificação dos interferentes endócrinos foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS-MS) (SODRÉ, PESCARA *et al.*, 2010). Tanto as extrações como as análises cromatográficas foram realizadas pelo LQA – UNICAMP. A extração em fase-sólida (MURK, LEGLER *et al.*, 2002), a mais utilizada para quantificação de interferentes endócrinos em matrizes ambientais, foi realizada empregando-se cartuchos HLB Oasis (Waters) ou Strata-X (Phenomenex) contendo 500 mg de fase sólida condicionados com 6 mL de metanol.

Após a extração, os cartuchos foram mantidos sob um fluxo brando de N<sub>2</sub> para eliminar o excesso de umidade. A eluição dos compostos foi feita a 8 mL min<sup>-1</sup> em um manifold à vácuo de 12 portas (PrepSep - Fisher Scientific) por meio da adição de 5 mL de metanol em cada cartucho de extração. O eluato foi seco sob N<sub>2</sub> e o volume final foi ajustado para 1000 vezes concentrado por meio da adição de 10 ml de metanol. Uma porção dos extratos (equivalente a 1 litro de água de beber ou ultra-pura) foi separada para análises químicas (Dr. Wilson F. Jardim) e outra para análises biológicas (ensaio com leveduras luminescentes, Dra. Gisela A. Umbuzeiro).

Amostra de água ultra-pura (8 litros), produzida no LQA-Unicamp por filtros Milli-Pore®, também passou por todo o processo de extração e foi utilizada como o “branco” de todos os procedimentos realizados, bem como controle negativo no delineamento experimental do estudo. No início do experimento com animais, os extratos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) 1%, distribuído em *vials* de vidro de 1 mL e, posteriormente, ajustados com água destilada de forma a constituir as amostras experimentais da água de beber nas doses de 33,3; 166,5 e 333 ml/kg de peso corpóreo (p.c.) na solução de gavage. As doses equivalem ao consumo diário de 2, 5 e 10 litros, respectivamente, de água de beber por uma pessoa de 60 kg (LU *et al.*, 2002). O grupo controle negativo recebeu 333,0 ml/kg de p.c. do extrato de água ultra-pura. A suspensão dos extratos com DMSO ficou

armazenada em geladeira de 2-5°C durante todo o período experimental e foi usada em temperatura ambiente no momento de administração para o animal.

#### ***4.2 Análise química da água de beber***

A determinação e quantificação dos contaminantes emergentes foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS-MS) (SODRÉ, PESCARA *et al.*, 2010), no Laboratório de Química Ambiental (LQA) da Unicamp/ Campinas. A Tabela 1 também mostra os limites de detecção do método para os compostos investigados.

#### ***4.3 Bioensaio com leveduras luminescentes***

O método deste bioensaio, realizado na CETESB, se baseia no emprego de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que contém o receptor humano de estrógeno (hER) ou de andrógeno (hAR); este microorganismo emite luz quando exposto a compostos estrogênicos ou androgênicos, respectivamente. (SANSEVERINO, GUPTA *et al.*, 2005)

##### ***4.3.1 Amostras***

Para este bioensaio, os extratos equivalentes a 1 litro de água de beber e 1 litro de água ultra-pura foram secos sob fluxo de N<sub>2</sub> e, posteriormente, redissolveu-se os resíduos em DMSO. A solução resultante foi diluída com água ultra-pura esterilizada até que a concentração final de DMSO nos meios de cultura fosse 1%. Nos testes realizados foram empregadas soluções padrão dos compostos avaliados (Tabela 1) em concentrações que variavam de 10<sup>-14</sup> à 10<sup>-3</sup> M. Foram também feitas diluições seriadas dos extratos das amostras de água de beber e ultra-pura, em fatores de concentração de 1000 a 0,0025 vezes, sendo no mínimo 5 diluições.

##### ***4.3.2 Protocolo de ensaio e análise dos resultados***

No dia anterior ao ensaio, a linhagem foi descongelada e rapidamente despejado o conteúdo em 30 mL de meio de crescimento. As culturas foram vigorosamente agitadas (~200 rpm) a 28°C por ~20-22 horas, até que a DO<sub>600</sub>, medida por espectrofotômetro, atingisse em torno de 1.

Após isto, a cultura que cresceu por 20 a 22hs ( $DO_{600}=1$ ) foi centrifugada e ressuspendida em meio de crescimento, de modo a se obter uma cultura com  $DO_{600}=4$ . As culturas concentradas foram adicionadas aos orifícios com pipeta multicanal (50  $\mu$ L/orifício). O 17 $\beta$ -estradiol foi testado entre concentrações de 1 $\mu$ M – 2,5 pM, os compostos químicos puros foram testados entre concentrações de 10<sup>-14</sup> à 10<sup>-3</sup> M. Para as amostras ambientais, estas foram concentradas em até 1000 vezes, dependendo da amostra, e feitas diluições seriadas de modo a se obter 18 diluições, foi adicionado 50 $\mu$ L de solução de amostra por orifício mais 50 $\mu$ L de cultura. Foram consideradas para cálculos, as diluições das amostras ambientais concentradas em até 100 vezes concentrado para evitar efeitos de matriz. As placas foram cobertas com adesivo *Easy Breath*. A leitura de luminescência foi feita após 4 horas de incubação em luminômetro Perkin-Elmer Victor2 Multilabel Counter, com período de medição de 1s por orifício da microplaca. No caso de DMSO, foi utilizado 1% do volume final de orifício da microplaca para compostos puros e amostras. Os testes foram feitos em duplicata com a linhagem BLYR.

O limite de detecção (LD) adotado para o método foi a concentração de 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) ou de testosterona (TTR). As leituras de luminescência obtidas com a linhagem BLYES/BLYAS foram corrigidas no caso de existir toxicidade com a linhagem *BLYR*, desde que a toxicidade desta não fosse maior que 1,5 (razão entre a luminescência de *background* e a luminescência da amostra).

#### **4.4 Experimentação animal**

Foi desenvolvido um estudo com animais pré-púberes submetidos ao ensaio uterotrófico, seguindo protocolo padronizado internacionalmente, N° 440 da OECD (2007), suplementado pela avaliação da cornificação vaginal.

##### **4.4.1 Animais e ambiente de experimentação**

Foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem *Wistar* com 21 dias de idade. Os animais foram gerados no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, por matrizes adultas adquiridas do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, SP. Não se utilizou mais de três filhotes da mesma ninhada para o mesmo grupo experimental. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha de pinho branco autoclavada, fechadas com grades de inox (quatro animais por gaiola). Gaiolas trocadas e higienizadas três vezes por semana.

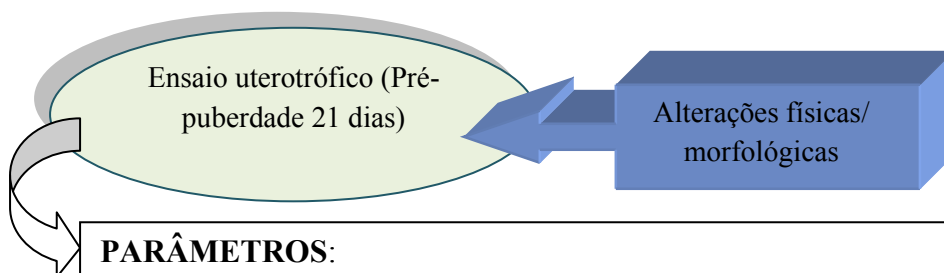
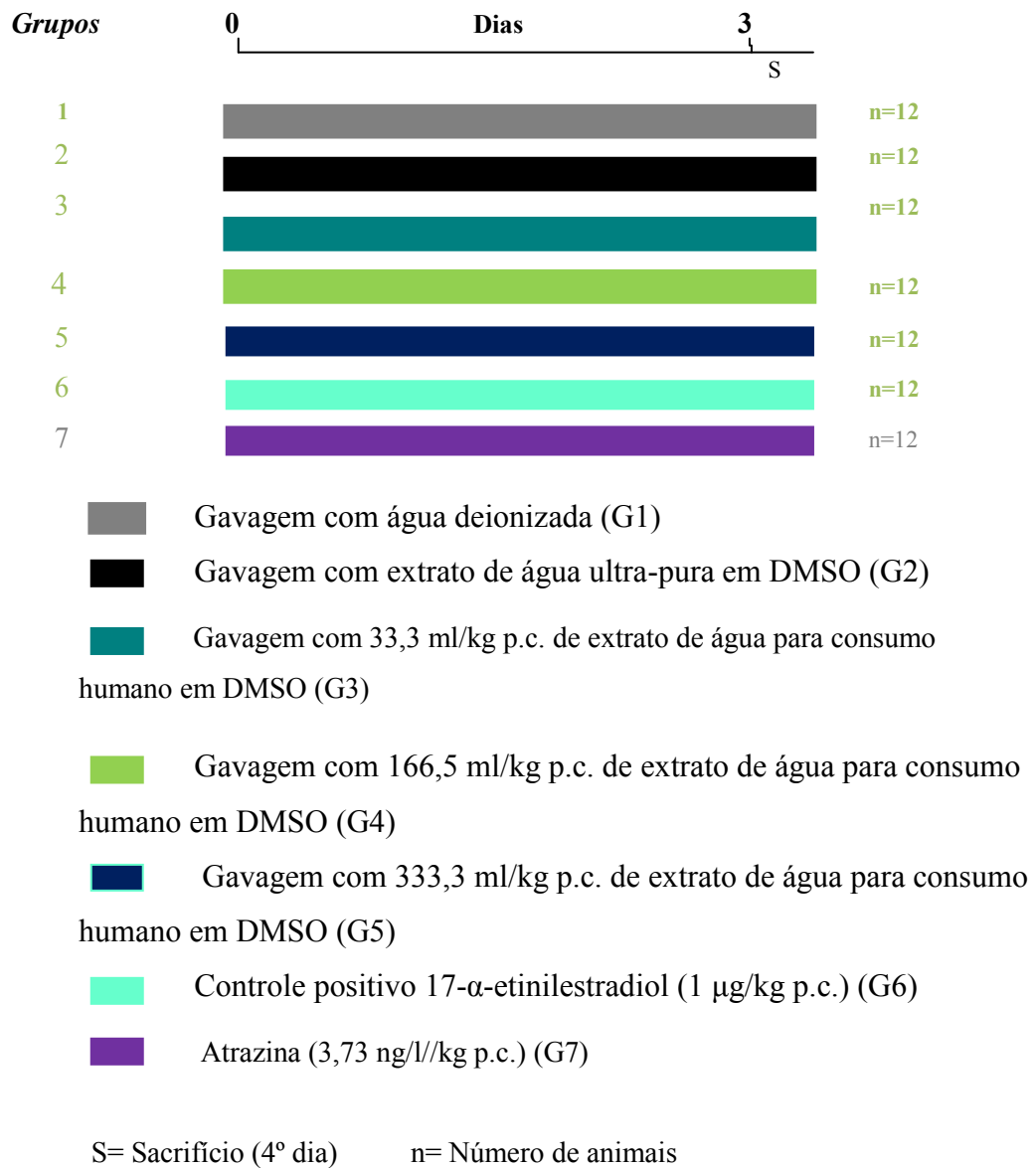
Durante todo o período experimental foram controladas as condições ambientais do biotério como temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $55\pm 10\%$ ), ciclo de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e circulação contínua de ar para evitar acúmulo de amônia. Ração Purina-Labina (Eviais, Paulínia, SP) fornecida *ad libitum* durante todo o experimento. Água deionizada foi fornecida *ad libitum* aos animais desde o dia do nascimento em bebedouros de vidro com capacidade de 1.000 ml, fechados com rolhas de borracha e bicos de aço inoxidável. Estes recipientes foram trocados e lavados três vezes por semana. Durante o experimento, os animais passaram por avaliação clínica diária.

#### ***4.4.2 Delineamento experimental***

##### **4.4.2.1 Ensaio uterotrófico OECD 440 (2007) e de cornificação vaginal**

Foram utilizadas 84 fêmeas *Wistar* distribuídas em sete grupos experimentais, cujos animais receberam os tratamentos, via gavagem, uma vez ao dia, durante três dias, conforme descrito a seguir. O primeiro grupo controle (G1) recebeu apenas água deionizada não concentrada e sem DMSO. Os grupos tratados com extratos sólidos (G2 a G5) foram: um extrato de água ultra-pura em DMSO na concentração de 333,0 mL/kg p.c., administrado como controle do método de extração (G2) e três grupos tratados com concentrações diferentes do extrato de água de beber em DMSO (G3 a G5), respectivamente: 33,3; 166,5 e 333,0 ml/kg p.c. por dia. O sexto grupo (G6) recebeu 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2; 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  p.c.), estrógeno sintético em concentração indutora de hiperplasia e hipertrofia do endométrio (controle uterotrófico positivo). O último grupo (G7) recebeu atrazina (3,73 ng/l/kg p.c.) em DMSO. Como este herbicida exerce interferência endócrina (WILLET et al., 2011) tornou-se importante excluir sua ação predominante nas amostras estudadas. A dose utilizada foi relativa à concentração de 11,2 ng/L encontrada numa amostra de água da mesma fonte que a amostra do presente estudo, mas coletada em 2010. A dose de atrazina administrada para o animal foi equivalente ao consumo de 10 L dessa amostra de água por um humano de 60 kg. Avaliou-se também o consumo diário de água destilada e ração *ad libitum* em todos os grupos.

## DELINEAMENTO EXPERIMENTAL - PROTOCOLO OECD, 440



### PARÂMETROS:

- Peso corpóreo
- Peso e macroscopia de útero, ovários, adrenais, rins e fígado.
- Análises morfométrica e histológica do útero.
- Avaliação da cornificação vaginal.
- Alterações dos níveis séricos de estradiol, LH, FSH e testosterona
- Alteração da expressão gênica no útero do HOXA 10 e dos receptores de estrógeno (ER- $\alpha$ ,) e progesterona.

#### **4.4.3 Eutanásia e Dosagens Hormonais**

As fêmeas foram sacrificadas 24 horas após a dose final (25° dia de vida). A eutanásia foi realizada por secção dos vasos da base do coração, após narcose induzida em câmara de CO<sub>2</sub> e coleta de sangue por punção cardíaca. O sangue colhido foi centrifugado a 2400 rpm por 20 minutos a 3,5° C, para separação do soro, que foi congelado até o momento dos ensaios hormonais de estradiol, hormônio luteinizante, hormônio folículo-estimulante e testosterona. O processamento utilizou kits comerciais e leitura por radioimunoensaio realizado em colaboração com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Janete A. Anselmo-Franci.

#### **4.4.4 Processamento histológico**

Os órgãos coletados foram fixados em formalina 10% tamponada por 48 horas, lavados com água e conservados em álcool 70%. Após fixação, fragmentos representativos de cada um deles foram incluídos em parafina para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE). O recorte dos tecidos ocorreu de acordo com *guidelines* publicados por grupos internacionais, como o RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal data) e NACAD (North American Control Animal Database) (KITTEL, RUEHL-FEHLERT *et al.*, 2004).

#### **4.4.5 Análise morfométrica do útero**

Três porções da região média do corno uterino direito de seis animais de cada grupo foram cortadas transversalmente, fixadas em formalina 10% tamponada, processadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes do tecido emblocados em parafina tiveram espessura de 4 µm. As lâminas foram então escaneadas e os cortes analisados pelo programa gratuito Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd, Panoramic Viewer 1.15.2 SP2). As espessuras do endométrio e miométrio foram assumidas como a média de 15 medições lineares de cada animal, tomadas desde a transição endométrio-miométrio até a superfície luminal e transição endométrio-miométrio até o perimétrio, respectivamente, sendo cinco medidas em cada um dos três cortes do útero. A análise dos resultados se deu com a média de cada um dos seis animais do grupo.

Os úteros dos outros seis animais de cada grupo foram dissecados, acondicionados em criotubos e mantidos em nitrogênio líquido até a transferência para freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , onde ficaram armazenados até a extração do RNA.

#### **4.4.6 Avaliação da cornificação vaginal**

Os cortes histológicos de vagina foram analisados quanto à presença de queratina no epitélio, o que representa um parâmetro para avaliação de estrogenicidade e estágio da puberdade. (JONES e EDGREN, 1973).

#### **4.4.7 qRT PCR**

Foram avaliados os perfis de expressão dos seguintes genes no útero:

- Hoxa-10: gene membro de uma família de fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento do trato reprodutivo, principalmente fertilidade feminina, sendo a progesterona o indutor primário (VARAYOUD et al., 2008).
- Receptor de estrógeno ( $\text{ER}\alpha$ ): responsável pelo desenvolvimento normal das funções reprodutivas femininas, características sexuais secundárias e comportamento reprodutivo (COUSE et al., 1997).
- Receptor de progesterona (PR): envolvido na diferenciação celular (NACIFF e DASTON, 2004).

Para extração do RNA, utilizou-se o kit de extração para tecidos RNeasy (Qiagen) e purificação orgânica, seguindo as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi ressuspendido em água ultrapura e armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todas as etapas do experimento foram realizadas com cuidados estritos quanto à contaminação das amostras com RNases do ambiente, além de serem empregados somente materiais e reagentes livres de RNases e DNases.

Com o RNA total, realizou-se a transcrição reversa para a produção de cDNA através de kit High Capacity (Life Technologies). O cDNA foi amplificado através da técnica de PCR em tempo real utilizando reagentes *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal MasterMix* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA). O gene *housekeeping* utilizado foi a beta-actina.

#### **4.4.8 Análise estatística**

Todos os resultados foram inicialmente avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) para amostras independentes. Nas amostras que não apresentaram homogeneidade de variância e/ou não passaram pelo teste de normalidade, as diferenças foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's para amostras independentes. Para todas as análises, as comparações foram com o grupo tratado apenas com água deionizada pura não concentrada (controle negativo). A apresentação das tabelas com média e desvio-padrão de dados não paramétricos foi realizada para manter clareza dos números e permitir melhor visualização de efeitos eventuais.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Análise química da amostra de água e Bioensaio com levedura luminescente**

A análise química da amostra de água de beber pôde detectar e quantificar compostos como os fungicidas carbendazim, azoxistrobina, tebuconazol, e o inseticida imidacloprida. Outros compostos não detectados podem eventualmente estar presentes na amostra, mas em quantidades inferiores ao limite de detecção do método cromatográfico.

O extrato de água ultra-pura apresentou resultados negativos para todos os compostos analisados e foi utilizado como um dos controles negativos nos ensaios.

No ensaio *in vitro* com levedura luminescente, a amostra não apresentou atividade estrogênica ou androgênica.

Tabela 1. Análise da amostra de água de beber

Compostos investigados	Quantificação dos compostos detectados pelas análises cromatográficas	BLYES/BLYAS
		Atividade estrogênica/ androgênica <i>in vitro</i> (ng eq. E <sub>2</sub> / Testosterona/L)
Atrazina	0,081 ng/L	
Cafeína	0,056 ug/L	
Estrona	< 2,6 ng/L (LD)	
Carbendazim	0,22 ng/L	
Imidacloprida	0,88 ng/L	
Azoxistrobina	0,23 ng/L	
Tebuconazol	0,19 ng/L	
Bisfenol A	< 1,5 ng/L (LD)	
Dietilstilbestrol	< 3,4 ng/L (LD)	
17 b-estradiol	< 5,9 ng/L (LD)	
Estriol	< 0,8 ng/L (LD)	
17 $\alpha$ -etinilestradiol	< 13,9 ng/L (LD)	
Fenolftaleína	< 3,7 ng/L (LD)	
4-n-nonilfenol	< 10,6 ng/L (LD)	
4-n-octilfenol	< 5,1 ng/L (LD)	Não detectado
Mestranol	< 8,8 ng/L (LD)	
Levonorgestrel	< 0,9 ng/L (LD)	
Progesterona	< 2,7 ng/L (LD)	
Testosterona	< 1,7 ng/L (LD)	
Triclosan	< 0,7 ng/L (LD)	
Difenoconazol	< 0,2 ng/L (LD)	
Epoxiconazol	< 0,7 ng/L (LD)	
Piraclostrobina	< 0,3 ng/L (LD)	
Picoxistrobina	< 0,7 ng/L (LD)	
Trifloxistrobina	< 0,2 ng/L (LD)	
Clorpirifos	< 0,9 ng/L (LD)	
Profenofos	< 1,5 ng/L (LD)	
Fipronil	< 18 ng/L (LD)	
Hexithiazox	< 1,5 ng/L (LD)	
Bromacil	< 0,5 ng/L (LD)	

LD: Limite de detecção do método.

Esses resultados de análise química e de bioluminescência *in vitro*, gerados pelos grupos do LQA e da CETESB, foram utilizados para interpretação dos resultados obtidos pelo ensaio *in vivo*, conforme apresentados a seguir.

## **5.2 Experimentação animal**

### **5.2.1 Mortalidade**

Não houve mortalidade espontânea ou relacionada ao tratamento em qualquer grupo experimental.

### **5.2.2 Sintomas clínicos**

Não houve sinais clínicos relacionados à substância ou distúrbios induzidos no comportamento geral dos animais durante o experimento.

### **5.2.3 Consumo de ração (tabela 2)**

O consumo médio de ração pelo grupo tratado com 17 $\alpha$ -etinilestradiol (G2) foi significativamente menor que o grupo tratado somente com água deionizada (G1).

### **5.2.4 Consumo de água destilada (tabela 2)**

Os consumos de água destilada pelos grupos tratados com extrato de água de beber (G2 a G5) não diferiram significativamente do grupo tratado com água deionizada (G1).

Tabela 2: Consumo de água destilada e ração

Grupos	N° de animais	Consumo de água	Consumo de ração <sup>1</sup>
		ml/rato/dia	g/rato/dia
Água deionizada	12	13,19 ±1,40	8,08±0,98
Extrato de água ultra-pura (333 ml/kg pc.)	12	12,05 ±2,29	6,30 ±1,18
Extrato de água de beber (33,3 ml/kg pc.)	12	13,83 ±0,94	7,83 ±1,18
Extrato de água de beber (166,5 ml/kg pc.)	12	14,08 ±1,25	9,38 ±2,12
Extrato de água de beber (333 ml/kg pc.)	12	12,62 ±0,90	7,50±1,31
Controle positivo 17 $\alpha$ -etinilestradiol (1 $\mu$ g/kg p.c.)	12	10,88 ±0,74	5,13 ±0,411*
Atrazina (3,73 ng/l/kg p.c.)	12	10,99 ±0,95	7,11 ±1,08

Valores apresentados na forma de média  $\pm$  DP. <sup>1</sup> Dados não paramétricos estatisticamente; \*p<0,05 significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

### 5.2.5 Peso corpóreo (tabela 3)

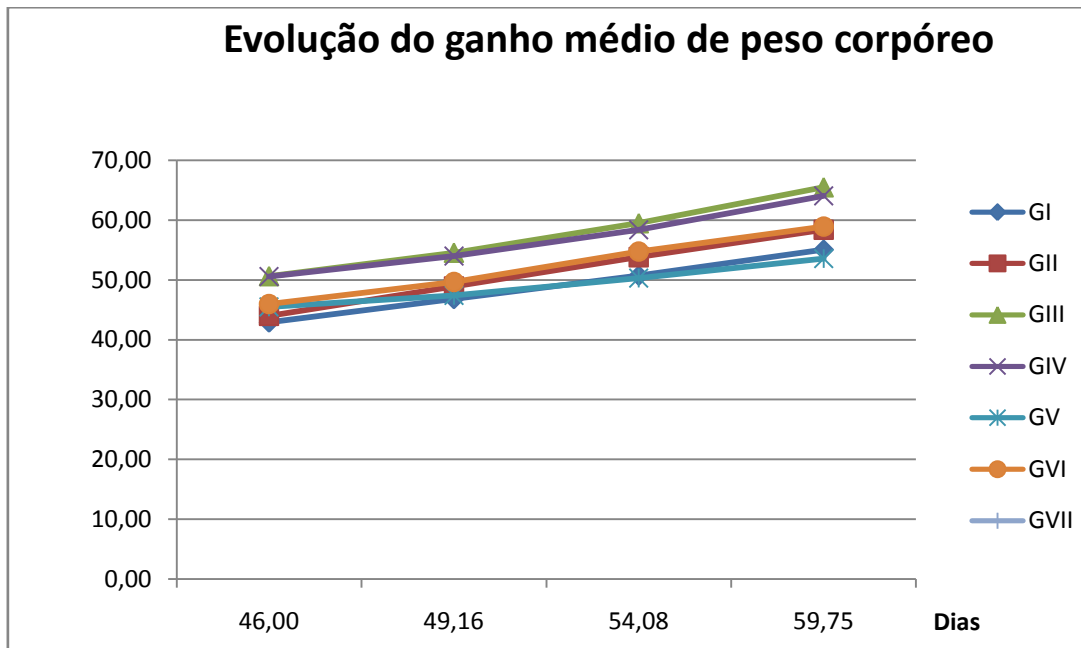
O ganho de peso do grupo controle positivo para (G6) foi significativamente menor que o grupo tratado com água deionizada. No entanto, o ganho de peso corpóreo pelos grupos tratados com o extrato de água de beber não diferiu de maneira significativa do grupo tratado com água deionizada.

Tabela 3: Peso corpóreo inicial e final e ganho de peso dos animais nos diferentes grupos ao final do experimento

Grupos	N° de animais	Peso corpóreo (g)		
		Inicial	Final	Ganho <sup>1</sup>
Água deionizada	12	46,0 ±8,43	59,75 ±10,48	13,75 ±3,30
Extrato de água ultra-pura (333 ml/kg pc.)	12	42,92 ±6,69	55,08 ±9,69	12,17 ±3,89
Extrato de água de beber (33,3 ml/kg pc.)	12	44 ±6,26	58,41 ±7,37	14,42 ±2,50
Extrato de água de beber (166,5 ml/kg pc.)	12	50,67 ± 4,33	65,5 ±6,36	14,83 ±3,45
Extrato de água de beber (333 ml/kg pc.)	12	50,58 ±4,23	64,1 ±5,51	13,50 ±3,08
Controle positivo 17 $\alpha$ - etinilestradiol (1 $\mu$ g/kg p.c.)	12	45,5 ±6,76	53,58 ±7,48	8,08 ±3,44*
Atrazina (3,73 ng/l//kg p.c.)	12	46 ±6,8	58,9 ±8,5	12,92 ±3,80

Valores apresentados na forma de média  $\pm$  DP. O Ganho de peso representa: peso corpóreo final – peso corpóreo inicial. <sup>1</sup> Dados não paramétricos estatisticamente; \*p<0,05 significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

Figura 1. Evolução do ganho médio de peso corpóreo dos animais (g)



Legenda: grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc./dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l/kg pc.

### 5.2.6 Peso de órgãos (tabelas 4,5 e 6)

O principal parâmetro neste protocolo para avaliação de estrogenicidade é o aumento do peso de útero devido a intumescimento do órgão (útero cheio) (Tabela 4). Isto pôde ser verificado em todos os animais do grupo tratado com EE2 (Tabela 4). Nenhum dos animais controle negativo (G1 e G2) ou tratados com o extrato de água de beber (G3-G5) apresentou útero cheio. Assim, os valores de peso de “útero cheio” e “útero vazio” foram os mesmos para esses grupos (Tabela 4).

Em relação aos outros órgãos, apenas o peso relativo dos rins (direito e esquerdo) do grupo tratado com atrazina (G7) foi significativamente menor que G1. (tabela 6)

Tabela 4: Peso absoluto e relativo (g) do útero dos animais nos diferentes grupos ao final do experimento.

Grupos	N° de animais	Útero cheio <sup>1</sup>		Útero vazio	
		Peso absoluto	Peso relativo	Peso absoluto	Peso relativo
Água deionizada	12	0,030±0,008	0,051 ±0,131	0,030±0,008	0,051 ±0,131
Extrato de água ultra-pura (333 ml/kg pc.)	12	0,028 ±0,008	0,052±0,012	0,028 ±0,008	0,052±0,012
Extrato de água de beber (33,3 ml/kg pc.)	12	0,053 ±0,050	0,088±0,076	0,053 ±0,050	0,088±0,076
Extrato de água de beber (166,5 ml/kg pc.)	12	0,043 ±0,021	0,065±0,027	0,043 ±0,044	0,065±0,027
Extrato de água de beber (333 ml/kg pc.)	12	0,041 ±0,036	0,063±0,055	0,041 ±0,036	0,063±0,055
Controle positivo 17 $\alpha$ -etinilestradiol (1ug/kg pc.)	12	0,284 ±0,115*	0,540±*0,229	0,149*0,046*	0,279±*0,073
Atrazina (3,73 ng/l//kg p.c.)	12	0,033±0,009	0,058±0,026	0,033±0,009	0,058±0,026

Valores apresentados na forma de média  $\pm$  DP e não paramétricos estatisticamente; <sup>1</sup> Representa o útero como foi encontrado no animal, isto é, com líquido intersticial; \*p<0,05 significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

Tabela 5: Peso absoluto (g) de órgãos de ratos nos diferentes grupos ao final do experimento

<b>Grupos</b>	<b>N° de animais</b>	<b>Peso corpóreo final</b>	<b>Ovários</b>	<b>Adrenais</b>	<b>Rins</b>	<b>Tireoide</b>	<b>Hipófise</b>	<b>Fígado</b>
<b>Água deionizada</b>	12	59,400 ±9,341	0,010 ±0,003	0,009 ±0,002	0,328 ±0,052	0,030±0,043	0,0020±0,0005	2,559 ±0,606
<b>Extrato de água ultra-pura (333 ml/kg pc.)</b>	12	55,083 ±9,699	0,009± 0,002	0,009 ±0,002	0,285 ±0,058	0,018±0,002	0,0019±0,0006	2,017 ±0,685
<b>Extrato de água de beber (33,3 ml/kg pc.)</b>	12	58,417 ±7,378	0,010 ±0,001	0,008 ±0,002	0,309 ±0,068	0,015±0,005	0,0021±0,0005	2,367 ±0,418
<b>Extrato de água de beber (166,5 ml/kg pc.)</b>	12	65,50 ±6,36	0,009 ±0,001	0,010 ±0,001	0,365 ±0,037	0,018±0,003	0,0023±0,0005	2,724 ±0,463
<b>Extrato água de beber (333 ml/kg pc.)</b>	12	64,083 ±5,517	0,009 ±0,002	0,010±0,003	0,335 ±0,034	0,017±0,004	0,0023±0,0004	2,441±0,371
<b>Controle positivo 17<math>\alpha</math>-etinilestradiol (1ug/kg p.c.)</b>	12	53,583 ±7,488	0,008 ±0,001	0,010 ±0,001	0,299 ±0,032	0,017±0,002	0,0021±0,0005	2,219 ±0,320
<b>Atrazina (3,73 ng/l//kg p.c.)</b>	12	58,917 ±8,500	0,009 ±0,002	0,009 ±0,001	0,314 ±0,033	0,019±0,004	0,0021±0,0003	2,356 ±0,371

Valores apresentados na forma de média  $\pm$  DP. Dados não paramétricos. Ausência de diferenças significativas em relação ao controle negativo (água deionizada) com \* $p < 0,05$

Tabela 6: Peso relativo (g) de órgãos de ratos nos diferentes grupos ao final do experimento

Grupos	N° de animais	Peso corpóreo final	Ovários	Adrenais	Rins <sup>1</sup>	Tireoide	Hipófise	Fígado
Água deionizada	12	59,400 ±9,341	0,016±0,004	0,016±0,003	0,552±0,036	0,030±0,043	0,0020±0,0005	4,262±0,453
Extrato de água ultra-pura (333 ml/kg p.c.)	12	55,083 ±9,699	0,022±0,018	0,016±0,002	0,521±0,065	0,018±0,002	0,0019±0,0006	3,663±0,979
Extrato de água de beber (33,3 ml/kg p.c.)	12	58,417 ±7,378	0,018±0,004	0,015±0,004	0,526±0,072	0,015±0,005	0,0021±0,0005	4,033±0,280
Extrato de água de beber (166,5 ml/kg p.c.)	12	65,500 ±6,36	0,014±0,002	0,015±0,001	0,557±0,025	0,018±0,003	0,0023±0,0005	4,137±0,395
Extrato de água de beber (333 ml/kg p.c.)	12	64,083 ±5,517	0,014±0,003	0,015±0,003	0,523±0,022	0,017±0,004	0,0023±0,0004	3,686±0,329
Controle positivo 17 $\alpha$ -etinilestradiol (1ug/kg p.c.)	12	53,583 ±7,488	0,014±0,002	0,018±0,004	0,563±0,038	0,017±0,002	0,0021±0,0005	4,163±0,424
Atrazina (3,73 ng/l/kg p.c.)	12	58,917 ±8,500	0,015±0,004	0,016±0,003	0,421±0,026*	0,019±0,004	0,0021±0,0003	4,009±0,371

Valores apresentados na forma de média  $\pm$  DP; <sup>1</sup> Dados não paramétricos; ; \*p<0,05 significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

### 5.2.7 Análise histológica e morfométrica do útero

Não houve alteração histológica e na espessura endometrial e miometrial dos grupos de animais tratados com a amostra de água de beber quando comparados com os animais do grupo controle negativo.

Tabela 7. Análise morfométrica do útero

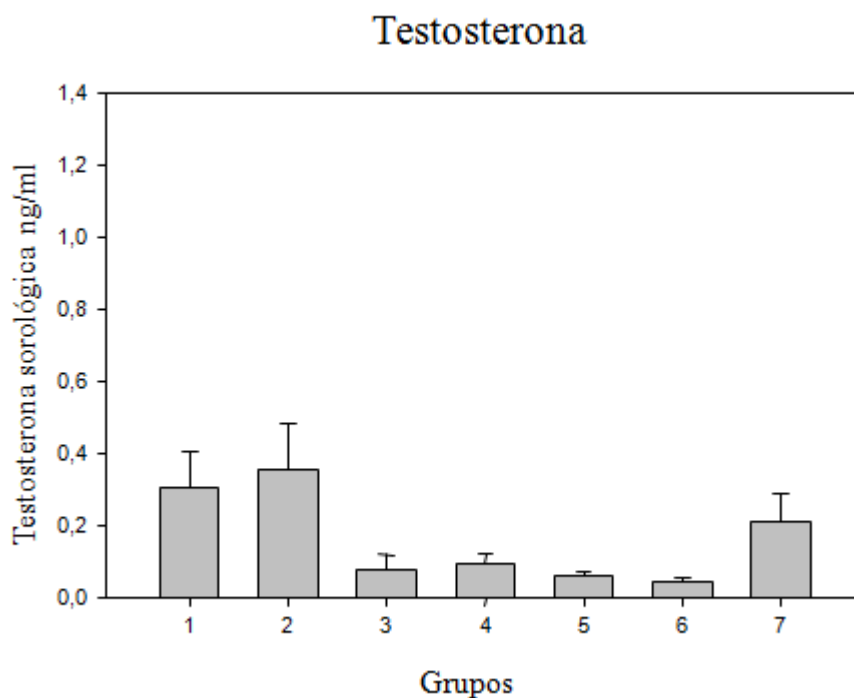
<b>Grupos</b>	<b>N° de animais</b>	<b>Espessura endométrio (<math>\mu\text{m}</math>)<sup>1</sup></b>	<b>Espessura miométrio (<math>\mu\text{m}</math>)<sup>1</sup></b>
<b>Água deionizada</b>	6	104,508±50,857	36,617±8,840
<b>Extrato de água ultra-pura (333 ml/kg pc.)</b>	6	98,194±43,517	34,539±8,515
<b>Extrato de água de beber (33,3 ml/kg pc.)</b>	6	107,308±54,621	38,476±10,300
<b>Extrato de água de beber (166,5 ml/kg pc.)</b>	6	126,435±62,494	42,299±11,555
<b>Extrato de água de beber (333 ml/kg pc.)</b>	6	122,910±54,519	38,790±10,896
<b>Controle positivo 17<math>\alpha</math>-etinilestradiol (1<math>\mu\text{g}</math>/kg p.c.)</b>	6	185,099±85,488*	68,832±23,144*
<b>Atrazina (3,73 ng/l/kg p.c.)</b>	6	101,667±43,342	38,335±10,052

Valores apresentados na forma de média  $\pm$  DP; <sup>1</sup> Dados não paramétricos; \*p<0,05 significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

### 5.2.8 Dosagens hormonais

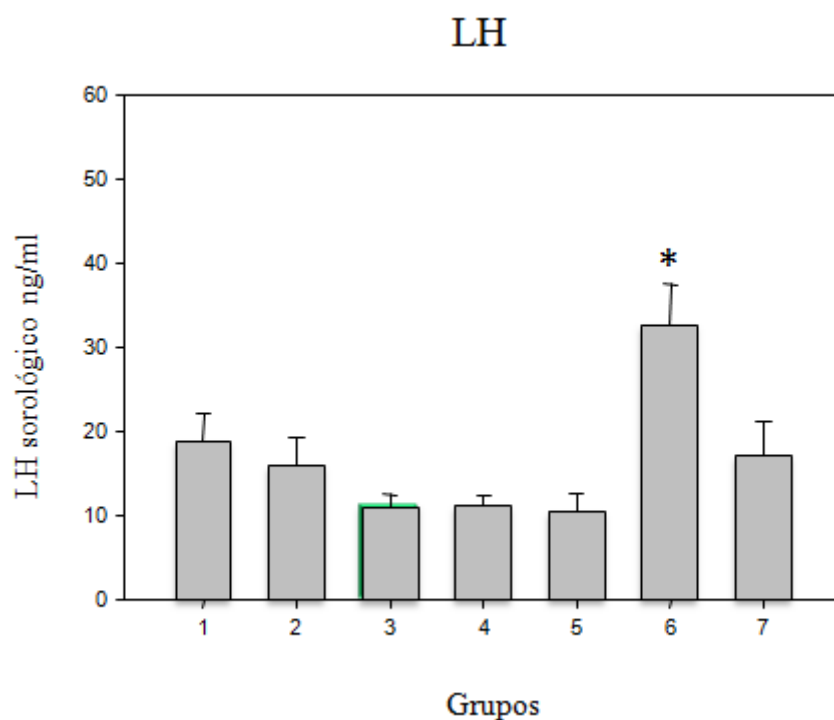
Os níveis séricos de 17- $\beta$ estradiol, testosterona, FSH e LH não foram significativamente alterados pelo tratamento neste estudo, conforme as figuras a seguir.

Figura 2. Níveis sorológicos de testosterona dos animais ao final do experimento



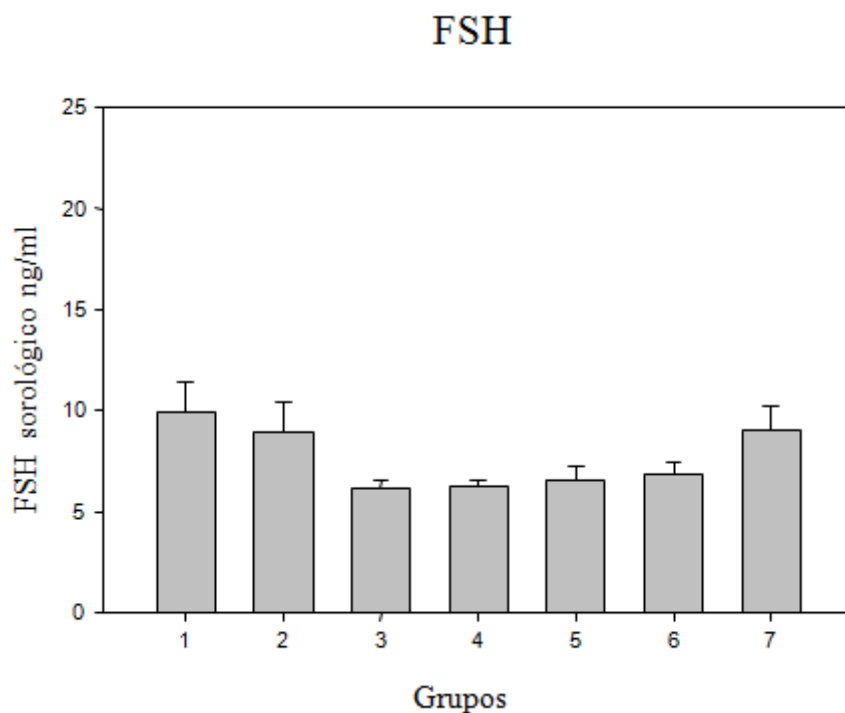
Legenda: grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc/dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc/dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc/dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc/dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l/kg pc Dados não paramétricos: ausência de diferenças significativas em relação ao controle negativo (água deionizada) com \* $p < 0,05$ .

Figura 3. Níveis sorológicos de LH dos animais ao final do experimento



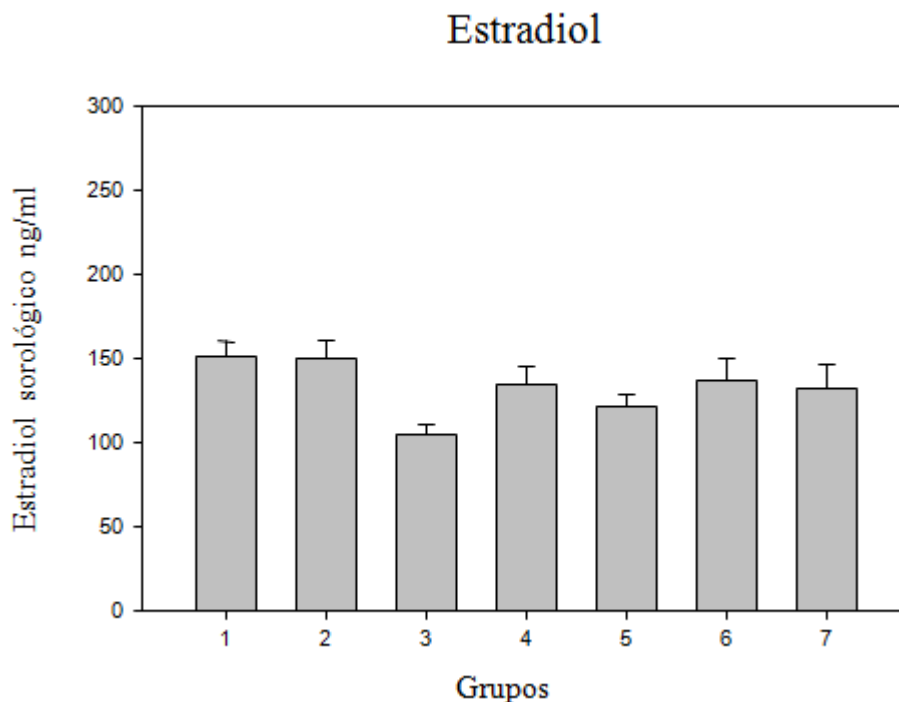
grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc./dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l/kg pc. Dados não-paramétricos; \* $p < 0,05$  significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

Figura 4. Níveis sorológicos de FSH dos animais ao final do experimento



grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc./dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l/kg pc. Dados não paramétricos: ausência de diferenças significativas em relação ao controle negativo (água deionizada) com  $*p < 0,05$ .

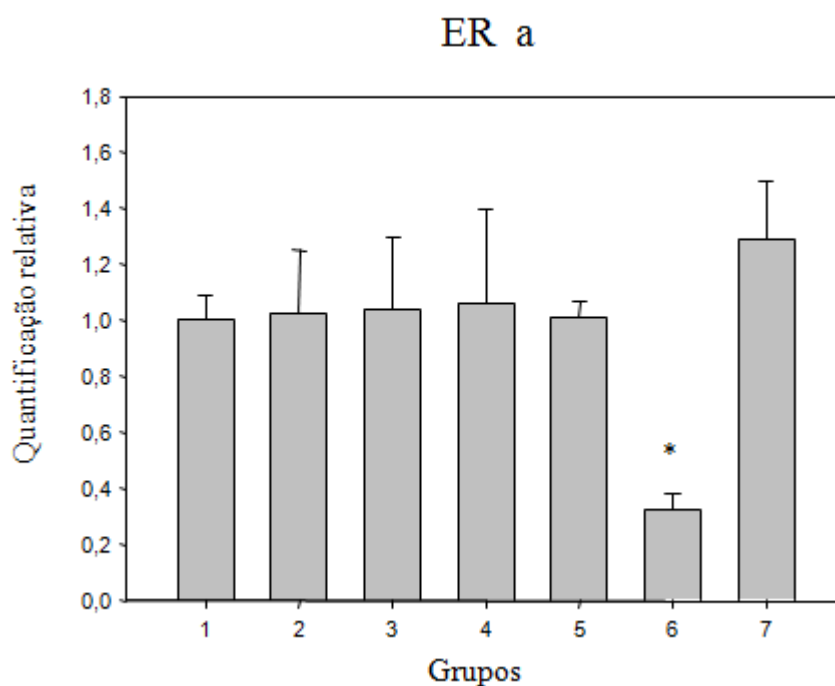
Figura 5. Níveis sorológicos de estradiol dos animais ao final do experimento



grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc./dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l//kg pc. Dados não paramétricos: ausência de diferenças significativas em relação ao controle negativo (água deionizada) com \* $p < 0,05$ .

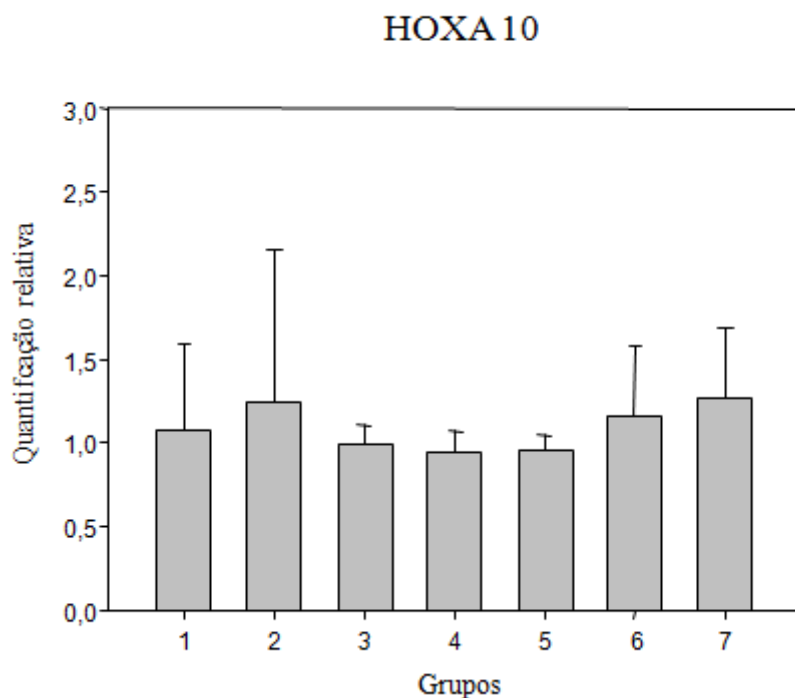
### 5.2.9 qRT PCR

Não houve efeito de tratamento com os extratos de água de beber na expressão gênica do HOXA 10 e dos receptores de estrógeno  $\alpha$  e de progesterona. No entanto, o grupo tratado com EE2 apresentou expressão diminuída do receptor de estrógeno e aumento da expressão do receptor de progesterona, como mostrado nas figuras a seguir:

Figura 6. Expressão gênica do receptor de estrógeno (ER $\alpha$ )

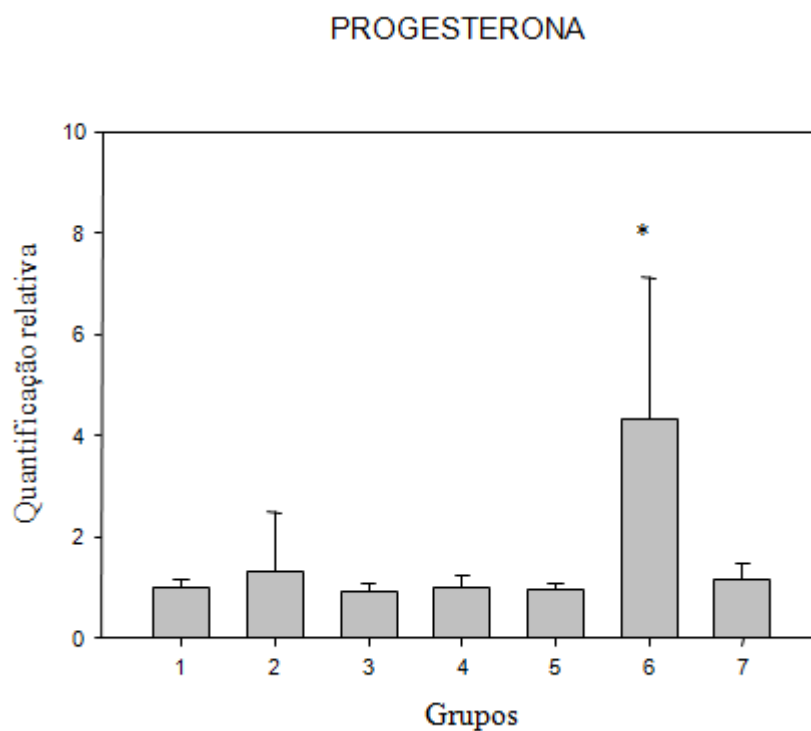
grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc./dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l//kg pc. Dados não-paramétricos; \*p<0,05 significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

Figura 7. Expressão gênica do Hoxa 10



grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc./dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l/kg pc. Dados não paramétricos: ausência de diferenças significativas em relação ao controle negativo (água deionizada) com  $*p < 0,05$ .

Figura 8. Expressão gênica do receptor de progesterona



grupo 1: água deionizada; grupo 2: extrato de água ultra-pura; grupo 3: 33,3 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 4: 166,5 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 5: 333 ml/kg pc./dia de extrato de água de beber; grupo 6: controle positivo 17  $\alpha$ -etinilestradiol, 1 ug/kg pc./dia; grupo 7: atrazina, 3,73 ng/l/kg pc. Dados não-paramétricos; \* $p < 0,05$  significativamente diferente do grupo controle negativo (água deionizada).

## 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O principal parâmetro do ensaio uterotrófico para a avaliação de estrogenicidade é o aumento do peso uterino devido a intumescimento do órgão (OECD, 2007). Os estrógenos (naturais ou sintéticos) agem como ligantes de receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  no útero, podendo ativar ou inativar, respectivamente, as suas atividades transcricionais. O aumento de peso uterino é resposta a eventos moleculares, celulares e teciduais que ocorrem no útero após ligação com receptor, como o aumento de eletrólitos e embebição de água. Adicionalmente, o útero responde ao EE2 com aumento de divisões celulares; a resposta mitótica é maior no epitélio, seguido do estroma e miométrio. As células uterinas também sofrem alterações morfológicas, como aumento da altura do epitélio luminal e diferenciação para um formato colunar, aumento da altura do epitélio glandular e da espessura estromal (OECD, 2007; USEPA, 2009).

Apesar dos animais tratados com o EE2 terem apresentado intumescimento uterino, como esperado, nenhum dos animais controle negativo ou tratados com o extrato de água de beber apresentou útero cheio. A análise morfométrica do útero mostrou que a espessura endometrial e miometrial dos grupos tratados não diferiu do controle negativo. Somente o grupo do EE2 teve a espessura do endométrio e miométrio aumentadas.

Não foi encontrada queratinização do epitélio vaginal em nenhum dos grupos tratados com a amostra ou controle negativo. A cornificação vaginal na pré-puberdade é um indicador de puberdade precoce e pode ser decorrente de exposição a xenoestrógenos (JONES e EDGREN, 1973); no entanto, não houve alteração nos animais tratados com o extrato de água de beber. Nesses animais encontrou-se apenas o extrato mucificado na superfície epitelial devido ao estágio pré-púbere em que se encontravam. Já o EE2 induziu o aparecimento de células queratinizadas anucleadas sob o extrato granuloso, formando o extrato córneo. Todos os animais desse grupo apresentaram epitélio vaginal completamente cornificado.

Em relação às dosagens hormonais e expressão gênica do HOXA 10 e dos receptores de estrógeno (ER $\alpha$ ) e progesterona, também não houve alterações significativas em nenhum dos grupos tratados com o extrato, o que por fim, indica a não estrogenicidade da amostra de água estudada. Esses dados corroboram os dados do estudo *in vitro* com leveduras bioluminescentes, que também não demonstraram estrogenicidade ou androgenicidade da amostra de água testada, independente do limite de quantificação do teste.

Os grupos tratados com água deionizada e extrato de água ultrapura com DMSO, respectivamente, serviram para demonstrar que não houve influência do DMSO usado para

diluir os extratos durante os tratamentos. O mesmo solvente foi utilizado no extrato de água de beber e não apresentou diferenças significativas com relação aos parâmetros avaliados.

Neste estudo foi incluído um grupo de animais expostos à atrazina, agente identificado em baixos níveis em amostra de água de beber coletada em 2010 desta mesma ETA. A dose adotada deste herbicida (3,73 ng/l/kg p.c.) foi baseada em concentração encontrada nesta amostra de 2010, e objetivou avaliar o efeito da atrazina em doses relativamente baixas. Esse grupo também serviu como referência para avaliar efeitos de IE que atuam indiretamente, afetando as vias estrogênica e androgênica através da supressão de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e interferem na modulação da esteroidogênese (WILLET, BISHOP e SULLIVAN, 2011). Porém, como não houve alterações significativas em nenhum dos parâmetros investigados, concluímos que a atrazina não teve efeito nesses animais, na dose e condições de avaliação adotadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.J.M; ARAÚJO, S; SANTANA, G.M; OHI, M; DALSENTER, P.R. Screening for the in vivo (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 35: 379-382, 2002.

ASHBY, J., LEFEVRE, P.A., ODUM, J. TINWELL, H., KENNEDY, S.J., BERESFORD, N., SUMPTER, J.P. Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: implications for lists of endocrine-disrupting chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 26: 96-101.

BAKER, V.A. Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in Vitro*.15: 413-419, 2001.

BILA, D, M; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, São Paulo. v. 30, n. 3, jun.2007.

CASERTA, D; MARANGHI, L; MANTOVANI, A; MARCI, R; MARANGHI, F; MOSCARINI, M. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. *Hum Reprod Update*. 2008;14(1):59-72.

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1999) Relatório técnico preliminar sobre a Bacia do Rio Atibaia. Projeto Watershed 2000 – Gestão Ambiental dos Recursos Hídricos no Estado de São Paulo.

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2007). Relatório de qualidade das águas subterrâneas-2004/2006, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Série Relatórios, São Paulo.

CLODE, A, S. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 20:35-43, 2006.

COUSE, J.F; LINDZEY, J; GRANDIEN, K; GUSTAFSSON, J.A; KORACH, K.S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology*. 138: (11) 4613-4621, 1997.

EDSTAC - Endocrine Disruptor and Testing Advisory Committee (1998). Final Report, EPA/743/R-98/003.

ERICKSON, B. E. Analysing the ignored environmental contaminants. *Environmental Science & Technology*, v. 36, p. 140-145. 2002.

HABIBI, J; M, HUYARD, A; ESPERANZA, M; BRUCHET, A. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: the benefit of wastewater treatment. *Water Research*. 43:1565-1576,2009.

JARDIM, W, F; MONTAGNER, C, C; PESCARA, I, C; UMBUZEIRO, G,A; BERGAMASCO, A,M,D,D; ELDRIDGE, M,L; SODRÉ, F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology*. v.84, p.3-8. Jan 2012.

JOHNSON, A. C; WILLIAMS, R. J; A Model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental Science and Technology*. v. 38, n. 13, p.3649–3658, mai. 2004.

JONES, R.C; EDGREN, R.A. The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil Steril*. 24:284-291.

KITTEL, B; RUEHL-FEHLERT, C *et al*. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*, v.55, n.6, Jul, p.413-31. 2004.

KLINGE, CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:2905-19.

KOIFMAN, S;KOIFMAN, R.J; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2002; 18(2): 435-45.

LU, Q.W; CHEN, X.N; YUE, F; JENTER, C; GMINSKI, R; Li, X. Y; XIE, H; MERSCH-SUNDERMANN, V. Studies on the in vivo and in vitro mutagenicity and the lipid peroxidation of chlorinated surface (drinking) water in rats and metabolically competent human cells. *Mutation Research*. 513: 151–157, 2002.

NACIFF, J.M. e DASTON, G.P. Toxicogenomic approach to endocrine disrupters: identification of a transcript profile characteristic of chemicals with estrogenic activity. *Toxicologic Pathology*, 32 (2): 59-70, 2004.

NOGUEIRA, J.M.F. Desreguladores Endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. *Química: Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 88, 65-71, 2003.

MEYER, A; SARCINELLI, N; MOREIRA, C.J. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação dos desreguladores endócrinos? *Caderno de saúde pública*, Rio de Janeiro. v. 15, n. 4, p. 845-850, out/dez. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v15n4/1024.pdf>. Acesso em: julho de 2013.

MURK, A. J; LEGLER, J *et al*. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ Toxicol Chem*, v.21, n.1, Jan, p.16-23. 2002.

ODUM, J.;LEFEVRE, P.A.;TITTENSOR, S; PATON, D; ROUTLEDGE, E.J.; BERESFORD, N.A; SUMPTER, J.P; ASHBY, J. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 25: 176-188, 1997.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (1999). EMSG OECD draft proposal for testing of adequacy of an enhanced OECD protocol, Repeated dose (28 days) toxicity (oral) study, based on OECD 407. OEC, Paris.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (2007). Uterotrophic bioassay in: a short-term screening test for oestrogenic properties. In OEDC Guideline for testing of Chemicals 440. 2007:1-21. OEDC, Paris.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (1997). EPA/630/R-96/012: Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington: USEPA; 1997.

USEPA United States Environmental Protection Agency (2007). Validation of screening and testing assays proposed for the EDSP. Washington: USEPA; 2007.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). OPPTS 890.1600: Uterotrophic Assay. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC. EPA ICR No. 740-C-09-0010, 2009.

USFDA – US Food and Drug Administration (2000). Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of food Ingredients. IV.C.9.a. Guidelines for Reproductive Studies. US Food and drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington DC.

SANSEVERINO, J., R. K. GUPTA, *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. *Appl Environ Microbiol*, v.71, n.8, Aug, p.4455-60. 2005.

SODRÉ, F. F; LOCATELLI, M. A. F; Jardim, W. F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 216-219. 2010.

WILLET, C.E. BISHOP, P.L; SULLIVAN, K.M. Application of an Integrated Testing Strategy to the US EPA Endocrine Disruptor Screening Program. *Toxicological Sciences*, Oxford. p. 15-25, jun.2011.