

# Disruptores endócrinos: descrição dos métodos para avaliação *in vivo* de produtos químicos com efeito estrogênico

*Endocrine disruptors: methods description for in vivo evaluation of chemicals with estrogenic effects*

Rafael Moraes Pinto\*

Eduardo Siqueira Fernandes\*

Vera Maria Peters\*\*

Martha de Oliveira Guerra\*\*

PINTO, R. M.; FERNANDES, E. S.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Disruptores endócrinos: descrição dos métodos para avaliação *in vivo* de produtos químicos com efeito estrogênico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 21-25, 2008.

---

**Resumo:** A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) criou um grupo de trabalho para validar os métodos-teste para detecção de disruptores endócrinos. Esta breve revisão descreve o ensaio *in vivo* recomendado pela OECD para detecção de substâncias com efeito estrogênico.

**Palavras-chave:** Disruptores endócrinos. Rato. Diretrizes. Estrogênio.

---

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos evidenciou-se que muitos produtos químicos, presentes no meio ambiente, podem interferir com as ações fisiológicas dos hormônios endógenos. Estas substâncias podem imitar, antagonizar, ou interferir com hormônios endógenos e, por isso, foram chamados de disruptores endócrinos (DARBRE, 2006b).

Os disruptores endócrinos, que além de serem encontrados no meio ambiente, podem também ser provenientes de produtos sintéticos, atuam, principalmente, no genoma celular como agonistas ou antagonistas dos receptores de esteróides. Com este mecanismo de ação podem causar a pro-

dução de hormônios ou até mesmo o bloqueio do processo de síntese hormonal e, com isso, provocar interferência nas funções sistêmicas do organismo (WARING e HARRIS, 2005; TABB e BLUMBERG, 2006).

Dentre os efeitos causados pela alteração hormonal, os disruptores endócrinos podem alterar a função reprodutiva e causar feminização por ligação a receptores de estrogênio ou androgênio (WARING e HARRIS, 2005; TABB e BLUMBERG, 2006) bem como interferir com o crescimento mamário, a lactação e predispor a doenças uterinas como fibroses e endometriose (MCLACHLAN et al., 2006). Podem ainda ligar-se a receptores tireoidianos e desregular o sistema neuroen-

---

\* Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora.

\*\* Pesquisadora do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora.

dócrino (WARING e HARRIS, 2005; WHITEHEAD e RICE, 2006). Além disso, evidências sugerem uma possível correlação entre a utilização de produtos cosméticos (DARBRE, 2006a) e fitoestrogênios com o aumento da incidência de câncer de mama, caracterizando a interferência causada pelos disruptores endócrinos (WUTTKE et al., 2003; DARBRE, 2006a).

Os disruptores endócrinos podem ainda possuir outros mecanismos de ação e, quando não agem no genoma, podem alterar a síntese enzimática de subprodutos hormonais causando alteração na função imune, alteração comportamental e da memória (WARING e HARRIS, 2005; WHITEHEAD e RICE, 2006).

Atualmente, os estudos concentram-se na avaliação da interferência dos disruptores endócrinos durante o período pré-natal e pós-natal inicial pois estas fases de crescimento caracterizam-se pelo rápido crescimento e pela grande dependência de ações hormonais. Perturbações no sistema endócrino durante estes períodos podem causar, tardiamente, alterações anatômicas, fisiológicas, comportamentais e até mesmo predispor ao desenvolvimento de doenças (VANDENBERGH, 2004; DICKERSON e GORE, 2007). Durante o desenvolvimento intra-uterino podem determinar crescimento intra-uterino restrito bem como alteração na maturação do cérebro e das gônadas (SCHOETERS et al., 2008). Tardiamente podem causar puberdade precoce e aumento da incidência de cânceres como o câncer vaginal e o câncer de próstata (VANDENBERGH, 2004; DICKERSON e GORE, 2007).

## REGULAMENTAÇÃO

Através da análise dos resultados de estudos indicando interferência de substâncias na saúde humana, os órgãos reguladores internacionais iniciaram esforços para padronização de métodos eficazes para a detecção de substâncias potencialmente nocivas para a fisiologia hormonal.

Em 1998, na Europa, a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Co-operation and Development) (OECD) (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1998) e no mesmo ano, nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency) (EPA) iniciaram o desenvolvimento de um novo protocolo para rastreamento e teste de potenciais disruptores endócrinos (COOK et al., 1997; FENNER-CRISP, 1997; LUCIER, 1997; RHOMBERG, 1997).

Para o desenvolvimento de um novo protocolo, a OECD, organizou um grupo de trabalho que analisou as diversas metodologias para detecção de disruptores endócrinos e, dentre eles o teste *in vivo* de uterotropismo em ratos se mostrou bastante eficaz na detecção de agonistas ou antagonistas do estrogênio. Foram também realizados estudos multicêntricos para validação da técnica (KANNO et al., 2001; KANNO et al., 2003a; b; OWENS et al., 2003; OWENS e KOETER, 2003). Após a divulgação dos trabalhos e discussão dos resultados, o grupo de estudo atualizou o protocolo para rastreamento de substâncias com propriedades estrogênicas (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2007) que será sumarizado a seguir.

## PROTOCOLO

### PRINCÍPIO DO MÉTODO

O desenvolvimento do método consiste no fato de que o útero responde à ação do estrogênio de duas maneiras: em um momento inicial há aumento no peso do órgão causado pelo acúmulo de líquido sendo seguido pelo aumento de peso uterino causado pelo crescimento tecidual. Esta resposta uterina ao estrogênio ocorre de maneira rápida e vigorosa particularmente em roedores, sendo esse o modelo animal utilizado para este tipo de estudo.

O estudo deve ser feito quando o eixo hipotálamo-hipófise-ovário não está funcionando levando a circulação de baixos níveis de estrogênio endógeno. Isto garantirá o peso uterino baixo e um grande potencial de resposta do útero se a substância teste possuir efeito estrogênico.

### MODELO ANIMAL

O modelo animal escolhido para o desenvolvimento do experimento é o roedor, sendo o rato o modelo mais utilizado.

Para a avaliação da substância são utilizados animais com o eixo hipotálamo-hipófise-ovário não funcionando sendo descritos dois modelos para este fim:

- Fêmeas imaturas (após o desmame e antes da puberdade) e
- Fêmeas adultas jovens ooforectomizadas (utilizadas após decorrido algum tempo da cirurgia para se obter a involução uterina).

Os dois modelos são válidos, comparáveis e com reprodutibilidade semelhante. Os animais imaturos diferem dos animais ooforectomizados por ainda não terem o eixo hipotálamo-hipófise-ovário funcionando, sendo as-

sim, mais sensíveis na detecção das substâncias, sendo o modelo de escolha quando são investigadas substâncias com menor potencial estrogênico.

### ANIMAIS IMATUROS

Os animais imaturos deverão receber a substância teste de modo que ao término da administração das doses não ocorra o aumento fisiológico dos estrogênios endógenos, associado ao início da puberdade. Para isto, cada laboratório deverá analisar as características de sua colônia, determinando a data do início da puberdade, de forma a definir a melhor data para o início do ensaio. O dia de nascimento deve ser especificado e geralmente é considerado como o dia zero de nascimento. O último dia de administração deve ser preferencialmente no dia 21 de vida podendo se estender até o dia 25 em alguns casos.

### ANIMAIS OOFORECTOMIZADOS

A cirurgia de ooforectomia geralmente é realizada entre seis e oito semanas de idade. Após a cirurgia, é necessário um intervalo mínimo de 14 dias para o início da administração das substâncias, para garantir a completa involução uterina.

O procedimento cirúrgico deve ser realizado com técnica asséptica e no pós-operatório deve ser utilizada analgesia, seguindo as regras da ética e bem estar animal.

### CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

A temperatura da sala dos animais deverá ser de  $22^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$  com umidade relativa do ar mínima de 30% e máxima 70%. A iluminação deverá ser artificial com o ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração deverão ser oferecidas à vontade. A ração deverá ser escolhida criteriosamente para garantir que não haja substâncias com efeito estrogênico – como alta concentração de alfafa e soja – e causar interferência no estudo. Este cuidado também deve ser tomado com os materiais utilizados como forragem da caixa.

Após um período de aproximadamente cinco dias de aclimação os animais são divididos em grupos controle e tratados. Os animais adultos deverão ser alojados em caixas individuais ou em grupos de até três animais. Devido à idade, é recomendado que as fêmeas imaturas sejam alojadas em grupos.

### GRUPOS EXPERIMENTAIS

Deverão ser realizados no mínimo dois grupos experimentais que receberão doses diferentes da substância

a ser testada além do grupo controle. Cada grupo deverá conter no mínimo seis animais. O peso dos animais não deverá variar mais do que 20% da média de peso corporal do grupo e o a média de peso dos grupos não poderá ser diferente estatisticamente.

### ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

As substâncias são administradas diariamente, no mesmo horário, via oral ou via injeção subcutânea por, no mínimo, três dias consecutivos. Quando utilizados os animais ooforectomizados, o tratamento poderá se estender além de sete dias de acordo com a substância analisada, principalmente quando se tratar de um agonista fraco do estrogênio. As doses escolhidas para o tratamento devem ser tais que garantam a sobrevivência dos animais e não causem efeitos tóxicos até o máximo de 1000mg/kg/dia por animal. Quando administrado via oral ou subcutânea (região dorsal) o volume máximo a ser administrado não deverá ultrapassar 5mL/Kg de peso corporal, exceto nos casos que utilizem solução aquosa que deverá ser de no máximo 10mL/Kg de peso corporal.

#### Necropsia

Os animais são necropsiados 24 horas após a administração da última dose da substância teste.

### VARIÁVEIS ANALISADAS

- Observação clínica: Deverão ser anotados os casos em que houver mortes, ou qualquer tipo de morbidade ou alteração da normalidade como lacrimejamento, piloereção, mudança de padrão respiratório;

- Peso corporal: Os animais deverão ser pesados diariamente a partir do primeiro dia de tratamento;

- Consumo de ração: poderá ser realizado através do consumo de ração por caixa, dividindo-se o consumo pelo peso dos animais da mesma caixa ou individualmente;

- Abertura vaginal: nos animais imaturos deverá ser observada a presença ou ausência de abertura vaginal;

- Peso uterino: O útero deve ser cuidadosamente removido, sendo rapidamente dissecados o tecido gorduroso e conjuntivo, aderidos aos cornos e, nos animais impúberes, também os ovários e ovidutos. É importante que o processo seja rápido para evitar o ressecamento do material. Nos animais ooforectomizados, se houver restos de ovários, o útero deve ser descartado. A vagina é separada do útero logo abaixo da cérvix pois esta faz parte do órgão;

- O útero deve ser pesado com e sem o seu conteúdo fluido;

- Análise histopatológica: Útero e vagina são fixados em formol 10%, processados histologicamente, corados com Hematoxilina-Eosina e analisados sob microscópio. Especificamente na vagina é observado o grau de queratinização e cornificação.

## ESTATÍSTICA

Os pesos médios uterinos dos grupos tratados são comparados com aqueles do grupo controle para verificação de aumento significativo utilizando nível de significância de 5%. Um aumento estatisticamente significativo no peso médio uterino do grupo tratado é considerado como uma resposta positiva.

## CONCLUSÃO

Em resumo, o método apresentado, segundo a OECD tem sensibilidade suficiente para detectar disruptores endócrinos com efeito agonista estrogênico, permitindo a predição do risco do consumo humano.

PINTO, R. M.; FERNANDES, E. S.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Endocrine disruptors: methods description for *in vivo* evaluation of chemicals with estrogenic effects. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Universidade Federal de Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 21-25, 2008.

**Abstract:** The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has set up a task force to validate test methods for the detection of endocrine disruptors. This brief review describes the rodent *in vivo* assay recommended by OECD for the detection of oestrogens.

**Keywords:** Endocrine disruptors. Rat. Guideline. Estrogen.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao suporte financeiro da REDE MINEIRA DE FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA – FAPEMIG e da REDE MINEIRA DE BIOTERISMO – FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

COOK, J. C., et al. development of a tier i screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 26, n. 1, p. 60-68, 1997.

DARBRE, P. D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 1, p. 121-143, 2006a.

\_\_\_\_\_. Preface. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 1, p. vii-x, 2006b.

DICKERSON, S. M.; GORE, A. C. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 8, n. 2, p. 143-159, 2007.

FENNER-CRISP, P. A. Endocrine disruptor risk characterization: an epa perspective. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 26, n. 1, p. 70-73, 1997.

KANNO, J., et al. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: phase 1. **Environ. Health. Perspect.**, v. 109, n. 8, p. 785-794, 2001.

\_\_\_\_\_. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. **Environ. Health. Perspect.** v. 111, n. 12, p. 1550-1558, 2003a.

\_\_\_\_\_. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. **Environ. Health. Perspect.** v. 111, n. 12, p. 1530-1549, 2003b.

LUCIER, G. W. Dose-response relationships for endocrine disruptors: what we know and what we don't know. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 26, n. 1, p. 34-35, 1997.

MCLACHLAN, J. A.; SIMPSON, E.; MARTIN, M. Endocrine disruptors and female reproductive health. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 1, p. 63-75, 2006.

OECD. Report of the first meeting of the oecd endocrine disrupter testing and assessment (EDTA) working group. **Organisation for Economic Cooperation and Development**. Paris: 10-11. 1998. (ENV/MC/CHEM/RA (1998) 5).

OECD. Uterotrophic bioassay in rodents: a short-term screening test for oestrogenic properties. OECD guideline for the testing of chemicals number 440. **Organisation for Economic Co-operation and Development**. 16 October. 2007. (ENV/EPOC (2007)10).

OWENS, W., et al. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dietary phytoestrogen analyses. **Environ. Health. Perspect.**, v. 111, n. 12, p. 1559-1567, 2003.

OWENS, W.; KOETER, H. B. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. **Environ. Health. Perspect.**, v. 111, n. 12, p. 1527-1529, 2003.

RHOMBERG, L. Beyond screening: problems and prospects for risk characterization of endocrine disruptors. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 26, n. 1, p. 74-79, 1997.

SCHOETERS, G., et al. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. **Basic Clin. Pharmacol.**, v. 102, n. 2, p. 168-175, 2008.

TABB, M. M.; BLUMBERG, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. **Mol. Endocrinol.**, v. 20, n. 3, p. 475-482, 2006.

VANDENBERGH, J. G. Animal models and studies of in utero endocrine disruptor effects. **ILAlaR J.**, v. 45, n. 4, p. 438-442, 2004.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disruptors: a human risk? **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 244, n. 1-2, p. 2-9, 2005.

WHITEHEAD, S. A.; RICE, S. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 20, n. 1, p. 45-61, 2006.

WUTTKE, W., et al. Phytoestrogens: endocrine disruptors or replacement for hormone replacement therapy? **Maturitas**. v. 44, Suppl 1, p. S9-20, 2003.

