

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células
humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina**

Ana Margarida Moreira Vicente

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Ana Margarida Moreira Vicente

Professora Doutora Deodália Dias, do Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (orientadora interna)

Doutora Maria João Silva, do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. (orientadora externa)

Dissertação
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

RESUMO

O Estuário do Sado é um ecossistema de elevado valor ecológico e económico, devido às várias atividades de pesca que suporta. Contudo, esses valores estão ameaçados pela contaminação dos sedimentos e da água do estuário por compostos com um reconhecido potencial mutagénico e carcinogénico. Este trabalho pretendeu contribuir para a avaliação do risco para a saúde humana decorrente da contaminação do Estuário do Sado, através da caracterização do potencial citotóxico e genotóxico de extratos fracionados obtidos a partir de amostras de sedimentos. Para além disso, pretendeu-se implementar um ensaio de avaliação das propriedades de desregulação endócrina das mesmas amostras.

Os sedimentos recolhidos em três locais de pesca do Estuário do Sado (A, C e P) foram fracionados com solventes de diferentes polaridades: n-hexano (fração 2), diclorometano (fração 3) e metanol (fração 4). Tentou implementar-se o ensaio *E-screen* em células MCF-7, utilizando-se o 17- β -estradiol e o Bisfenol A, como controlo positivo. A caracterização da citotoxicidade e da genotoxicidade foi realizada em células HepG2, recorrendo-se, respetivamente, ao ensaio do vermelho neutro e ao ensaio cometa. As células MCF-7 foram expostas durante um período de 5 dias a várias concentrações dos controlos positivos, de modo, a se medir a proliferação celular. Não se conseguiu no entanto obter nos diferentes ensaios realizados uma reprodutibilidade do método. No ensaio do vermelho neutro foi observada uma diminuição da viabilidade celular principalmente nas frações A4, P3 e P4 o que sugere a existência de contaminantes nestas frações com capacidade de induzir citotoxicidade. No que diz respeito aos efeitos ao nível do ADN, observou-se uma elevação significativa do nível de lesões no ADN apenas nas frações 2 e 4 da amostra P.

As diferenças registadas nos efeitos citotóxicos e genotóxicos entre as frações e as várias amostras sugerem que existem diferentes contaminantes nestas amostras, e além disso que diferentes contaminantes são extraídos com cada um dos compostos usados na preparação das diferentes frações. Estes resultados refletem as diferentes pressões exercidas ao longo do Estuário do Sado, e salientam a importância de estabelecer associações entre a identificação e quantificação dos contaminantes presentes nas amostras com os seus efeitos biológicos de modo a tentar tirar ilações sobre um potencial impacto na saúde humana.

Palavras-chave: Estuário; sedimentos; fracionamento; desregulação endócrina; genotoxicidade.

ABSTRACT

The Sado Estuary is an ecosystem of high ecological and economic value, due to the fishing activities performed by the local population. Nevertheless, these values are threatened by the contamination of the estuary's sediments and waters, by compounds with a recognized mutagenic and carcinogenic potential. This study aims to contribute to the evaluation of the potential risk to the human health, associated with the Sado Estuary's contamination, through the characterization of the cytotoxic and genotoxic potential of fractionated extracts obtained from sediment samples. Furthermore, it was intended to implement an assay to evaluate the endocrine disrupting properties of the same samples.

The collected samples from 3 fishing sites of the Sado Estuary (A, C and P) were fractionated with solvents of different polarities: n-hexane (fraction 2), dichloromethane (fraction 3) and methanol (fraction 4). The implementation of the E-screen assay in MCF-7, using 17- β -estradiol and Bisphenol A, as positive controls was attempted. The characterization of cytotoxicity and genotoxicity was performed in HepG2 cells by the Neutral Red and Comet assays, respectively. MCF-7 cells were exposed for 5 days to differences concentrations of the positive controls, in order to measure cellular proliferation. The method reproducibility was not achieved in the different assays performed. In the Neutral Red assay, a decrease in cell viability was observed, mainly for fractions A4, P3 and P4, which suggests the existence of contaminants in these fractions, with the ability to induce cytotoxicity. Regarding the effects at the DNA level, a significant increase in the level of DNA damage was observed for fractions 2 and 4 of sample P.

The observed difference in cytotoxic and genotoxic effects, between fractions and samples, suggests the existence of different contaminants in these samples, and, furthermore, that different contaminants are extracted with each solvent used in the extraction process. These results reflect the different anthropogenic pressures along the Sado Estuary's margins, and emphasize the importance of establishing associations between the identification and quantification of contaminants in sediments and their biological effects, in order to assess the potential impact of the human health.

Keywords: Estuary; sediments; fractionation; endocrine disrupting; genotoxicity.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora Maria João Silva, pela oportunidade que me deu de colaborar neste projeto, pelos ensinamentos que me proporcionou, pela ajuda dada nos momentos mais complicados e pela disponibilidade que sempre me demonstrou ao longo de todo este tempo da tese.

Agradeço também à professora Deodália Dias por todo o apoio e disponibilidade demonstrada e por me ter aceite como sua orientanda.

Em segundo lugar gostaria de agradecer a algumas pessoas que sem o seu apoio não seria possível a realização desta tese. À Henriqueta Louro pela paciência em me ensinar algumas das técnicas de trabalho. À Ana Maria Tavares pela amizade, paciência, ajuda durante todos os ensaios e ainda pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei e que tinha dúvidas. Ao Miguel Pinto, cuja ajuda foi fundamental para a realização desta tese, obrigado por todo o apoio e ajuda, tanto durante os ensaios como posteriormente na análise dos resultados. E também pelos ensinamentos que me tentou transmitir, mais uma vez obrigado.

Ao Doutor José Manuel Furtado por todo o aconselhamento e ajuda em relação às culturas de células.

Gostaria também de agradecer à minha mãe, aos meus avós e ao Carlos, por todo o amor e carinho e pela oportunidade que me deram de continuar a estudar. Por todo o apoio, suporte, interesse e por acreditarem em mim durante toda esta jornada, espero deixá-los orgulhosos pela sua aposta em mim. Sou aquilo que sou hoje graças a todos vocês, obrigada mais uma vez por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse alcançar o que sempre quis.

Obrigada também a todos os meus amigos, que estiveram sempre ao meu lado, mesmo aos mais distantes, que apesar disso sempre me apoiaram e me demonstraram que eu conseguiria. De entre estes, á Cristina Venâncio, por toda a amizade demonstrada e por apesar de estarmos distantes fisicamente ser uma presença assídua na minha vida e em todo em percurso, como se de uma irmã se tratasse.

Queria agradecer também a todos os amigos que fui fazendo ao longo do tempo de faculdade, tanto na licenciatura como no mestrado, todos eles à sua maneira, contribuíram para aquilo que sou hoje e me deram momentos muito bons que vou sempre recordar com saudade. Espero, continuar a contar com eles para a etapa que se segue.

Um agradecimento especial às minhas duas companheiras de jornada, Tânia Santos e Dora Mourão, por toda a partilha e desabafos, por toda a paciência e compreensão, por toda a amizade e preocupação e especialmente pelos almoços sempre tão espirituosos. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil de ultrapassar e de se fazer, o vosso apoio foi muito importante para que tudo corresse bem.

Por fim, e não menos importante, gostaria de agradecer ao Miguel, por todo o amor, carinho e confiança depositados em mim. Por toda a paciência, e por estar ao meu lado tanto nos bons como nos maus momentos, e por nesses momentos me dar coragem e ânimo para continuar, demonstrando que acredita em mim e fazendo ver as coisas do lado mais otimista. Por ficar feliz com tudo aquilo que alcancei, por me dar na cabeça e me abrir os olhos quando é necessário. E por fim, por me dar todo o seu amor e partilhar a sua vida comigo.

ÍNDICE

RESUMO	II
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUÇÃO	1
Estuários: importância e contaminação	1
1.1. Contaminação de sedimentos estuarinos	1
1.2. Contaminantes estuarinos identificados e seus efeitos	2
1. Estuário do Sado	5
2.1. Descrição da área de estudo	5
2.2. Contaminação do Estuário do Sado e efeitos biológicos	7
2. Desregulação endócrina	10
3.1. Desreguladores endócrinos	10
3.2. Vias de exposição humana	12
3.3. Atuação a nível do organismo	13
3.4. Efeitos nos animais e ser humano	14
3.5. Métodos de avaliação das propriedades dos desreguladores endócrinos	17
3. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade	18
4.1. Avaliação de citotoxicidade	19
4.1.1. Ensaio gerais	19
4.1.2. Ensaio do vermelho neutro	19
4.2. Avaliação de genotoxicidade	20
4.2.1. Ensaio gerais	20
4.2.2. Ensaio do Cometa	21
OBJETIVOS	23

MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Amostragem de sedimentos	25
2. Extração de contaminantes dos sedimentos	26
3. Cultura celular	26
3.1 Linha celular MCF-7	26
3.2 Linha celular HepG2	27
4. Ensaio <i>E-screen</i>	28
5. Ensaio do Vermelho Neutro	31
6. Ensaio Cometa com enzima FPG	32
7. Análise estatística	35
RESULTADOS	37
1. Ensaio <i>E-screen</i>	37
2. Ensaio do Vermelho Neutro	42
3. Ensaio Cometa com enzima FPG	47
DISCUSSÃO	57
1. Avaliação da desregulação endócrina	57
2. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	77
Anexo 1 - Valores dos parâmetros do ensaio do Cometa	88
Anexo 2 – Intervalos dos valores de contaminantes das amostras C, A e P do Estuário do Sado	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos estrogénios 17- β -estradiol e 17- α -etinilestradiol.....	5
Figura 2 – Mecanismo de atuação dos desreguladores endócrinos	14
Figura 3 – Padrão da proliferação das células quando expostas ao composto 17- β -estradiol	18
Figura 4 – Mapa do Estuário do Sado e respetivas zonas de amostragem (P, C e A)	25
Figura 5 – Aspeto de culturas de células MCF-7	27
Figura 6 – Aspeto de culturas de células HepG2.....	28
Figura 7 – Esquema geral do ensaio <i>e-screen</i>	30
Figura 8 – Esquema geral do ensaio do vermelho neutro	32
Figura 9 – Esquema geral do ensaio do cometa com tratamento enzimático	34
Figura 10 – Resultados do Ensaio 1 do método <i>E-screen</i> após a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações	37
Figura 11 – Resultados do Ensaio 2 do método <i>E-screen</i> após a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações.....	38
Figura 12 – Resultados do Ensaio 3 do método <i>E-screen</i> após a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações.....	39
Figura 13 – Resultados do Ensaio 4 do método <i>E-screen</i> após a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações.....	40
Figura 14 – Resultados do Ensaio 5 do método <i>E-screen</i> após a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações.....	41
Figura 15 – Resultados do Ensaio 5 do método <i>E-screen</i> após a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto Bisfenol A em diferentes concentrações.....	42
Figura 16 – Resultados do ensaio do VN aquando a exposição de 48h das células	

HepG2 a diferentes concentrações da fração 2 (n-hexano) das diferentes amostras do Estuário do Sado.	43
Figura 17 – Resultados do ensaio do VN aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 3 (diclorometano) das diferentes amostras do Estuário do Sado.	44
Figura 18 – Resultados do ensaio do VN aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 4 (metanol) das diferentes amostras do Estuário do Sado.	46
Figura 19 – Resultados do ensaio do cometa aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 2 (n-hexano) das diferentes amostras do Estuário do Sado.	48
Figura 20 – Resultados do ensaio do cometa aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 3 (diclorometano) das diferentes amostras do Estuário do Sado	49
Figura 21 – Resultados do ensaio do cometa aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 4 (metanol) das diferentes amostras do Estuário do Sado	50
Figura 22 – Distribuição da percentagem média de nucleóides observados por classes	53
Figura 23 - Distribuição da percentagem média de nucleóides observados por classes	54
Figura 24 – Distribuição da percentagem média de nucleóides observados por classes	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações mínima e máxima de contaminantes metálicos em sedimentos recolhidos no Estuário do Sado	8
Tabela 2 - Concentrações mínima e máxima de contaminantes orgânicos em sedimentos recolhidos no Estuário do Sado	9
Tabela 3 - Visão global dos riscos de contaminação dos sedimentos recolhidos no Estuário do Sado	10
Tabela 4 – Caraterização de algumas substâncias classificadas com desreguladores endócrinos	12
Tabela 5 – Alguns efeitos provocados por desreguladores endócrinos em diversas espécies	16
Tabela 6 – Caraterização ambiental e data de colheita das amostras	25
Tabela 7 – Constituição dos tampões utilizados no ensaio do cometa	33
Tabela 8 – Percentagem média de viabilidade celular obtida para o valor mínimo das concentrações testadas, no ensaio do VN após a exposição às frações e respetivos IC ₅₀	47
Tabela 9 – Percentagem média de danos no ADN sem e com a enzima FPG na concentração máxima testada (\pm EP)	51
Tabela 10 – Percentagem dos sítios sensíveis à enzima FPG na concentração máxima testada (\pm EP)	51
Tabela 11 – Resultados da comparação estatística entre as mesmas frações de amostras diferentes	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ARN** – Ácido ribonucleico
- As** - Arsénio
- ATCC** – *American Type Culture Collection*
- ATP** – Adenosina trifosfato
- Cd** – Cádmiio
- CO₂** - Dióxido de carbono
- Cr** - Cromo
- Cu** - Cobre
- DDT** – Dicloro-Difenil-Tricloroetano
- DMEM** - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO** – Sulfóxido de dimetilo
- EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético
- EEQ** – Quantidade de equivalência de estradiol
- EP** – Erro padrão
- EPL** – Efeito Proliferativo
- ER** – Eficácia Relativa
- EUA** – Estados Unidos da América
- FCS** –*stripped* – Soro fetal sem hormonas
- FPG** - *Formamidopyrimidine DNA Glycosylase*
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogénio
- GC-MS** – *Gas chromatography-mass spectrometry*
- HAP** – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- HEPES** – Ácido 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico
- HepG2** – Linha celular de cancro hepatocelular humano

ICP-MS – *Inductively coupled plasma mass spectrometry*

IARC – *Internacional Agency for Research on Cancer*

IC₅₀ – Concentração inibitória a 50%

MCF-7 – Linha celular de cancro mamário

MTT – Metilo de tetrazólio

Pb - Chumbo

PCB – Bifenilo Policlorado

PEL – *Probable effect level*

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Seq – Sedimento equivalente

SFBi – Soro Fetal Bovino inativado

SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient.*

TEL – *Threshold effect level*

TFS – Tampão fosfato salino

VN – Vermelho Neutro

Zn - Zinco

INTRODUÇÃO

1. Estuários: importância e contaminação

1.1. Contaminação de sedimentos estuarinos

Os estuários são áreas de grande preocupação, a nível do risco ecológico e ambiental, devido à sua elevada sensibilidade às diversas formas de contaminação. De facto, estes estão sujeitos a pressões antropogénicas constantes de diferentes fontes, tais como a agricultura, a pesca, a indústria e o tráfego marítimo o que os torna sistemas muito complexos. Os estuários estão também sujeitos a descargas regulares de águas residuais, de diversas origens urbanas e industriais, muitas delas contendo contaminantes ambientais persistentes. A complexidade destas áreas marítimas deve-se também ao facto de serem semifechadas, com uma capacidade de autorrenovação limitada e com uma elevada instabilidade [1, 2, 3,4]. Os estuários possuem também um importante papel nas cadeias tróficas aquáticas, isto porque é aí que muitas espécies de peixes pelágicas e bênticas se vão alimentar. Para além destas espécies existem também outras espécies não aquáticas, como alguns mamíferos marinhos ou aves que também recorrem aos estuários para se alimentar, reproduzir e nidificar [5].

Os contaminantes que chegam aos estuários podem ser retidos em sedimentos e resuspensos na coluna de água formando uma mistura ambiental complexa. Esta mistura pode ter diversos efeitos adversos (mutagénicos, genotóxicos e carcinogénicos), nos organismos expostos dado a grande persistência de alguns contaminantes. Para além disso, sendo a água frequentemente utilizada para a rega de terrenos agrícolas e para consumo humano, a sua poluição pode tornar-se um problema de saúde pública. Além da exposição humana direta, os contaminantes também podem chegar ao homem por via indireta, através da bioacumulação que existe desses contaminantes nas espécies aquáticas presentes nos estuários que fazem parte da cadeia alimentar [2,5].

Os contaminantes descarregados nos estuários tem uma propensão para se ligarem às partículas de matéria, e conseqüentemente a acumularem-se nos sedimentos. Este processo de acumulação pode variar de acordo com as características dos sedimentos estuarinos, como por exemplo, a sua composição química e granulometria [3]. Alguns estudos sugerem também que a maioria dos contaminantes se encontra relacionada com os depósitos finos predominantemente ricos em matéria orgânica [3,6]. Além disso, existe também uma grande variedade de fatores abióticos, onde se destacam a temperatura, salinidade e pH que provocam a alteração da biodisponibilidade dos contaminantes [1,2,4].

A contaminação dos sedimentos é também considerada como uma importante parcela da pressão existente à saúde do ecossistema, sendo por isso necessária a avaliação da qualidade desses sedimentos, de modo, a perceber se existe ou não risco perante a sua contaminação. Essa avaliação pode ser realizada no sedimento total ou em extratos de sedimento, recorrendo a diversos testes e não apenas à análise química do sedimento. Atualmente destaca-se a utilização de bioensaios para a avaliação dos riscos genotóxicos, que se tornaram importantes na consequente adoção de estratégias para a monitorização para dos ecossistemas em estudo [3,4]. Apesar de tudo, a aplicação destes testes a sedimentos é um desafio, sobretudo devido à diversificada constituição dos sedimentos, em material inorgânico, matéria orgânica e partículas de minerais. Todos estes fatores vão ter influência na biodisponibilidade, toxicidade e na capacidade de adsorção dos contaminantes pelo sedimento [3,6]. Contudo, não é só a complexidade dos sedimentos que dificulta os bioensaios, existe ainda um conhecimento insuficiente do comportamento dos agentes mutagénicos em mistura no meio ambiente. Devido a este facto, deve-se ter em atenção quando é feita uma avaliação do risco sedimentos aquáticos, de modo a que esta não seja subestimada [3,7].

1.2. Contaminantes estuarinos identificados e seus efeitos

As indústrias são uma das principais fontes de poluição aquática, sendo este um grave problema para o ecossistema aquático e consequentemente para a saúde humana. Estas libertam grandes quantidades de material tóxico, tanto direta como indiretamente, para as águas, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), e metais. Os HAPs são originados durante a combustão incompleta da matéria orgânica, sendo a combustão do carvão e a pirólise os principais processos responsáveis pela libertação destes compostos. Estes compostos são constituídos por dois ou mais anéis aromáticos fundidos e são caracterizados por possuírem apenas hidrogénio e carbono. Sabe-se hoje que uma grande parte desses compostos, aquando de uma exposição ocupacional ou ambiental, são mutagénicos e carcinogénicos sendo já classificados como prováveis agentes cancerígenos ou possíveis agentes cancerígenos para os humanos, correspondendo, respetivamente, aos grupos 2A ou 2B do sistema de classificação da IARC (*International Agency for Research on Cancer*) [8, 9]. No grupo dos HAPs apenas o benzo[a]pireno é classificado pela IARC como cancerígeno para os seres humanos (Grupo1), pois produz metabolitos específicos capazes de causar danos ao nível do ADN [10]. Alguns HAPs, para além de cancerígenos, são compostos

classificados como potenciais desreguladores endócrinos dado que possuem atividade estrogénica, geralmente aliada a um elevado potencial de bioacumulação [11]. Este tipo de compostos, em geral, não se encontram isolados no meio ambiente, fazendo parte de misturas ambientais complexas existentes nos estuários e, que podem provocar vários efeitos prejudiciais na saúde do Homem mas que ainda não estão totalmente compreendidos [8].

Quanto aos metais, que também se encontram presentes, estes são pequenas moléculas essenciais para a manutenção da vida e naturais no meio ambiente. Contudo, muitos deles tornam-se tóxicos e nefastos dependendo do modo de exposição, o estado de oxidação e as suas concentrações no meio. Uma das grandes problemáticas destas moléculas é o facto de não serem degradadas pelos seres vivos, o que faz com que possa existir uma bioacumulação até níveis perigosos. Uma vez no interior do organismo podem interagir com macromoléculas celulares, algumas vias de transdução e ainda alguns processos genéticos. Estes compostos podem ser cancerígenos sob a forma de complexos de metal, partículas metálicas ou iões livres, sendo alguns já classificados pela IARC como cancerígenos e possivelmente cancerígenos para os seres humanos [12]. Existem indícios de que os metais podem induzir indiretamente danos no ADN, sendo o *stress* oxidativo o principal modo de ação que poderá explicar os efeitos cancerígenos e mutagénicos dessas moléculas [12,13].

Um outro composto encontrado nos estuários é o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), um pesticida e um contaminante ambiental altamente persistente, encontrando-se atualmente em sedimentos, solos e alimentos apesar de ter sido proibida a sua utilização há muitos anos atrás. Este facto é demonstrado pelo caso mais famoso de desregulação endócrina atribuído ao DDT e seus subprodutos, muito utilizados nos anos 50 e 60, que se mostrou poder permanecer no meio ambiente durante um largo período de tempo e de possuir uma atividade estrogénica que pode afetar o sistema reprodutivo de alguns mamíferos e aves [11, 14]. Segundo alguns estudos, também tem sido proposto que o DDT e os seus metabolitos podem induzir danos oxidativos no ADN e apoptose celular [15]. O DDT, segundo a IARC, pertence ao grupo 2B, sendo possivelmente cancerígeno para os seres humanos [14]. Como já focado anteriormente, é muito provável que através da ação destes compostos exista uma formação de radicais de oxigénio livres (ROS) que induzam danos no ADN. Biologicamente existe um nível tolerável de radicais de oxigénio livres que, quando ultrapassado, pode causar um aumento no nível de danos oxidativos nas biomoléculas, o que faz com que existam efeitos biológicos deletérios [12, 13, 16].

Além destes compostos, podem ainda existir outros como os bifenilos policlorados (PCBs) que são compostos orgânicos manufacturados pelo Homem em diversas áreas, como em sistemas hidráulicos, retardantes de fogo, adesivos, plásticos e pesticidas [15]. A produção dos PCBs foi proibida na maioria dos países, e segundo a IARC estes são possivelmente cancerígenos, pertencendo ao grupo 2A. Apesar disso, muitos deles ainda persistem no meio ambiente, e tal como os metais, também estes parecem estar associados à indução de *stress* oxidativo e ainda a quebras de ADN [16,17,18].

Por fim existem os desreguladores endócrinos que podem ocorrer de forma natural no meio ambiente, tais como fito estrogénios, resultado das atividades agrícolas, ou podem ainda ser produzidos sinteticamente, como por exemplo pesticidas que englobam inseticidas, herbicidas e fungicidas muito aplicados na agricultura. Outro exemplo são os plásticos e produtos químicos industriais, sendo que algumas destas substâncias já foram proibidas nos EUA devido à enorme capacidade de atividade estrogénica e, conseqüentemente, à capacidade de interferência com as funções endócrinas, sendo os pesticidas o maior grupo de compostos classificados como desreguladores endócrinos [11,19, 20, 21].

Existem vários tipos de desreguladores endócrinos a que é dado um maior realce, sendo a preocupação mais recente os produtos anti-estrogénicos e anti-androgénicos. Contudo, os mais estudados desde sempre são os efeitos dos estrogénios, como o estrogénio sintético 17- α -etinilestradiol (Figura 1) muito utilizado em medicina como terapia de reposição e método contraceptivo, e ainda estrogénios endógenos naturais produzidos pelo corpo humano, como o 17- β -estradiol (Figura 1). A estes dois compostos atribui-se a responsabilidade pela maioria dos efeitos de desregulação endócrina, uma vez que são diariamente excretados pelo ser humano e não são totalmente retirados no tratamento dos esgotos, o que faz com que sejam constantemente lançados nas redes de água existentes, quer sejam fluviais ou de consumo humano [11,19,22].

Ao longo do tempo, foram-se identificando estas substâncias em diversos produtos químicos, como por exemplo produtos de origem industrial, cosméticos, pesticidas, entre outros, o que tem tornado claro que tanto os animais como os seres humanos se encontram expostos a elas, mesmo que seja em baixas concentrações [23, 24].

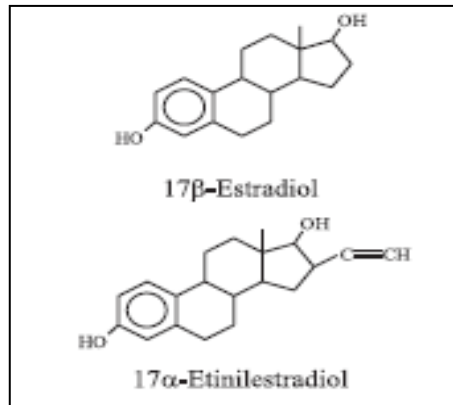


Figura 1 – Estrutura química dos estrogénios 17-β-estradiol e 17-α-etinilestradiol [11]

2. Estuário do Sado

2.1. Descrição da área de estudo

O rio Sado, situado a Oeste da Península Ibérica, flui desde a Serra do Caldeirão até ao Oceano Atlântico, sendo um dos raros rios da Europa que flui de Sul para Norte, passando principalmente por áreas rurais até chegar ao seu estuário [25]. O Estuário do rio Sado é o segundo maior estuário de Portugal, e um dos maiores da Europa, com uma área de aproximadamente 240 km², sendo a maior parte do estuário classificada como reserva natural e por isso protegida, devido à sua grande importância ambiental. Esta reserva inclui também várias praias arenosas cercadas pela típica floresta do mediterrâneo. A península de Tróia, localizada na margem sul deste estuário, é um dos principais locais de lazer e turismo da região. Esta margem é caracterizada também por intensas atividades agrícolas, mais especificamente, campos de arroz. Além disso, o estuário é importante para outras atividades, nomeadamente para a pesca [4,25,26]. A cidade de Setúbal possui um importante porto e ainda uma das maiores zonas industriais do país que engloba fábricas de pasta de papel, estaleiros navais e outras indústrias de armazenagem e transporte de minérios que se encontram diretamente associadas à produção de contaminantes, junto à margem norte do estuário. Existem também outras fontes de poluição nesta margem, como é o caso das minas de cobre localizadas na bacia do Sado que utilizam o estuário como local de descarga dos seus resíduos, sem que exista um tratamento adequado para isso, e ainda os portos e os resíduos urbanos da própria cidade [4, 25, 26]. Em torno do estuário existe ainda uma intensa atividade agrícola, que são é uma fonte de uma parte dos pesticidas e fertilizantes que se encontram a contaminar o estuário. Em conjunto, as atividades desenvolvidas diretamente no estuário ou

em torno dele, são de grande relevância para a economia local, tendo impacto também a nível nacional. Este facto deve-se principalmente à pesca de certas espécies presentes no estuário, que são comercializadas a nível nacional, como é o caso do berbigão (*Cerastoderma edule*), da amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*), do choco (*Sepia officinalis*), do caranguejo (*Carcinus maenas*) e da solha (*Solea senegalensis*) [4,26].

Além das diferentes pressões exercidas em cada uma das margens do estuário existem outras diferenças, principalmente ao nível da hidrodinâmica. Na margem norte existe uma maior acumulação de sedimentos porque nesta margem a hidrodinâmica é reduzida, o que faz com os contaminantes também permaneçam nessa área. Contrariamente, na margem sul existe elevado hidrodinamismo devido às marés que fazem a água circular [26]. Quando existem contaminantes no estuário, mais especificamente nos sedimentos e na coluna de água, os organismos marinhos aí presentes podem absorver-los. Essa absorção vai depender tanto do contaminante como dos fatores bióticos e abióticos. Para avaliar esta contaminação a biomonitorização de exposição aos contaminantes presentes na água é um método utilizado para complementar as análises químicas [26].

A exposição a que os organismos aquáticos se encontram sujeitos, pode constituir um risco ecológico, dado que esta exposição pode ter como consequência vários efeitos biológicos. Além disso, pode constituir também um grave risco para a saúde humana, pois muitos desses organismos aquáticos fazem parte da cadeia alimentar como, por exemplo, diversas espécies de peixes, cefalópodes, entre outras. Estes factos, reforçam a ideia de que é necessária a aplicação de uma política de gestão de conservação e proteção do estuário e, conseqüentemente, de todas as espécies nele presente, sendo algumas emblemáticas por só existirem ali, como é exemplo a população de golfinhos (*Tursiops truncatus*) residentes neste estuário, que viu a sua população ser reduzida, existindo presentemente cerca de 30 animais [25,26]. Devido à grande importância económica que este estuário possui, existe um esforço para se estabelecerem estratégias para a avaliação de risco dos contaminantes do estuário, tanto ao nível ecológico como ao nível da saúde humana, que incluem a análise de contaminantes e da sua toxicidade em organismos aquáticos, e o seu impacto na saúde humana [26].

2.2. Contaminação do Estuário do Sado e efeitos biológicos

Estudos recentes realizados neste estuário demonstraram que na última década houve um aumento significativo da poluição nesta região, o que é suportado e confirmado pelo aumento da eutrofização, dos níveis de nitratos, pesticidas, metais pesados, entre outros [25]. Em estudos anteriores feitos no Estuário do Sado já foram encontrados vários metais com concentrações altas e preocupantes, como o cádmio (Cd), o cobre (Cu) e o zinco (Zn). Observou-se também que os metais estudados apresentam uma distribuição espacial idêntica, sobretudo no que diz respeito às áreas de sedimentação. Além de metais foram também encontrados outros contaminantes como HAPs, PCBs e pesticidas [4,27]. Identificou-se também que a distribuição espacial de diferentes metais se revelou semelhante e, principalmente, perto de fontes antropogénicas, nomeadamente, a norte do canal onde se encontram as descargas provenientes da cidade de Setúbal. Estes mesmos locais possuem uma associação direta com altas cargas orgânicas [4,27]. Também a distribuição espacial dos compostos com potencial de desregulação endócrina revelou um padrão diferente entre áreas de reserva natural e áreas industrializadas, existindo estrogénios naturais e de origem farmacêutica na área que não pertence á reserva, confirmando a alta contaminação de fonte antropogénica em certas zonas do estuário. Contudo, é preciso ter-se em conta todo o hidrodinamismo presente no estuário, que pode levar os contaminantes a depositarem-se preferencialmente numa zona [25]. Além disso, existem estudos que sugerem uma possível variação sazonal dos diferentes desreguladores endócrinos, pois aparentemente existem alguns mais abundantes no verão e outros no inverno [25]. Apesar de diversos estudos revelarem a presença de desreguladores endócrinos estes, individualmente, não parecem representar um elevado risco para a saúde humana e pública, visto que nenhum deles foi encontrado em níveis perigosos. Contudo, quando estes se encontram em conjunto, a sua ação passa a exercer um maior risco na saúde pública [25].

Devido às razões acima mencionadas é importante que os sedimentos deste estuário possuam uma caracterização quanto ao seu índice de contaminação, o que foi realizado recentemente, através da comparação dos valores de concentração obtidos dos diversos compostos presentes nos sedimentos com os valores-guia utilizados para o cálculo do índice de risco ecológico (SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient*) associado a este estuário. Os valores-guia utilizados para este cálculo foram desenvolvidos por Long e Macdonald [28] e são os seguintes: TEL (*Threshold Effect Level*) e o PEL (*Probable Effect Level*). O TEL

carateriza a concentração abaixo da qual não são esperados efeitos adversos ou estes são muito raros para os organismos aquáticos presentes no estuário. Contrariamente o PEL representa a concentração acima da qual são esperados efeitos adversos para estes mesmos organismos. Na Tabela 1 apresentam-se os contaminantes metálicos encontrados no Estuário de maior relevância e os seus valores de concentração mínima e máxima, nesta mesma tabela estes podem ser comparados com os valores-guia, revelando que os contaminantes Cd, Cu e Zn se encontram acima do valor de PEL e conseqüentemente podem provocar efeitos adversos no ecossistema estuarino [29].

Tabela 1 – Concentrações mínima e máxima de contaminantes metálicos em sedimentos recolhidos no Estuário do Sado [Adaptado de 30]

Contaminantes metálicos ($\mu\text{g/g}$)							
Concentração	Cd	Cu	Cr	Zn	Pb	As	SQG-Q
Min	0,4	1,5	1,3	6,4	3,5	2,4	0,04
Máx	6,4*	191*	44	507*	69	37	1,08
TEL	0,68	18,7	52,3	124	30,2	7,24	
PEL	4,21	108	160	271	112	41,6	

TEL – *Threshold effect level*; PEL – *Probable effect level*; SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient*. Os valores de TEL e PEL foram obtidos de Pinto (2011) [30]. O cálculo do índice de SQG-Q encontra-se de acordo com Long and Macdonald (1998) [28]. * Concentração acima do PEL.

O índice de risco ecológico, calculado com os valores obtidos nos contaminantes metálicos deste estuário, revela um valor máximo de 1.08, o que segundo Carreira (2011) [29] possui um potencial moderado para provocar efeitos adversos. Além dos contaminantes metálicos, também já foi estudada a presença de contaminantes orgânicos no Estuário do Sado (Tabela 2) são diversos. Alguns destes contaminantes encontram-se acima do valor de TEL, o que demonstra que possuem o potencial de provocar efeitos adversos nos organismos vivos do estuário apesar de serem raros.

Tabela 2 – Concentrações mínima e máxima de contaminantes orgânicos em sedimentos recolhidos no Estuário do Sado [Adaptado de 30]

Contaminantes orgânicos	Concentração			
	Min	Max	TEL	PEL
Acenaftileno	0,79	2,38	5,87	128
Acenafteno	0,73	12,25*	6,71	88,9
Fluoreno	1,19	15,33	21,2	144
Fenantreno	10,28	63,87	86,7	544
Antracina	2,3	21	46,9	245
Fluoranteno	23,34	345,24*	113	1494
Pireno	21,51	286,33*	153	1398
Benzo[a]antraceno	3,7	93,99*	74,8	693
Criseno	2,35	46,68	108	846
Benzo[a]pireno	5,42	126,76*	88,8	763
Dibenzo[a,h]antraceno	0,66	13,93*	6,22	135
tPCB	0,8	11,97	21,6	189
pp'DDT	0	1,22*	1,19	4,77
SQG-Q	0,027	0,118		

TEL – *Threshold effect level*; PEL – *Probable effect level*; SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient*. Os valores de TEL e PEL foram obtidos de Pinto (2011) [30]. O cálculo do índice de SQG-Q encontra-se de acordo com Long and Macdonald (1998) [28]. * Concentração acima do TEL.

O índice de risco ecológico calculado com os valores obtidos nos contaminantes metálicos deste estuário, revelam um SQG-Q máximo de 0.118, que segundo Carreira (2011) [29] possui um potencial moderado para provocar efeitos adversos. A avaliação feita à qualidade dos sedimentos do Estuário do Sado revelou um índice SQG-Q Total máximo de 0.338, o que confere um risco moderado para este estuário, como já se previa, devido aos dados obtidos em estudos anteriores (Tabela 3) [29,30,31].

Além de todos estes estudos, existem outros que focam aspetos mais específicos, tais como estudos centrados em biomarcadores histopatológicos que demonstraram que os peixes expostos a sedimentos do estuário apresentaram lesões hepáticas [32, 33]. Por outro lado, estudos de genotoxicidade mostraram que as espécies aquáticas, nomeadamente, a solha (*Solea senegalensis*), quando exposta aos sedimentos do estuário sofre danos genotóxicos [1,26]. A toxicidade dos contaminantes dos sedimentos pode ser também influenciada por eventuais interações, sinérgicas ou antagonistas resultantes da existência de uma complexa mistura de contaminantes, como todos os bioensaios realizados anteriormente neste estuário o comprovam [31].

Tabela 3 – Valores de índices (SQG-Q), atribuídos a sedimentos do Estuário do Sado, apresentados por diferentes classes de contaminantes [Adaptado de 30]

Concentração	SQG-Q					SQG-Q Org.	SQG-Q TOTAL
	SQG-Q Metais	SQG-Q DDT's	SQG-Q PAH's	SQG-Q PCB's	SQG-Q Q		
Min	0,04	0,078	0,0089	0,0042	0,027	0,025	
Max	1,08	0,103	0,119	0,063	0,118	0,338	

SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient*

Face ao exposto, torna-se cada vez mais importante realizarem-se estudos de âmbito de caracterização do estuário, contribuindo para uma melhor avaliação, uma vez que quanto mais dados sobre os contaminantes existentes nos sedimentos e os efeitos que esses provocam na saúde pública, melhor pode ser prevenção para minorar o seu risco.

3. Desregulação endócrina

Nas últimas décadas, um dos principais desenvolvimentos em termos de saúde ambiental passou pelo conhecimento de que existem substâncias químicas no ambiente que têm a capacidade de interagir com recetores hormonais [34]. Devido a essa percepção, existe um grande interesse nos efeitos causados por essas substâncias [23]. Além do interesse nos seus efeitos, os ambientalistas estão também interessados nestas substâncias porque a maior parte delas estão incluídas na lista dos contaminantes orgânicos persistentes no meio ambiente, como é o caso de alguns pesticidas organoclorados, dioxinas e bifenilos policlorados [35]. Este é um dos problemas ambientais de carácter mais urgente a ser enfrentado pela toxicologia ambiental [36].

3.1. Desreguladores endócrinos

Os desreguladores endócrinos são descritos como substâncias exógenas que alteram a função do sistema endócrino e que podem causar efeitos adversos para a saúde num organismo intacto ou nos seus descendentes [37]. Estas substâncias têm a capacidade de imitar, modular ou bloquear a síntese de hormonas ou de libertar, metabolizar, transportar, ligar, ou eliminar hormonas naturais, [37] como estrogénios e androgénios [19]. Uma vez que elas são capazes de modular a síntese de estrogénio vão regular também as suas vias de circulação, dado que têm a capacidade de aumentar ou diminuir a concentração deste composto [20]. Estes desreguladores podem também, temporariamente ou permanentemente,

alterar o *feedback* no cérebro, nomeadamente na hipófise, na tiróide, e nas gónadas [19]. Os estrogénios naturais são muito importantes porque promovem a hipertrofia dos órgãos sexuais secundários das fêmeas, proliferação das células e também porque induzem a síntese de proteínas específicas; estas funções podem ser afetadas pelos desreguladores endócrinos. Devido à diversidade de ações biológicas, as estratégias de monitorização destes compostos passam por uma diversificada bateria de testes [38]. Além da associação direta ao sistema endócrino, estes são também compostos lipofílicos, bioacumuláveis, persistentes no meio ambiente e com uma baixa pressão de vapor sendo, devido a todas estas características, de fácil dispersão e difusão no meio ambiente [11]. A sua omnipresença no meio ambiente deve-se à sua utilização em várias aplicações no dia-a-dia. Contudo, a espécie humana não é a única espécie afectada, sendo que outros organismos vertebrados vêm também afetadas as suas funções endócrinas, pois possuem recetores de estrogénio com uma estrutura muito semelhante aos recetores das células humanas [39]. Algumas das características de substâncias já conhecidas como desreguladores endócrinos podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização de algumas substâncias classificadas com desreguladores endócrinos [40]

Composto químico	O que são	Meios de exposição	Mecanismo de ação
Dioxinas	São subprodutos de processos industriais, devido à combustão incompleta de compostos orgânicos. Incineradores que processam lixo municipal, resíduo industrial ou material hospitalar, termoelétrica a carvão, fábricas de papel e celulose, fumaça de veículos automotores, cigarro, fornos de produção de cimento e fundição de chumbo são fontes de produção desse composto. Processos naturais, como erupções vulcânicas e queimadas florestais, são outras fontes desses produtos	Alimentos (leite e derivados, peixes etc.) Meio ambiente	Alteração no metabolismo dos hormônios esteroides Efeitos neuroendócrinos, incluindo a tireoide
Pesticidas	São substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou no armazenamento de alimentos, capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e produtos derivados de madeira	Alimentos (principalmente vegetais) Meio ambiente Áreas agrícolas	Inibidor da síntese dos hormônios esteroides Efeitos no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal
Alquilfenóis	São substâncias presentes em antioxidantes, poliestireno modificado, surfactantes e PVC	Detergentes Frutos do mar Produtos industrializados	Agonista estrogênico (receptor estrogênico alfa)
Bisfenol A	Composto utilizado na fabricação de plásticos policarbonatos e epóxi de resina, presente na resina do forro de latas de alimento e bebida, e na composição de material odontológico selante	Alimentos Plásticos em contato com a comida Produtos industrializados (aditivos plásticos, selantes dentários etc.)	Agonista estrogênico (receptor estrogênico alfa)
Ftalatos	Ftalatos são substâncias usadas para dar flexibilidade e durabilidade ao PVC	Alimentos Cosméticos Brinquedos Material médico-hospitalar Roupas	Agonistas do receptor de Pregnano Biossíntese dos esteroides sexuais
Retardantes de chama bromado	São substâncias químicas utilizadas com o intuito de diminuir o risco de incêndio ou minimizar o dano causado por ignição. São relativamente persistentes, lipofílicos, com tendência à bioacumulação	Alimentos (leite e derivados, peixes) Meio ambiente Equipamentos eletrônicos	Alteração da homeostase dos hormônios esteroides e tireoidianos
Parabenos	São compostos utilizados como conservantes antimicrobianos em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos	Cosméticos Conservantes farmacêuticos	Agonista estrogênico (receptor estrogênico alfa e beta)
Metais pesados	Os metais pesados compreendem aqueles elementos cuja densidade excede 5 g/cm ³ . Os meios aquáticos também são depósitos de uma variedade de metais pesados e isso ocorre naturalmente por meio de processos geoquímicos e intemperismo	Alimentos (alimentos refinados, como farinha, arroz, açúcar e frutos do mar) Cigarros	Agonista estrogênico (receptor estrogênico alfa)
Fitoestrógenos	Fitoestrógenos são compostos derivados de plantas com estrutura química e atividade hormonal semelhante ao estradiol	Alimentos (vegetais e óleo de soja) Cosméticos	Modulador seletivo do receptor estrogênico, alta afinidade com o receptor estrogênico beta
Protetores contra a luz UV	Substâncias que possuem estabilidade à luz UV	Protetor solar Cosméticos	Agonista estrogênico (receptor estrogênico alfa)

PVC: policloreto de vinila; UV: ultravioleta.

3.2. Vias de exposição humana

A exposição aos desreguladores endócrinos pode ocorrer sobre várias formas, entre elas por contacto direto em casa e no local de trabalho ou, indiretamente, através da ingestão de água, ar ou alimentos contaminados. Sendo a alimentação a maior via de exposição a estes contaminantes, atingindo 90% dos casos, estes compostos são absorvidos principalmente por via digestiva [8, 11]. A sua persistência na cadeia alimentar acontece, porque estes compostos apresentam uma grande afinidade para os lípidos o que faz com que estes sejam bioacumulados no tecido adiposo das espécies aquáticas expostas [37].

Além disso, a exposição pode também dever-se a pesticidas residuais muitas vezes

acumulados em vegetais e frutas. Podem também existir vestígios destas substâncias em produtos de higiene, tais como, cremes, géis de banho, entre outros [11].

3.3. Atuação a nível do organismo

Os desreguladores endócrinos começam a ter uma grande ênfase em estudos ambientais, principalmente devido às características que lhes permitem interagir com os recetores estrogénicos humanos [41], como o recetor alfa ($hER\alpha$) [39], o qual vai interferir com o sistema endócrino [41]. Este sistema é muito importante, dado que é uma das formas de controlo e coordenação da função do corpo e possui funções muito importantes como a maturação sexual durante a puberdade, a reprodução na idade adulta, a diferenciação sexual antes do nascimento, entre outras funções. Daí a maioria dos exemplos de efeitos de desregulação endócrina se verificarem mais ao nível de anomalias no sistema reprodutivo, podendo, no entanto, apresentar outros efeitos mais generalizados [42].

Devido à importância e complexidade do sistema endócrino, existem muitos mecanismos com os quais estes compostos podem interagir e interferir. Entre eles podemos destacar os efeitos antagónicos de hormonas naturais que provocam o bloqueio da ligação hormonal, pela ligação de hormonas naturais aos receptores hormonais através de processos de mimetização, pela interferência no transporte, produção e eliminação de hormonas e ainda por outros mecanismos que não envolvem vias hormonais, mas sim outras vias ainda não estudadas [43].

Um exemplo de um desses mecanismos que pode levar à alteração da função endócrina é a ligação de uma dada substância a recetores hormonais do sistema endócrino, o que vai alterar a transcrição do ARN mensageiro. Apesar do mecanismo exato destes compostos ainda não ser totalmente conhecido, pensa-se que estes contribuem para a modificação epigenética o que resulta numa alteração da expressão génica [19,40].

A grande dificuldade no estudo destes mecanismos passa pela possibilidade de existência de ações simultâneas de vários desreguladores endócrinos e ainda pela complexidade das amostras ambientais, dado que estas podem possuir mais que um desregulador endócrino a atuar em paralelo [35].

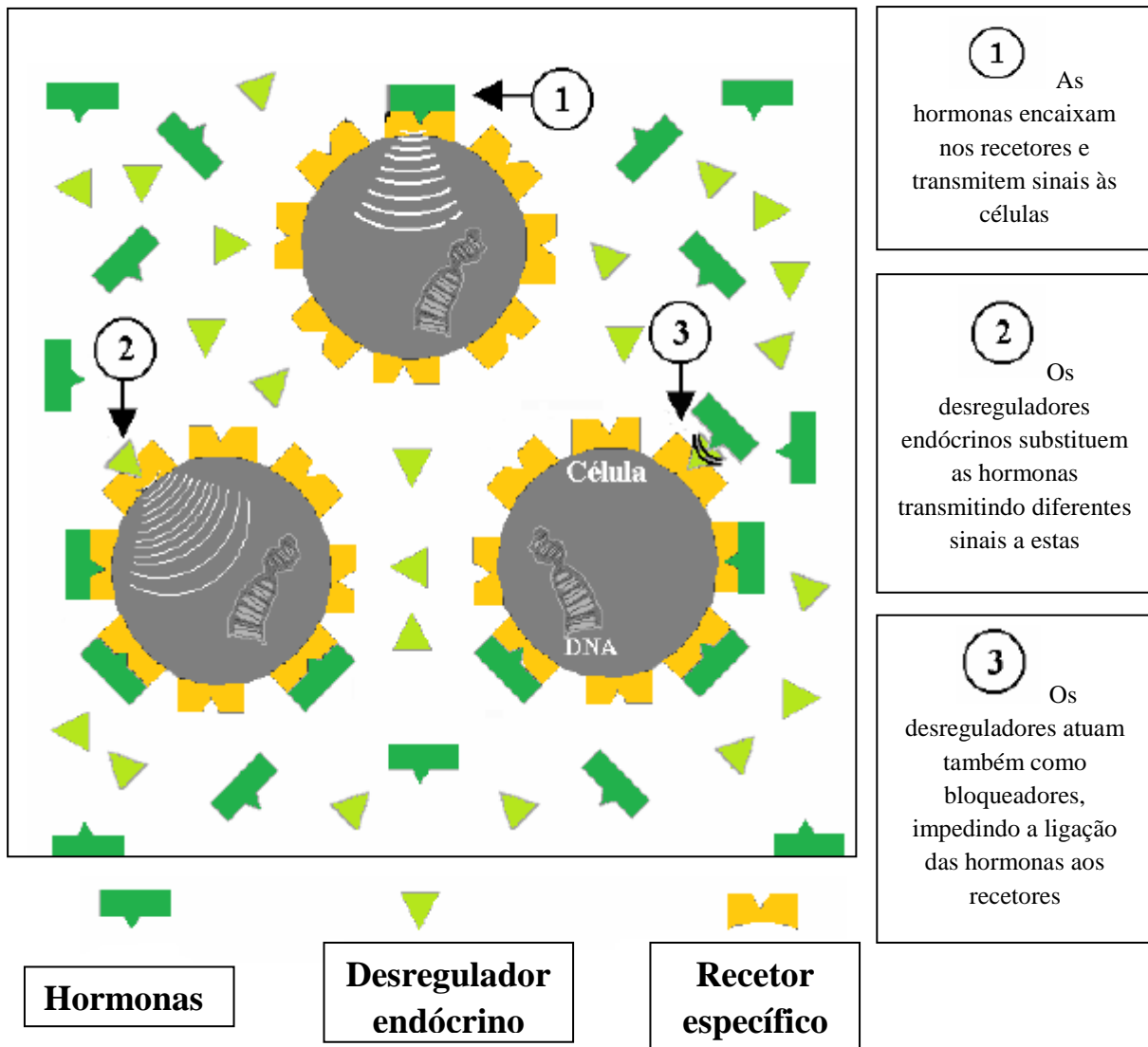


Figura 2 – Mecanismo de atuação dos desreguladores endócrinos [Adaptado de 43]

3.4. Efeitos nos animais e no ser humano

Inicialmente a influência adversa dos desreguladores endócrinos sobre o sistema reprodutivo foi comprovada em estudos com animais selvagens e, só mais recentemente, isso foi verificado em estudos *in vitro*. No ser humano, o estudo desses efeitos são ainda mais limitados, sendo este passo muito importante para o conhecimento de alguns mecanismos envolventes da desregulação endócrina [19].

Existem já relatos e estudos que indicam que a exposição a estas substâncias no período perinatal da gravidez pode influenciar fortemente o desenvolvimento de cancro em períodos posteriores. Existe também uma associação entre os níveis de estrogénio e o cancro da mama

e testicular, encontrados em crianças de mulheres que em algum momento da sua vida sofreram algum tipo de exposição [44]. Além disto, existem outros estudos que indicam que no ser humano existe ainda a diminuição da qualidade e quantidade de espermatozoides, o aumento das taxas de aborto e de infertilidade, o que demonstra a importância deste tipo de exposição para o desenvolvimento e reprodução humana [45]. Com os estudos feitos neste âmbito confirma-se então que após uma exposição a estes compostos existem alterações a nível reprodutor, podendo estas ser mais ou menos graves consoante o período do desenvolvimento em que se dá essa exposição. De facto, se a exposição for no início do desenvolvimento pode provocar alterações nos próprios processos de desenvolvimento, enquanto se for num estágio de desenvolvimento mais avançado pode apenas interferir na normalidade reprodutiva, ou apenas afetar a descendência [46].

Estudos feitos em animais, como peixes, aves ou répteis, (Tabela 5) retratam alguns dos efeitos que são atribuídos aos desreguladores endócrinos. Esses animais são bons objetos de estudo uma vez que facilmente se medem os níveis de vitelogenina no sangue. Este facto é importante pois dados de vários estudos mostram que os organismos respondem à exposição ao estrogénio com a indução da síntese de vitelogenina, sendo isto mais difícil de verificar nas fêmeas pois estas já possuem níveis mais elevados desta proteína, pois põem ovos, sendo esta uma das limitações destes estudos. Além da alteração nesta proteína, existem relatos de feminização de peixes machos, indução do hermafroditismo e declínio da reprodução. Uma outra limitação nos estudos feitos em animais é a comparação entre os biomarcadores, pois não existem marcadores comparáveis, sendo uma alternativa para superar este problema o uso do teste *E-screen* [11, 45].

Tabela 5 – Alguns efeitos provocados por desreguladores endócrinos em diversas espécies de animais [Adaptado de 11]

Espécie	Efeitos	Contaminantes associados aos efeitos	
Peixe	Feminização de peixes	Efluentes de ETE 17- β -estradiol 4-tert-pentilfenol Nonilfenol, octilfenol e butilfenol	
	Declínio na reprodução	Efluentes de ETE 17- β -estradiol 17 α -etinilestradiol Bisfenol A e DEHP (ftalato) Nonilfenol, octilfenol e butilfenol	
	Indução da síntese de VTG	Efluentes de ETE Estrona 17- β -estradiol 17 α -etinilestradiol Nonilfenol, octilfenol e butilfenol DES HAP, mercúrio, chumbo e cádmio	
	Alteração nas gónadas	17- β -estradiol	
	Hermafroditismo	17- β -estradiol	
	Mortalidade elevada dos descendentes	17- β -estradiol Nonilfenol, octilfenol e butilfenol	
	Distúrbios na síntese de cortisol	Cádmio, mercúrio e zinco	
	Inibição do crescimento testicular	Estrona 17- β -estradiol	
	Mexilhão	Indução à síntese de VTG	Efluentes de ETE
		Anomalias no crescimento da concha	Efluentes de ETE
	Tartaruga	Indução à síntese de VTG no sangue	17- β -estradiol
		Alterações na produção de ovos	17- β -estradiol
	Anfíbio	Indução à síntese de VTG no sangue	Efluentes de ETE
Hermafroditismo		Efluentes de ETE	
Anomalias no sistema reprodutivo		Herbicida	
Declínio da população		Herbicida	
Réptil	Concentrações anormais de hormonas sexuais	DDE e DDT	
	Anomalias morfológicas nas gónadas	DDE e DDT	
Ave	Diminuição da fertilidade	Pesticidas	
Mamífero	Anomalias no sistema reprodutivo de ratos	DDT Bisfenol A	
	Alta mortalidade de golfinhos	PCB	

Apesar de já serem conhecidos alguns efeitos adversos dessas substâncias, não existe hoje em dia muita informação acerca do seu uso comercial. Isto acontece porque a maioria dos produtos químicos utilizados na indústria não foram testados para a sua capacidade de interferência no sistema endócrino. No entanto, existe já uma lei que data de 1996 que visa proteger a qualidade dos alimentos e que inclui um teste avançado para verificar o potencial de produtos químicos como desreguladores endócrinos. O estudo dos efeitos dos desreguladores endócrinos na saúde humana são muito recentes, o que significa que esta

pesquisa ainda se encontra nos seus estágios iniciais e não existem ainda muitas conclusões acerca disso [19]. Contrariamente os estudos em animais apresentam resultados laboratoriais particularmente consistentes quando a exposição inclui estrogénios ambientais [44].

3.5. Métodos de avaliação das propriedades dos desreguladores endócrinos

Com várias formas de exposição e com a diversidade de substâncias a agir em conjunto, a avaliação epidemiológica da desregulação endócrina é complicada e é largamente desconhecida atualmente. No entanto, já existem alguns estudos desenvolvidos e aperfeiçoados por vários grupos de investigadores em países como os EUA, Espanha e Dinamarca [45]. Além disso, o estudo destas substâncias apresenta outra dificuldade que passa pela falta de sinais claros da exposição a estes desreguladores, que muitas vezes são subtis e podem sofrer atrasos no indivíduo exposto, manifestando-se apenas nas gerações subsequentes [19].

Com a grande variedade de compostos normalmente encontrados numa mesma amostra, a análise química e biológica torna-se insuficiente para a determinação desses compostos na sua totalidade. Diante disso, os bioensaios *in vitro* que se baseiam na interação entre os recetores de estrogénio e os desreguladores endócrinos para determinar o valor total de atividade estrogénica das amostras em estudo, são extremamente úteis, sendo um exemplo disso o ensaio *E-screen* utilizado neste trabalho [39]. Este tipo de estudos podem também ser feitos em animais, como por exemplo ratinhos, mas nesse caso existem várias limitações. De modo a evitar essas limitações que existem nos ensaios *in vivo* começaram a ser utilizados bioensaios utilizando culturas de células [45]. As células derivadas de tecido mamário são as mais apropriadas para este tipo de estudos porque têm receptores de estrogénio [3, 47, 48]. Um exemplo de uma linha celular recomendada para estes estudos nestes testes é a MCF-7 que irá ser usada no presente trabalho [47].

Em suma, parece que mesmo em doses baixas essas substâncias, de origem natural ou sintética, encontradas no meio ambiente, podem alterar a função endócrina o que tem gerado uma grande preocupação. Para além disso, existem outras questões muito pertinentes, tais como: quais os compostos e respetivas concentrações que se encontram associados aos efeitos considerados tóxicos; se atualmente no meio ambiente existem esses compostos e em que concentrações podem ser consideradas um risco para a saúde humana e ambiental; se existe alguma concentração desses compostos considerada segura, entre outras. Todo este tipo de

preocupações devem-se sobretudo aos efeitos adversos que estas substâncias podem ter, nomeadamente, no desenvolvimento das crianças e durante todo o ciclo de vida, dado que estas podem alterar a função reprodutiva, o desenvolvimento sexual, aumentar o risco de cancro e ainda reduzir a inteligência [11, 19].

O ensaio utilizado neste trabalho para avaliar a desregulação endócrina dos sedimentos do estuário do Sado é o *E-screen*, que se baseia na medição da atividade estrogénica usando um recetor de estrogénio presente em células de carcinoma mamário humano (células MCF-7). O ensaio vai estar diretamente dependente do aumento da taxa de proliferação celular induzida pela amostra a testar quando comparada com uma amostra de controlo sem hormonas [41]. Neste ensaio são utilizados controlos positivos, um deles é o 17- β -estradiol, cujo seu padrão de proliferação celular pode ser observado na Figura 3, e que vai servir de referência para o ensaio [49].

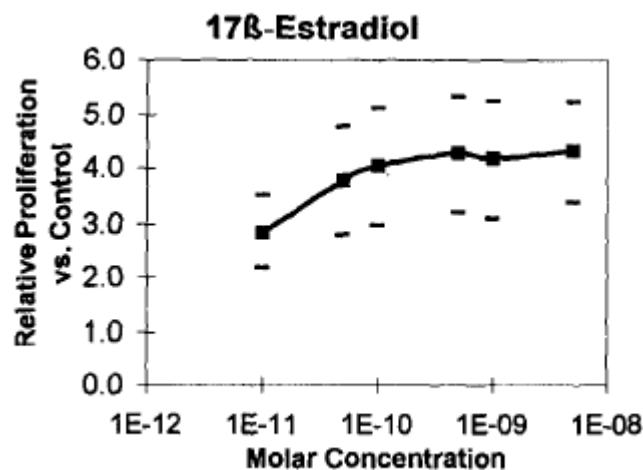


Figura 3 – Padrão da proliferação das células quando expostas ao composto 17- β -estradiol [49]

4. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

A exposição a substâncias tóxicas para o organismo, como certos contaminantes, pode ser diretamente associada à morte celular, quer por apoptose quer por necrose, revelando assim propriedades citotóxicas. Além do potencial citotóxico, os contaminantes podem também possuir um potencial genotóxico que se caracteriza através de métodos que avaliam lesões ao nível do genoma [3,48]. Como muitos dos contaminantes podem eles mesmo ser genotóxicos ou produzir metabolitos genotóxicos, as células do fígado são as preferenciais para estudar esses efeitos, dado que o fígado é o órgão chave na biotransformação de xenobióticos [3, 47, 48].

4.1. Avaliação de citotoxicidade

4.1.1. Ensaio gerais

Os ensaios de citotoxicidade avaliam o potencial citotóxico das amostras testadas, pondo as amostras em contato com as células. Essa avaliação pode ser feita através, por exemplo, de alterações no processo de divisão celular sobre as células que estão a ser testadas, através do índice mitótico [50, 51]. Existem vários ensaios de citotoxicidade como por exemplo o ensaio de coloração com o azul de tripano ou o ensaio de conteúdo de ácidos nucleicos, sendo os mais usuais, o ensaio de metilo de tetrazólio (MTT) e o ensaio do vermelho neutro (VN). Estes são muito utilizados nos estudos de toxicologia *in vitro* com o objetivo de avaliar a viabilidade celular após a exposição a certas substâncias potencialmente tóxicas, sendo este o parâmetro mais usado para a avaliação da citotoxicidade [51, 52,53].

Existem estudos de citotoxicidade onde se utilizam, paralelamente vários métodos para avaliar a proliferação celular, como por exemplo o MTT, o VN e o cristal de violeta que podem ser muito úteis para avaliar a citotoxicidade de amostras que contêm diversos compostos, com mecanismos de ação diferentes. Outros estudos utilizam o VN e o *amino black*, que avaliam a viabilidade e o crescimento celular respetivamente, como combinação de dois métodos no mesmo ensaio, dando origem aos resultados simultaneamente [54]. Para além dos ensaios que utilizam os corantes, existem outros tipos de ensaios citotóxicos que recorrem a outros métodos. Exemplo disso são os ensaios que medem a atividade metabólica das células, uma vez que se existirem danos nas células vai haver uma redução do metabolismo das células. Estes ensaios baseiam-se na medida da atividade mitocondrial ou do ATP presente nas células [55].

Os testes de citotoxicidade *in vitro* podem também ser utilizados para a avaliação da biocompatibilidade de qualquer material para uso biomédico, ou nas áreas da farmacêutica [56]. O desenvolvimento dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* tem sido muito impulsionado pela necessidade de avaliar o potencial citotóxico de um grande número de compostos utilizando-se pequenas quantidades destes mesmos compostos e também de modo a limitar a experimentação animal para esta avaliação [55].

4.1.2. Ensaio do Vermelho Neutro

Este ensaio é considerado um teste *in vitro* eficiente, com as vantagens deste ser um ensaio reprodutível, de custo baixo e eficaz para selecionar substâncias que possuem um

potencial para toxicidade [56]. O VN, utilizado neste trabalho, é um corante vital, que atravessa a membrana celular por difusão não inônica devido à sua solubilidade em água, aglomerando-se posteriormente nos lisossomas, através do estabelecimento de ligações eletrostáticas hidrofóbicas com a matriz destes, devido ao seu conteúdo ácido. Células mortas ou inviáveis têm uma redução da incorporação deste corante resultante das lesões nas membranas, sendo deste modo possível distinguir os dois tipos de células. A distinção do tipo de células, entre células vivas ou células mortas, é realizada através da medição da intensidade da coloração final das células viáveis [52, 57,58].

4.2. Avaliação de genotoxicidade

4.2.1. Ensaio gerais

Os estudos ambientais mais recentes incluem frequentemente a avaliação da genotoxicidade devido às suas implicações ao nível ecotoxicológico [59]. Os agentes genotóxicos são substâncias que possuem a capacidade de interagir com o ADN podendo desta forma provocar modificações nas suas funções ou na sua estrutura, sendo alguns exemplos disso a capacidade de indução da formação de micronúcleos, de aberrações cromossômicas. Estes agentes podem ainda também inibir a proliferação celular através da indução de mecanismos de apoptose celular com resposta às lesões provocadas no ADN. As modificações, que estes agentes provocam, podem perpetuar-se no ADN e ser transmitidas às gerações seguintes e quando isso acontece estas passam a ser designadas de mutações. Apesar disso, algumas destas modificações são importantes para a subsistência de diversas espécies uma vez que são fonte de variabilidade genética. Contudo, essas modificações podem originar doenças quer nos indivíduos onde se geram, quer nos seus descendentes resultando assim, respetivamente, em doenças de célula somáticas como o cancro. Um exemplo de como essas modificações podem influenciar na formação de um cancro acontece quando as mutações atingem genes supressores de tumores, ou genes que se encontram diretamente envolvidos na reparação do ADN e na indução de apoptose, existindo uma acumulação de mutações e consequentemente uma grande instabilidade genómica, que poderá contribuir para o primeiro processo cancerígeno [53,59,60,61].

As substâncias que provocam estes efeitos genotóxicos encontram-se dispostas e disponíveis nos diversos ecossistemas existentes, como o ecossistema aquático, aéreo e terrestre [61]. Os diferentes testes de genotoxicidade têm como objetivo principal a avaliação

do potencial de indução de mutações nas células quando estas são expostas a certos compostos químicos. Para esse efeito são utilizados diversos testes como o ensaio do Cometa são muito utilizados para detetar os efeitos dos poluentes genotóxicos nas células após a sua exposição [59]. São também utilizados métodos citogenéticos, como por exemplo a análise de micronúcleos, com este mesmo fim. Estes métodos são simples e podem ser realizados com amostras de tecidos ou órgãos de organismos a serem avaliados. Quando os estudos são feitos *in vitro* utilizam-se culturas celulares para expor as células ao composto que se pretende avaliar [61].

4.2.2. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi descrito pela primeira vez em 1984 por Ostiing & Johanson [60] e possibilitava apenas a avaliação de quebras nas cadeias duplas no núcleo das células. Mais tarde em 1988, Singh e colaboradores [62] através de uma modificação da técnica possibilitaram além da avaliação das quebras de cadeias duplas a avaliação das de cadeias simples [63]. A designação deste ensaio é devido à aparência que as células tomam após a corrida eletroforética, pois quando se dão quebras no ADN, devido à ação de compostos genotóxicos, existe um relaxamento na estrutura da cromatina que se apresenta menos enrolada e compacta. Por isso, quando as células são submetidas ao campo elétrico existe uma migração dos fragmentos em direção ao ânodo, ou seja, as células que possuem o ADN intacto ostentam um núcleo redondo, contrariamente às células com quebras no ADN, sejam estas simples ou múltiplas. Esses fragmentos migram então para fora do núcleo, dando origem a uma cauda, que dá à célula a aparência de um cometa, podendo este ser maior ou menor consoante o número de quebras ocorridas [59,61,64]. De seguida, para a visualização da migração do ADN, semelhante a um cometa, apenas é necessária a aplicação de corantes específicos e de um microscópio de fluorescência [61].

O ensaio do cometa revela principalmente lesões primárias no ADN, sobretudo quebras simples e duplas, eventos de reparação incompletos e ainda ligações cruzadas intracatenárias. Todas estas lesões são induzidas por diversos compostos químicos, como por exemplo agentes oxidantes. Contudo, apesar de ser possível quantificar as lesões provocadas no ADN não é possível ainda identificar qual dos eventos é responsável por essas mesmas lesões [54]. As lesões genéticas provocadas por agentes genotóxicos podem ser avaliadas através de vários parâmetros do ensaio do cometa, sendo as mais comuns a avaliação da quantidade de

ADN presente na cauda do cometa e o comprimento da cauda do cometa. Para esta avaliação deve ter-se em conta que a capacidade de migração que o ADN possui encontra-se diretamente relacionada com o tamanho das moléculas. Além disso, o tamanho da cauda na fase inicial aumenta conforme a quantidade de lesões provocadas no ADN. No entanto, a migração máxima não sofre apenas a influência do tamanho dos fragmentos, mas também é influenciada pelas condições da corrida eletroforética. É ainda de referir, que a quantidade de lesões que se verificam no ADN é uma das informações que pode ser retirada da comparação entre a intensidade da fluorescência na cauda e a que se verifica no núcleo do cometa [61].

Apesar dos agentes genotóxicos poderem induzir mutações, este ensaio não é utilizado com o objetivo de as detetar, mas sim com o objetivo de detetar lesões induzidas no genoma, sendo a grande diferença entre elas o facto das lesões no genoma poderem ser revertidas antes de se converterem em mutações [53]. Este ensaio possui muitas vantagens tais como, a sua sensibilidade para a deteção de lesões no ADN; a avaliação destas mesmas lesões isoladamente em cada célula, nomeadamente danos oxidativos e também da sua capacidade de reparação; a utilização de pequenas quantidades de células para uma grande quantidade de dados, estejam estas células em proliferação ou não; a possibilidade de se poder utilizar qualquer tipo de células eucarióticas; o seu baixo custo e ainda a sua simplicidade [53,59,61,64]. O ensaio do Cometa não é somente utilizado neste âmbito, ele pode também ser utilizado em estudos de biomonitorização ambiental e humana, de terapêutica e ainda em estudos *in vivo* [53].

Em suma, estudos anteriores realizados no Estuário do Sado revelaram a quantidade de contaminantes presentes nos seus sedimentos. Com isto tornou-se importante a avaliação destes sedimentos e do seu risco potencial tanto para a população como para o ecossistema aquático. Uma das grandes problemáticas passa pelo facto destes contaminantes serem bioacumuláveis tanto nas espécies de peixes que vivem no estuário tanto como nos produtos hortofrutícolas próximos do estuário, entrando desta forma na cadeia alimentar humana.

OBJETIVOS

O presente trabalho está inserido num projeto mais amplo, denominado “HERA - Avaliação de risco ambiental de um ambiente estuarino contaminado: um estudo de caso” que se propõe por um lado avaliar os riscos ambientais, incluindo o risco ecológico e para a saúde humana, de um ambiente estuarino, e por outro fazer também uma análise de uma população próxima do estuário.

O presente estudo tem como objetivo geral contribuir para a avaliação do risco para a saúde humana decorrente do consumo de espécies aquáticas com um forte potencial de contaminação por compostos que têm o potencial de provocar citotoxicidade, genotoxicidade e desregulação endócrina, no Estuário do Sado.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Implementação de um método de análise das propriedades de desregulação endócrina das amostras.
- Caracterização das diferentes frações dos sedimentos do Estuário do Sado quanto ao seu potencial citotóxico e genotóxico.

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem de sedimentos

As amostras de sedimentos em estudo (amostra P, C e A) foram colhidas em diferentes zonas do estuário do rio Sado (Figura 4), no final do ano 2010 e durante o ano de 2011 (Tabela 6). Todas as amostras foram colhidas em locais submersos, e após a sua colheita estas foram homogeneizadas e transportadas ao abrigo da luz a 4°C. Já no laboratório uma parte das amostras foi mantida a 4°C para o estudo e outra parte foi congelada para estudos posteriores.

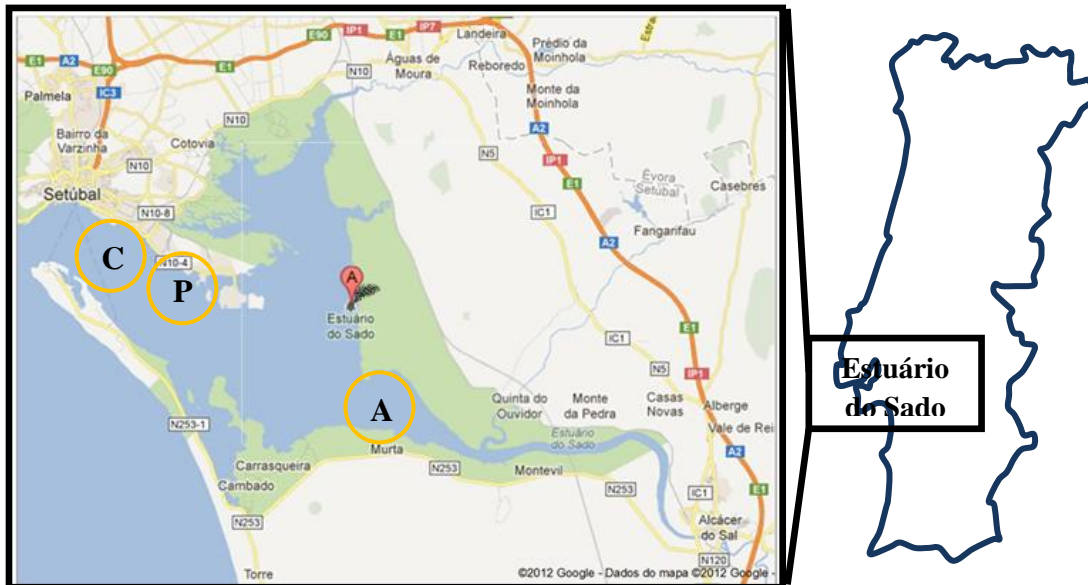


Figura 4 – Mapa do Estuário do Sado e respetivas zonas de amostragem (P, C e A) [65]

Tabela 6 – Caracterização ambiental e data de colheita das amostras

Amostra	Caraterização do local de colheita	Data de colheita
P	Perto das áreas de indústria pesada Alto hidrodinamismo Sedimento vasoso	Junho 2011
C	Mais distanciada de zonas contaminadas Hidrodinamismo superior Sedimento arenoso	Outubro 2010
A	Perto de zonas agrícolas (principalmente arrozais) Baixo hidrodinamismo Sedimento arenoso-vasoso	Maior 2011

2. Extração de contaminantes dos sedimentos

Cada uma das diferentes amostras de sedimento foi homogeneizada e foi removida uma sub-amostra para o processo de extração. Todo o processo de extração de contaminantes foi adaptado a partir de Šrut e colaboradores (2011) [66] e todos os reagentes utilizados foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Antes deste processo as amostras foram secas a 40°C durante uma semana, moídas e posteriormente pesadas 15g de sedimento seco de cada uma das amostras. Foram utilizados vários solventes, de modo a separar os contaminantes em diferentes frações consoante a sua polaridade. Os solventes de extração utilizados foram n-hexano (Fração 2), o diclorometano (Fração 3) e o metanol (Fração 4).

A extração foi feita mecanicamente num agitador orbital, durante 30min, de modo a que os contaminantes fossem extraídos com o máximo de eficiência. Após este período, a amostra foi deixada a repousar e procedeu-se à decantação de modo a remover a fase móvel ou sobrenadante. Após evaporação do solvente, os contaminantes foram recuperados em 1,5 ml de DMSO para a realização de ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e de desregulação endócrina em células. A concentração resultante do extrato é de 10 g de peso seco de sedimento por ml DMSO. As concentrações de extrato, usadas em ensaios celulares serão expressas como mg de sedimento equivalente (Seq) por ml de meio de cultura.

3. Cultura celular

3.1. Linha celular MCF-7

A linha celular MCF-7 (Figura 5) foi isolada a partir de uma mulher com um derrame pleural metastático e com cancro mamário ocorrido após a menopausa [49]. É uma linha celular que mantém diversas características do epitélio mamário diferenciado, entre elas, a capacidade de processar o estradiol via recetores de estrogénio citoplasmáticos [67].

Esta linha celular foi obtida a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC No. HTB-22). Estas foram sub-cultivadas em meio DMEM com vermelho de fenol, este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFBi), 2% de tampão HEPES e 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina, a 37°C e em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Todas estas soluções mencionadas anteriormente foram adquiridas na empresa Gibco-Invitrogen. Estas células foram destacadas quando atingiam um nível entre 70 a 80% de confluência utilizando para isso tripsina-EDTA (0,5%). Quando estas atingem este nível de confluência, são feitas diluições de 1:4 ou 1:6 para a sua manutenção.

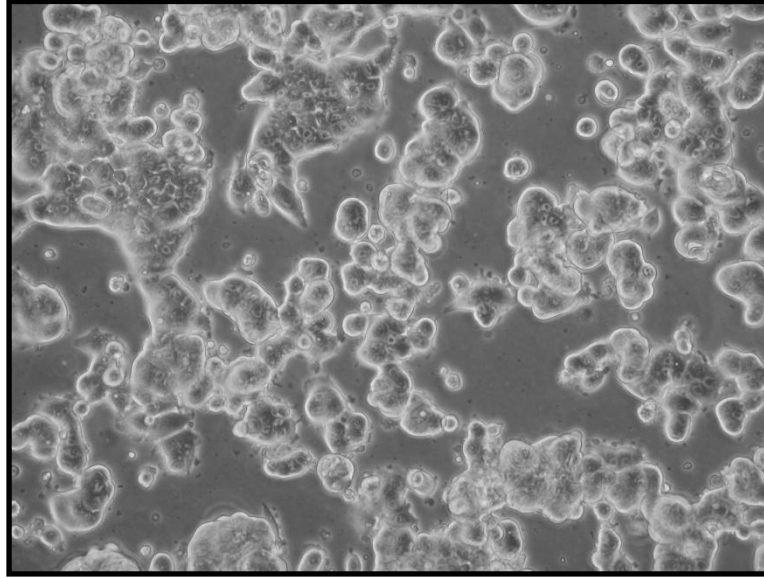


Figura 5 – Aspeto de culturas de células MCF-7 [68]

3.2. Linha celular HepG2

A linha celular HepG2 (Figura 6) foi isolada a partir de carcinoma hepatocelular bem diferenciado de um rapaz caucasiano de 15 anos [69]. Estas células são de fácil manuseamento e demonstram ser uma alternativa prática para a avaliação da genotoxicidade, dado que muitos compostos genotóxicos provocam danos indiretamente [70]. Isto é as HepG2 possuem características de particular interesse, dado que muitos dos contaminantes presentes nos sedimentos do estuário, requerem metabolização para induzir qualquer tipo de efeito genotóxico. Estudos anteriores que demonstram que estas células têm enzimas envolvidas na biotransformação de agentes mutagénicos [71, 72].

Esta linha celular foi obtida através da *American Type Culture Collection* (ATCC No. HB-8065). Estas células foram mantidas e sub-cultivadas, em meio DMEM-F12 com L-Glutamax, suplementado com tampão HEPES (25 mM), 15 % de soro fetal bovino inativado pelo calor (SFBi), 1 % de antibióticos penicilina/estreptomicina e 1,5 % de fungizona, a 37°C e em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Todas estas soluções mencionadas anteriormente foram adquiridas à Gibco-Invitrogen. Estas células foram destacadas quando atingiam um nível entre 70 a 80% de confluência utilizando para isso tripsina-EDTA (0,5%), e para sua manutenção são feitas diluições de 1:2.

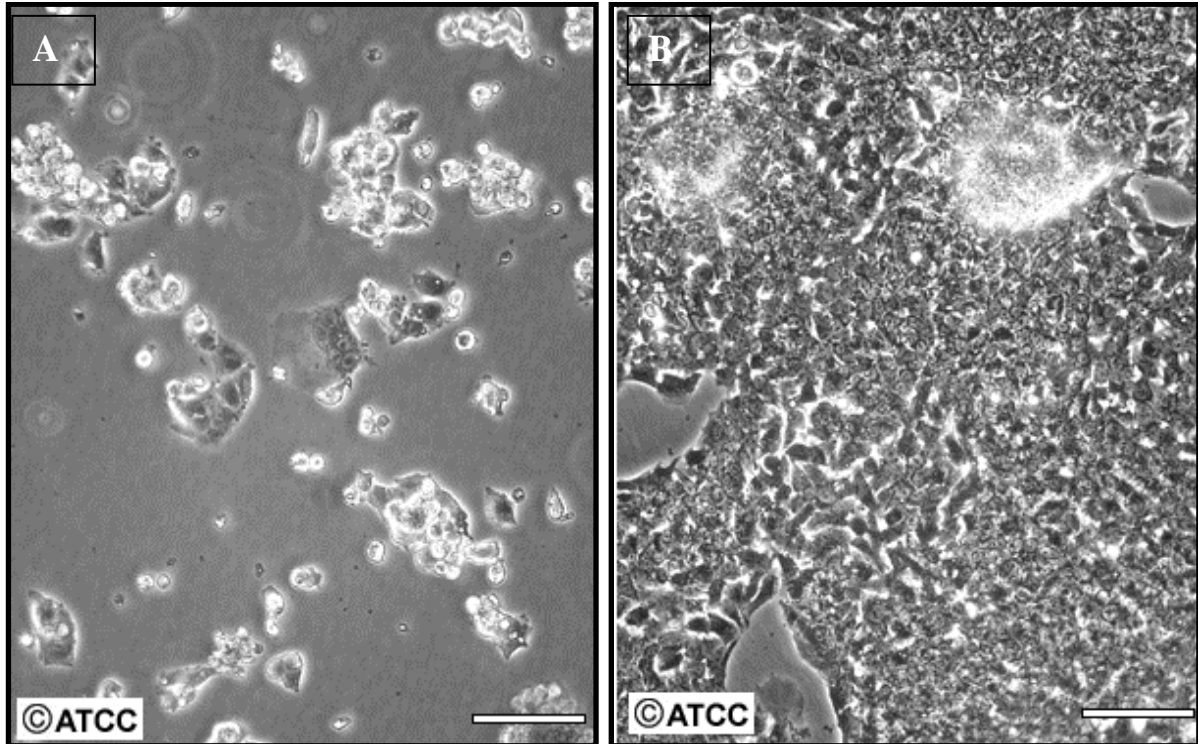


Figura 6 – Aspetto de culturas de células HepG2. **A** – menor confluência; **B** - maior confluência [68]

4. Ensaio *E-screen*

O ensaio descrito a seguir foi adaptado de Schilirò e colaboradores (2009) [19]. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Neste ensaio as células utilizadas são células MCF-7, que foram sub-cultivadas em placas de 24 poços com uma densidade de 1×10^4 células/poço durante 24h. Após esse período, o meio de crescimento é substituído pelo meio de tratamento, que consiste em DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 2% de L-Glutamina e 5% de *Fetal Charcoal Serum-stripped*. Como controlo positivo utilizaram-se o 17- β -estradiol que foi reconstituído em etanol, mantido a -20°C e o Bisfenol A que foi reconstituído em DMSO, mantido a 4°C. De referir que as 5 concentrações de 17- β -estradiol foram escolhidas seguindo o protocolo de Körner e colaboradores (1998) [49]. As células foram incubadas a 37°C e com 5% de CO₂ durante um período de 5 dias, após o qual elas foram coradas com o corante cristal de violeta a diferentes concentrações e lidas num espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo Labsystems) a 560nm. Após este ensaio cada amostra que demonstrasse um efeito significativo na indução da proliferação celular seria testada com o anti-estrogénico tamoxifeno.

Para testar a coloração foram utilizados 4 protocolos diferentes de forma a determinar qual o mais indicado para este ensaio e para as células MCF-7. O primeiro protocolo (Protocolo 1) consistiu numa lavagem com tampão fosfato salino (TFS) aquecido, de seguida adicionou-se a solução de cristal de violeta a 0,2% incubando-se as placas durante 10 min, à temperatura ambiente, seguidamente lavaram-se e secaram-se as placas, adicionou-se SDS e durante 20 min agitaram-se as placas. Por fim estas foram lidas no espectrofotómetro.

No segundo protocolo (Protocolo 2) testado adicionou-se a solução de cristal de violeta a 0,4% em metanol de forma a permitir a coloração e fixação simultaneamente, e incubaram-se as placas durante 30 min. Após esse período lavaram-se estas com TFS e adicionou-se a solução de extração do corante (10% de ácido acético e 90% de água destilada). Por fim as placas foram lidas como no protocolo anterior.

No terceiro protocolo (Protocolo 3) adicionou-se a solução de fixação (3:1 metanol: ácido acético) às células e incubaram-se durante 30 min no frio. De seguida, adicionou-se a solução de cristal de violeta a 0,5%, incubaram-se durante 10min à temperatura ambiente, lavaram-se as placas e adicionou-se Tampão Sorenson's. As placas foram colocadas a agitar entre 20 a 30 min e por fim foram lidas no espectrofotómetro.

Por fim, no último protocolo testado (Protocolo 4) adicionou-se a solução de fixação (3:1 metanol:ácido acético) e incubaram-se as placas no frio durante 30 min. Depois adicionou-se a solução de cristal de violeta a 0,2% e incubaram-se as placas durante mais 10 min, à temperatura ambiente. Após isto são seguidos os mesmos passos do primeiro protocolo até o método chegar ao fim.

Na Figura 7, pode-se observar um esquema geral do ensaio *e-screen*.

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

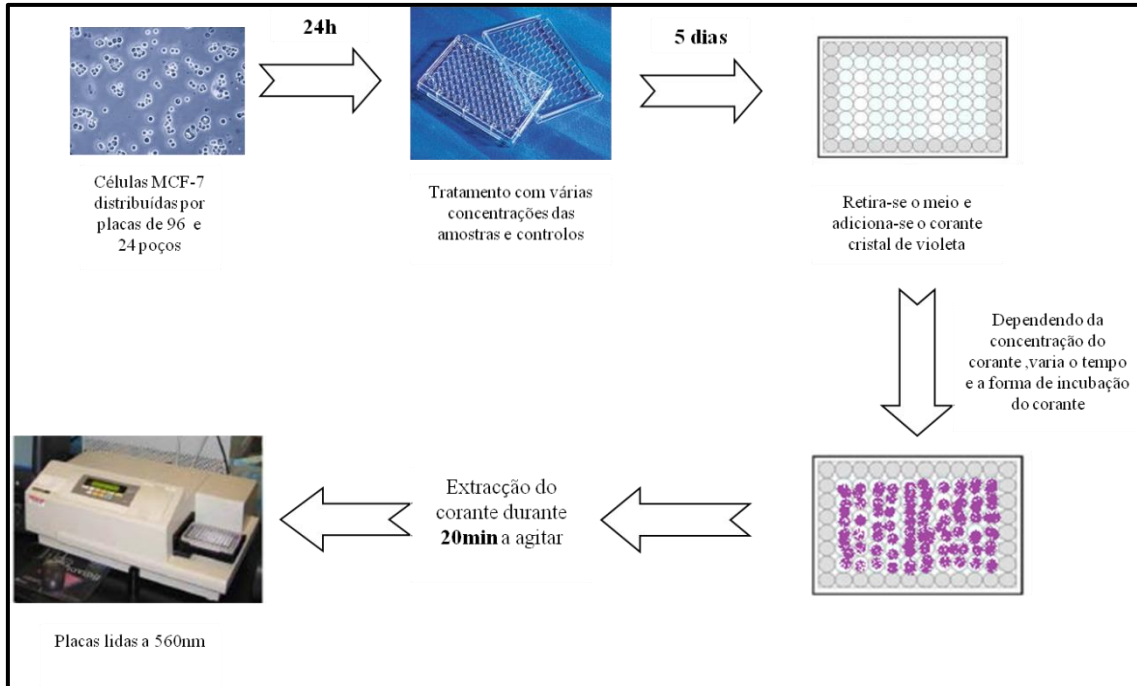


Figura 7 – Esquema geral do ensaio *e-screen*

Em cada amostra seria avaliada a atividade estrogénica através da determinação da eficácia relativa (%ER), que equivale a proliferação celular induzida pela amostra a que as células estiveram expostas. Para calcular esta atividade é necessário o cálculo do efeito proliferativo (EPL), que demonstra a relação entre o maior número de células dos poços tratados com amostra ou com os controlos positivos e o número de células do controlo negativo.

$$EPL = \frac{(n^{\circ} \text{ máximo de células}) \text{ amostra ou controlo positivo}}{(n^{\circ} \text{ de células}) \text{ controlo negativo}}$$

Com este valor era então calculada a %ER, através da seguinte fórmula:

$$\%ER = \left[\frac{(EP - 1) \text{ amostra}}{(EP - 1)17 - \beta - \text{estradiol}} \right] \times 100$$

Além destes cálculos, era possível também calcular-se a potência relativa, que representa a quantidade de equivalência de estradiol (EEQ) através da seguinte fórmula:

$$EEQ = \frac{(\text{Concentração a que } 50\% \text{ da EP é atingida})^{17 - \beta - \text{estradiol}}}{(\text{Concentração a que } 50\% \text{ da EP é atingida})_{\text{amostra}}}$$

5. Ensaio do Vermelho Neutro

Todo o ensaio foi adaptado a partir de Repetto e colaboradores (2008) [72], e encontra-se representado, de uma forma geral, na Figura 8.

Este ensaio foi realizado com células HepG2. Estas foram plaqueadas com densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 24h. Após este período as células foram expostas, durante 48h, a várias concentrações de cada amostra entre 5 e 200mg Seq/ml. Além disto, como controlo de solvente foi utilizado o DMSO, à concentração de 20µl/ml. Como controlo negativo foi utilizado meio de cultura, que foi o mesmo utilizado em todas as soluções de tratamento, meio de cultura DMEM-F12 com 2% de SFBi. Cada concentração e ensaio foram realizados em triplicado.

Após o tempo de exposição, o meio foi removido e substituído por meio de crescimento pré-aquecido a 37°C, tendo-se adicionado a solução de Vermelho Neutro (VN) (Merck, Darmstadt, Alemanha) com uma concentração de 0,5mg/ml. Para permitir a incorporação do VN, as células foram incubadas durante 3h, a 37°C a 5% de CO₂. Após as 3h, o meio contendo VN foi retirado e lavaram-se as células por duas vezes com TFS, previamente aquecido. Posteriormente, adicionou-se a solução de VN/Stop (etanol: ácido acético: água (50:1:49) para se extrair o corante VN que se encontra incorporado nos lisossomas das células viáveis. Agitou-se a solução durante 20min, e por fim mediu-se espectrofotometricamente a 540nm a quantidade de VN presente, num espectrofotômetro Multiskan Ascent (Thermo Labsystems).

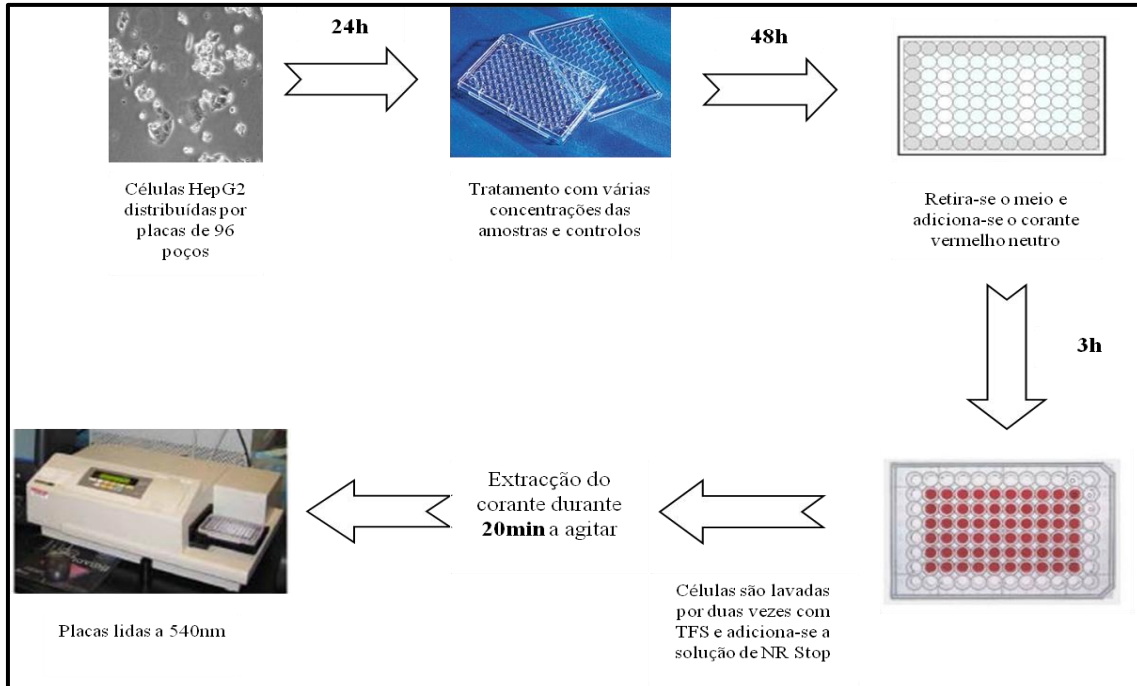


Figura 8 – Esquema geral do ensaio do vermelho neutro

A viabilidade celular relativa das células é calculada assumindo que a absorvância média do controlo negativo corresponde a 100% de viabilidade celular, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular relativa (\%)} = \frac{\text{média abs540(células expostas)}}{\text{média abs540 (controlo negativo)}} \times 100$$

Todos os resultados obtidos através do cálculo desta fórmula foram expressos como valor médio (\pm EP) de 3 experiências independentes.

6. Ensaio Cometa com enzima FPG

Para este ensaio (Figura 9) são necessários vários tampões, que são feitos antes de cada experiência (Tabela 7). Todos os reagentes utilizados foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e da Merck (Darmstadt, Alemanha) e todo o ensaio foi baseado no método descrito por Dusinska e colaboradores (1996) [73], realizando-se pequenas modificações. Na Figura 9 pode-se observar um esquema com o método do Cometa descrito de forma geral.

Tabela 7 – Constituição dos tampões utilizados no ensaio do cometa

Tampão de lise	0,12% de Tris-HCl 10Mm 0,8% de NaOH 1% de N-Laurosilsarcosina de sódio 3,7% de Na₂EDTA 10mM 14,6% de NaCl 2,5M
Tampão F	HEPES 40 mM EDTA 0,5 mM ácido BSA 0,2mg/ml KCl 100mM pH verificado e acertado em 8 com KOH 1M
Tampão de electroforese	0,037% Na ₂ EDTA.2H ₂ O 1Mm 1,2% de NaOH 300mM pH foi verificado acima de 13
Solução de neutralização	9,5% de HCl 4M 4,85% de base Triz (0,4 M Tris)

Neste ensaio, foram sub-cultivadas células HepG2 em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^4 células/poço durante 24h, a 37°C e com 5% de CO₂. Após este tempo, expuseram-se as células a diferentes concentrações das amostras, de 10 a 200mg Seq/ml, durante 48h. Como controlo positivo utilizou-se em todas as experiências H₂O₂ a 100µM, sendo o tempo de exposição deste apenas 30min. Todo o tratamento é preparado em meio de cultura DMEM-F12 com 2% de SFBi.

Após as 48h de exposição, cada poço foi lavado com TFS pré-aquecido, e foi adicionada tripsina-EDTA (0,5%). Após as células se encontrarem em suspensão foram centrifugadas em ambiente refrigerado (4°C), a 1200rpm, durante 10min. A suspensão celular obtida foi incorporada em 1% de agarose de baixo ponto de fusão. Foram distribuídas duas gotas iguais da suspensão celular por cada lâmina, previamente coberta com 1% de agarose com ponto de fusão normal e cobertas com lamelas. Depois da solidificação dos microgéis, removeram-se com cuidado as lamelas e procedeu-se a lise das células, ficando as lâminas imersas na solução de lise (1% de Triton-X, 10% de DMSO e 89% de tampão de lise) durante pelo menos 1h a 4°C.

Após a lise, as lâminas foram lavadas em tampão de neutralização e lavadas três vezes com tampão F durante 5min. Seguidamente, adicionou-se a enzima FGP (gentilmente cedida

pelo Dr. AR Collins, Universidade de Oslo, Noruega) a cada microgel, incubando-se as lâminas em atmosfera húmida, a 37°C por 30min. Depois de todos estes passos as lâminas são deixadas em repouso com tampão de electroforese durante 40min, para que o ADN tenha o tempo necessário para se desenrolar, antes de se realizar a corrida durante 30min a 25V e 300mA e a 4°C. Por fim, as lâminas são lavadas em tampão de neutralização e de seguida em água destilada, durante 10 min cada. As lâminas foram deixadas a secar antes de corar com brometo de etídio (0,125µg/µl).

Para cada lâmina, que equivale a cada tratamento, foram seleccionados aleatoriamente 50 nucleóides em cada microgel, correspondendo cada um a uma cultura diferente, perfazendo o total de 100. Estes foram analisados utilizando um microscópio de fluorescência (Axioplan2 Imaging, Zeiss) que possui uma câmara de alta resolução (Zeiss) e foram medidos através de um *software* de análise de imagem Comet Imager 2.2 (Metasystems, GmbH).

Em cada lâmina foram medidos vários parâmetros, sendo os mais importantes para os nossos resultados a percentagem média de ADN, o comprimento e momento da cauda. Todos os valores apresentados foram expressos em valor médio (\pm EP) das três réplicas independentes de cada experiência. Um outro parâmetro analisado são os danos oxidativos, este é calculado da seguinte forma:

[Média da % de ADN na cauda de nucleóides com tratamento de enzima] - [Média da % de ADN na cauda de nucleóides sem tratamento de enzima]

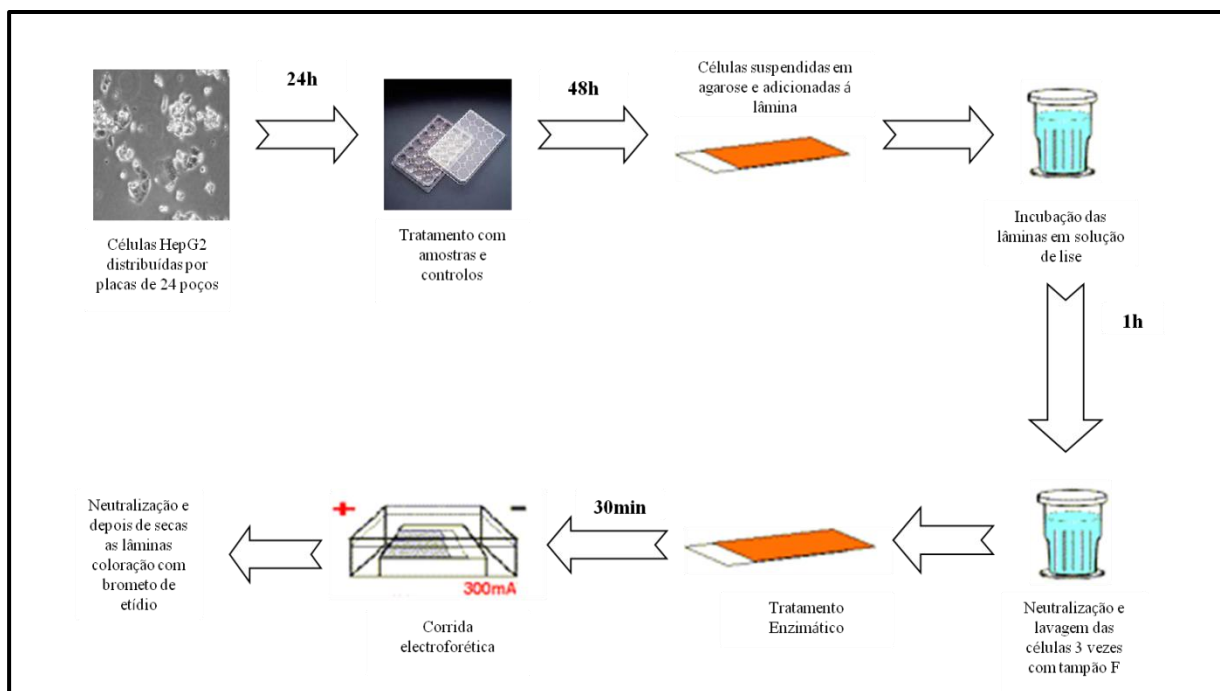


Figura 9 – Esquema geral do ensaio do Cometa com tratamento enzimático

7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao SPSS Statitics 17.0.

No ensaio de VN, as curvas dose-resposta foram determinadas através da análise de regressão dos dados, tendo sido os valores de IC₅₀ estimados a partir da equação que descreve as curvas dose-resposta determinadas para cada amostra.

A análise dos dados dos ensaios do VN e do Cometa foi efetuada através de uma ANOVA seguida do teste t de Student.

A significância estatística foi assumida para todos ensaios para $p \leq 0,05$.

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

RESULTADOS

1. Ensaio *E-screen*

Começou por se tentar otimizar o ensaio do *E-screen*, utilizando 17- β -estradiol (Ensaio 1, Figura 10), a fim de determinar a concentração ótima para utilizar em ensaios futuros, considerando que este composto é utilizado como controlo positivo na indução da proliferação celular, fazendo os níveis de viabilidade situar-se acima dos 100%.

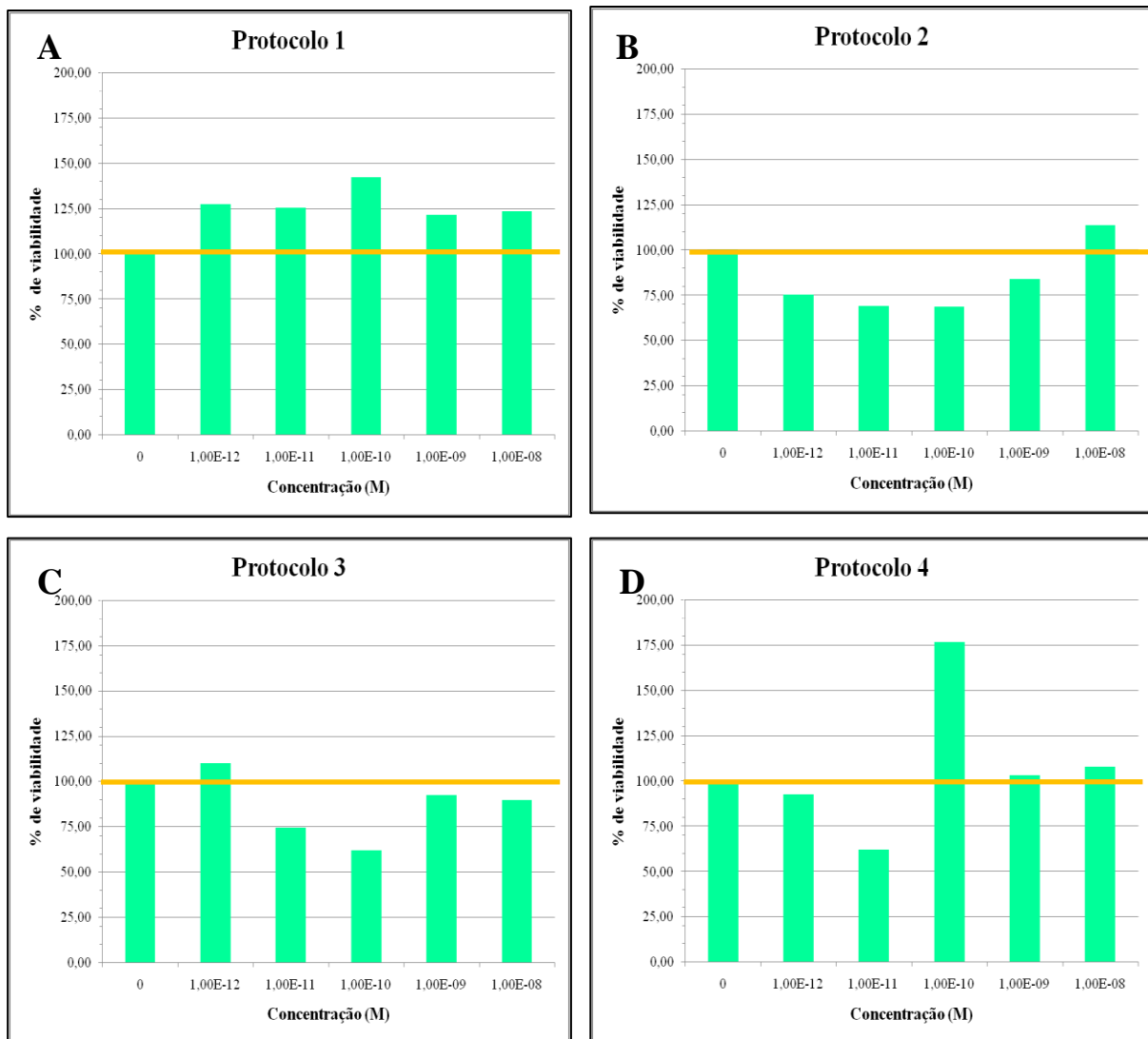


Figura 10 – Resultados do Ensaio 1 do método *E-screen* após a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações. **A** – Protocolo 1 com 0,2% do corante cristal de violeta; **B** – Protocolo 2 com 0,4% do corante cristal de violeta; **C** – Protocolo 3 com 0,5% do corante cristal de violeta; **D** – Protocolo 4 com 0,2% do corante cristal de violeta

Após este ensaio os protocolos 3 e 4 (Figura 10 C e 10D, respetivamente) foram descartados devido ao padrão de viabilidade celular inconstante consoante a concentração de 17- β -estradiol testada, e devido ao facto de muitas das concentrações testadas reduzirem a viabilidade. Foram escolhidos então para novos testes os protocolos 1 e 2 (Figura 10A e 10B, respetivamente), o primeiro devido a todas as concentrações testadas induzirem um aumento da proliferação celular, e o segundo porque, apesar de haver uma redução da viabilidade celular, mostra um comportamento dependente da dose, com um aumento da viabilidade celular de 1×10^{11} a 1×10^8 M.

Seguidamente efetuaram-se novos ensaios (Ensaio 2, Figura 11), com os dois protocolos escolhidos, de modo a determinar o mais eficiente para o seguimento do trabalho.

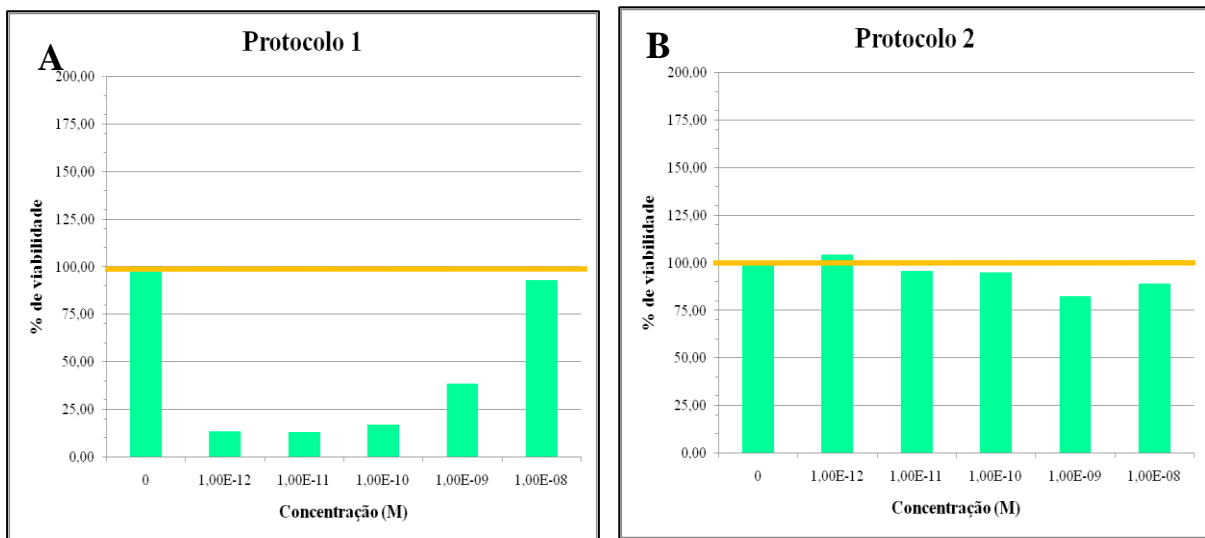


Figura 11 – Resultados do Ensaio 2 do método do *E-screen* com a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações. **A** – Protocolo 1 com 0,2% do corante cristal de violeta; **B** – Protocolo 2 com 0,4% do corante cristal de violeta

Neste ensaio (Ensaio 2), nenhum dos padrões de viabilidade celular obtido se assemelhou ao do ensaio anterior (Ensaio 1). Apesar de no Ensaio 1 o protocolo 1 aparentar ser o mais eficaz (Figura 10A), no Ensaio 2 (Figura 11A), os valores de viabilidade celular obtidos para todas as concentrações de 17- β -estradiol encontram-se sempre abaixo do valor obtido para o controlo negativo. Por outro lado, o protocolo 2 (Figura 11B) também não demonstrou um padrão semelhante ao do Ensaio 1, demonstrando existir uma variabilidade entre ensaios, impossibilitando a sua replicação. Devido a este facto, experimentou-se outro composto que também funcionasse como controlo positivo, o Bisfenol A, de modo a excluir

um possível problema na ação do 17- β -estradiol. Neste ensaio (Ensaio 3, Figura 12) testaram-se diferentes concentrações do 17- β -estradiol e Bisfenol A em paralelo, para verificar que padrão de viabilidade se obtinha com este composto.

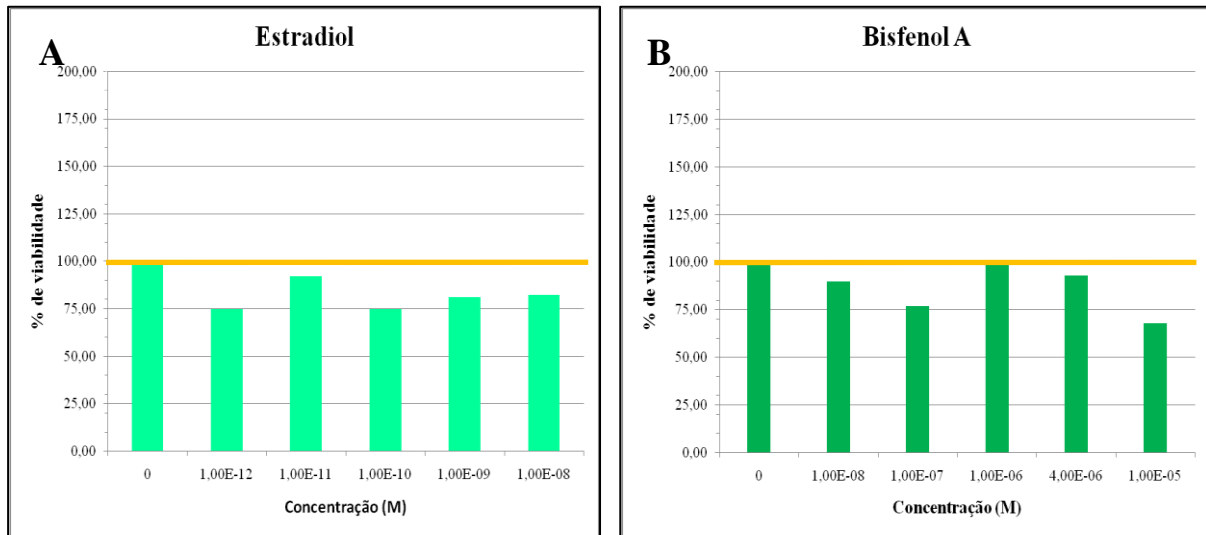


Figura 12 – Resultados do Ensaio 3 do método do *E-screen* com a exposição das células MCF-7 durante 5 dias. **A** – Exposição das células a diferentes concentrações de 17- β -estradiol; **B** – Exposição das células a diferentes concentrações de Bisfenol A

Neste ensaio verifica-se que, mais uma vez, os valores de viabilidade obtidos para as diferentes concentrações de 17- β -estradiol testadas se encontram abaixo do controlo, observando-se um decréscimo na viabilidade das células MCF-7. Por outro lado, o Bisfenol A originou um padrão também ele abaixo do valor de viabilidade do controlo, rejeitando-se a hipótese de um mal funcionamento na ação do 17- β -estradiol. De seguida modificou-se o 1º dia de incubação das células em placa, testando em paralelo meio contendo, ou desprovido de, vermelho de fenol (Ensaio 4, Figura 13), de forma a averiguar a disponibilidade dos recetores de estrogénio para os compostos testados.

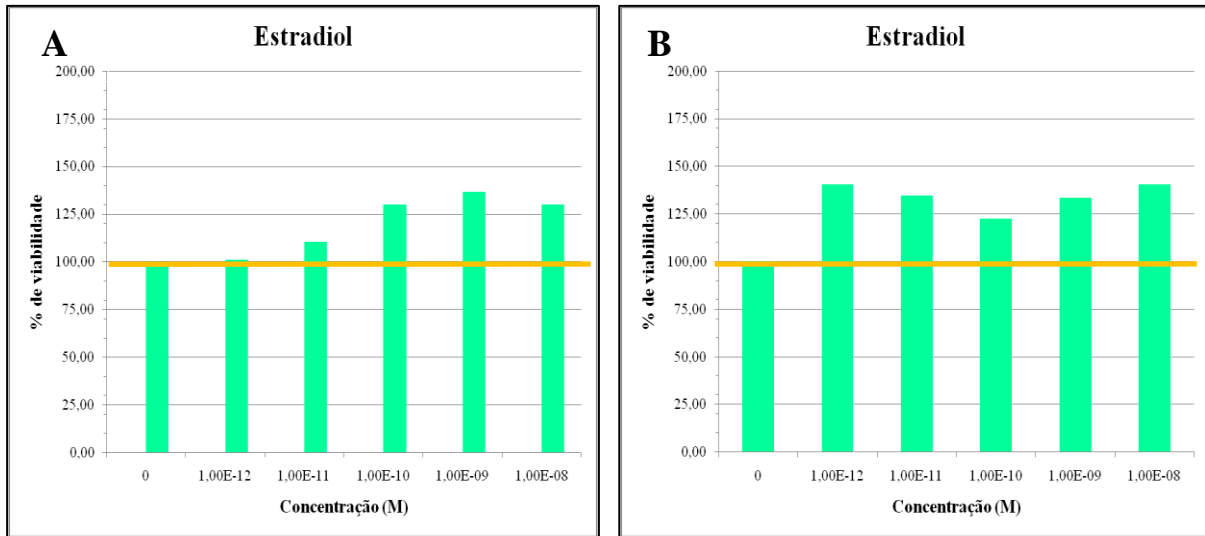


Figura 13 – Resultados do Ensaio 4 do método do *E-screen* com a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações. **A** – Incubação no 1º dia com meio de cultura com vermelho de fenol; **B** – Incubação no 1º dia com meio de cultura sem vermelho de fenol

Neste ensaio obteve-se uma boa resposta por parte das células, levando à proliferação celular em ambas as condições testadas (Figura 13 A e 13 B). Dado isto, escolheu-se prosseguir os trabalhos utilizando meio de cultura contendo vermelho de fenol no 1º dia de incubação, devido ao facto de se ter observado um aumento da proliferação celular com o aumento da concentração dos compostos testados.

Efetuuou-se então o Ensaio 5, incubando as células MCF-7, durante 5 dias, a diferentes concentrações de 17- β -estradiol (Figura 14) e Bisfenol A (Figura 15), em triplicado. Neste ensaio obtiveram-se diferentes comportamentos e nos três diferentes replicados efetuados, tanto quando é testado o composto 17- β -estradiol como o Bisfenol A.

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

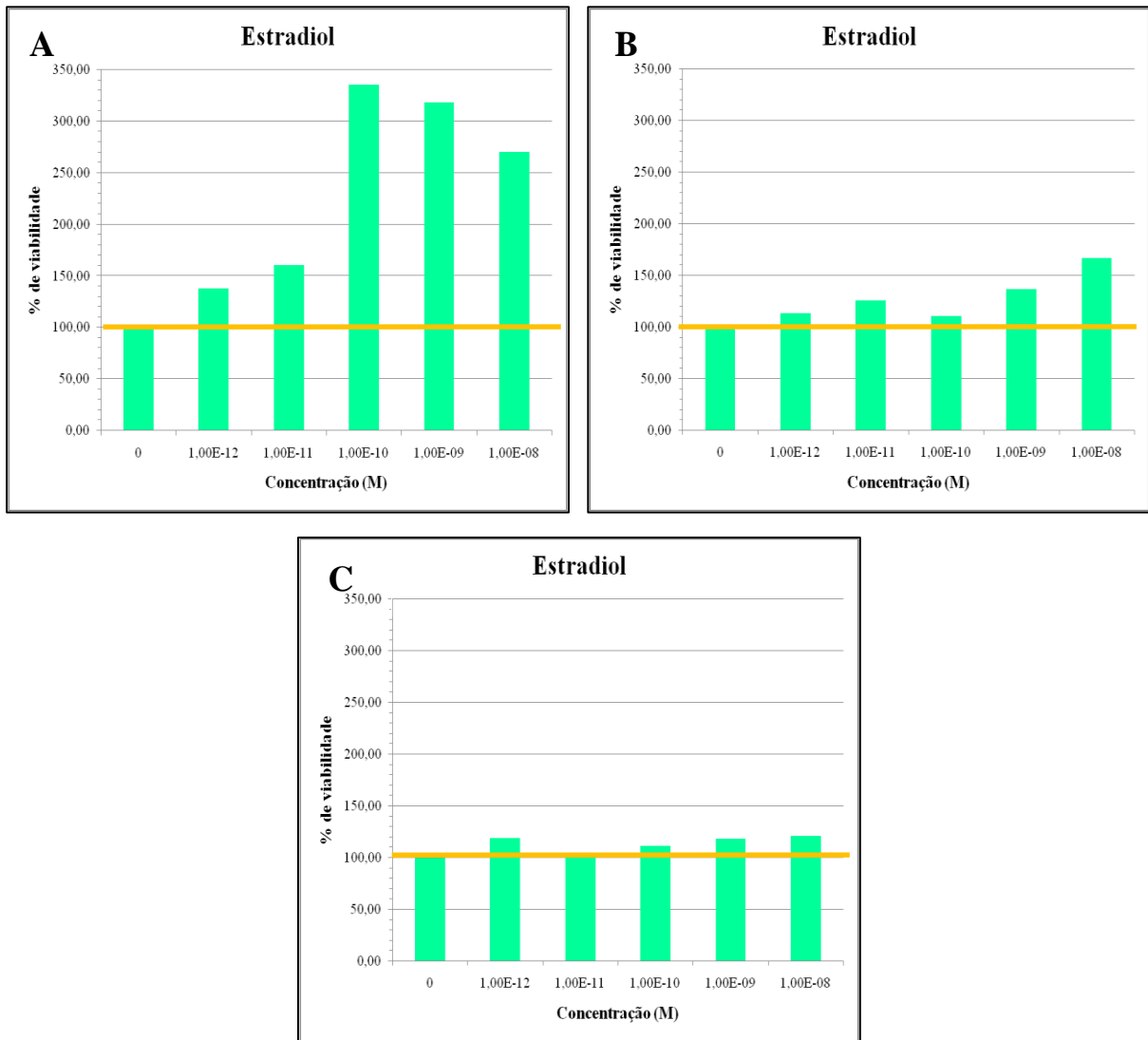


Figura 14 – Resultados do Ensaio 5 do método do *E-screen* com a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto 17- β -estradiol em diferentes concentrações. **A, B, C** – Replicados de 3 experiências independentes.

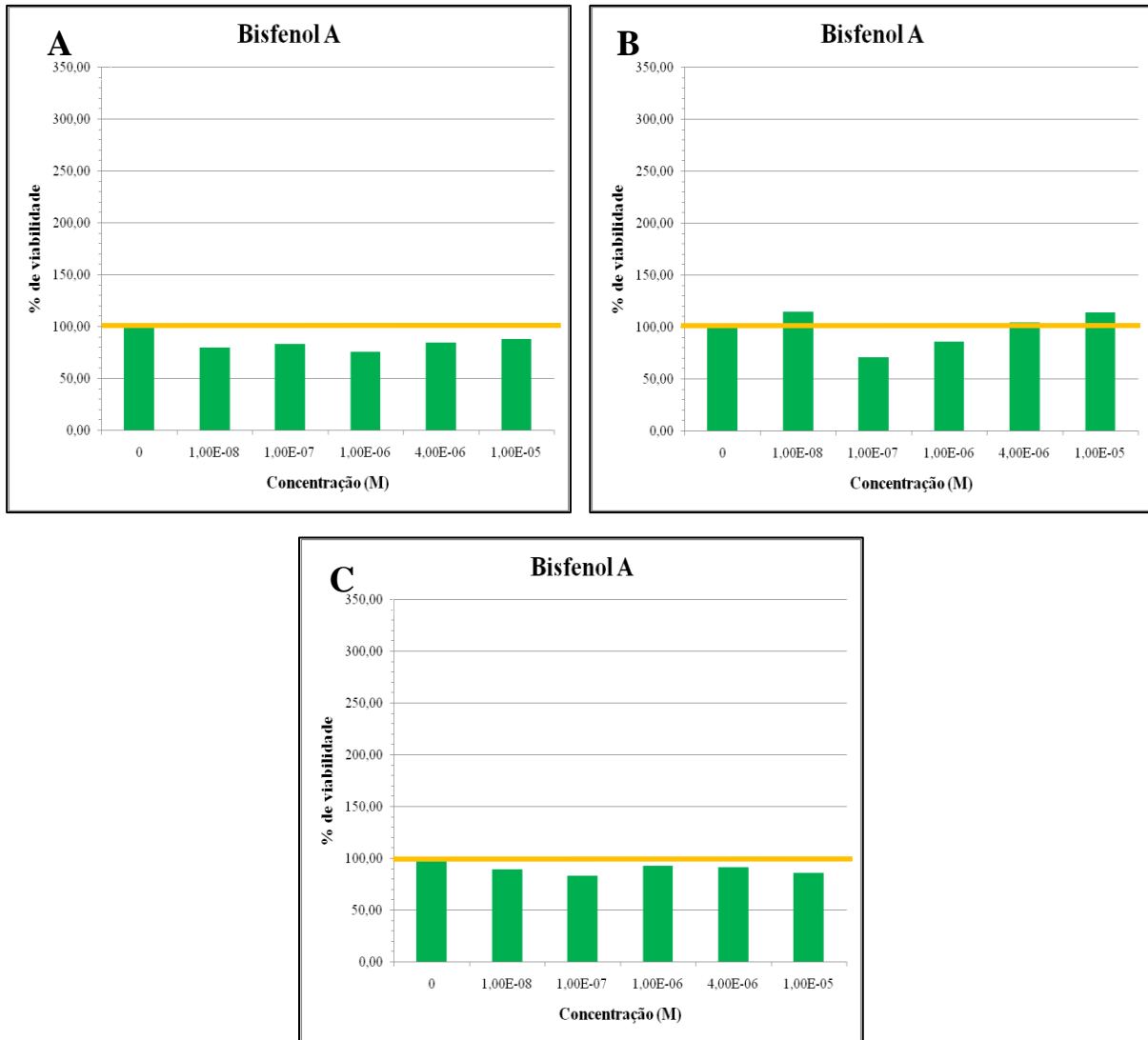


Figura 15 – Resultados do Ensaio 5 do método do *E-screen* com a exposição das células MCF-7 durante 5 dias ao composto Bisfenol A em diferentes concentrações. **A, B, C** – Replicados de 3 experiências independentes.

2. Ensaio do Vermelho Neutro

No ensaio do VN as concentrações testadas foram até 200 mg Seq/ml equivalente a 2% de DMSO no meio de cultura, devido à existência de interferência citotóxica do solvente acima desta concentração [56]. Após o tempo de exposição, os padrões de citotoxicidade observados apresentam todos um comportamento linear semelhante para as diferentes frações das diferentes amostras testadas (Figuras 16, 17, e 18).

Aquando a extração com n-hexano (Fração 2, Figura 16), o extrato P (zona próxima da área industrial) induziu uma maior redução da viabilidade celular em comparação com as outras amostras, até cerca de 42,46% na concentração testada mais elevada (Figura 16A). Observou-se então uma redução de viabilidade celular inferior para as outras amostras, de

aproximadamente 40% e 35,24% para as amostras A (Figura 16C) e C (Figura 16B) respetivamente. Das frações 2 apenas a amostra C é estatisticamente significativa, embora apenas na concentração mais elevada de 200 mg Seq/ml ($p = 0,037$). Nas três experiências o controlo de solvente (DMSO) induziu uma redução da viabilidade celular em cerca de aproximadamente 20%, sendo a amostra C2 a mais próxima deste valor. Este valor foi o mesmo para as restantes frações testadas no ensaio.

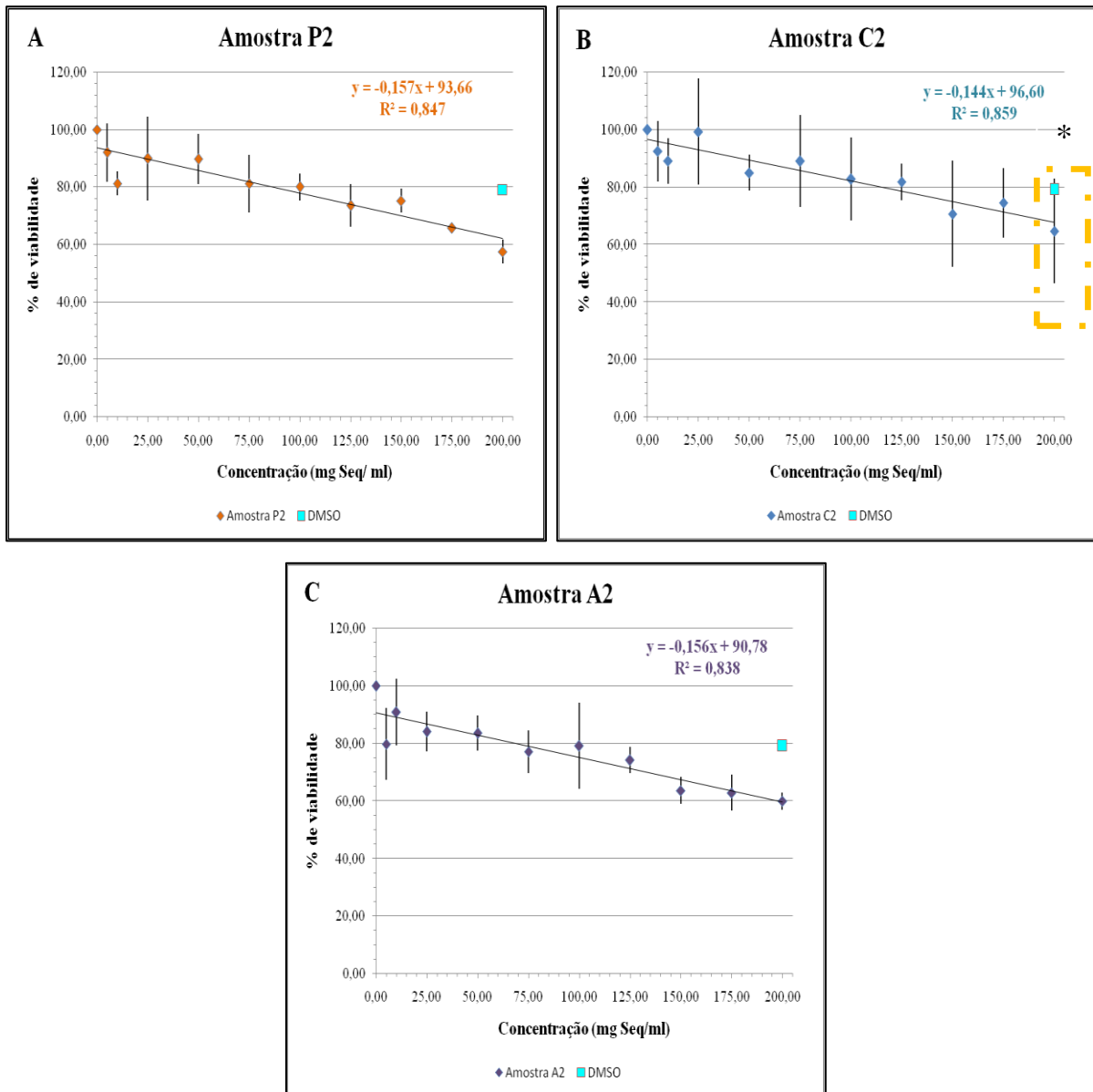


Figura 16 – Resultados do ensaio do VN aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 2 (n-hexano) das diferentes amostras do Estuário do Sado. Resultados são expressos como a percentagem média da viabilidade ($\pm EP$) de 3 experiências independentes. **A** - Amostra P2; **B** – Amostra C2 (* significância estatística, quando comparada com o controlo, na concentração de 200 mg Seq/ml com $p = 0,037$); **C** – Amostra A2

É ainda de referir que as três amostras seguem um comportamento linear, após uma análise de regressão dos dados, o que sugere que em todas as amostras poderá existir uma relação semelhante entre a % de viabilidade celular e a concentração da amostra (Figura 16).

No que diz respeito às frações 3 (diclorometano, Figura 17) das diferentes amostras, observou-se uma maior redução na viabilidade celular para a amostra A (zona dos arrozais), de cerca de 49,38% (Figura 17C), seguido da amostra P (45,14%, Figura 17A) e da amostra C

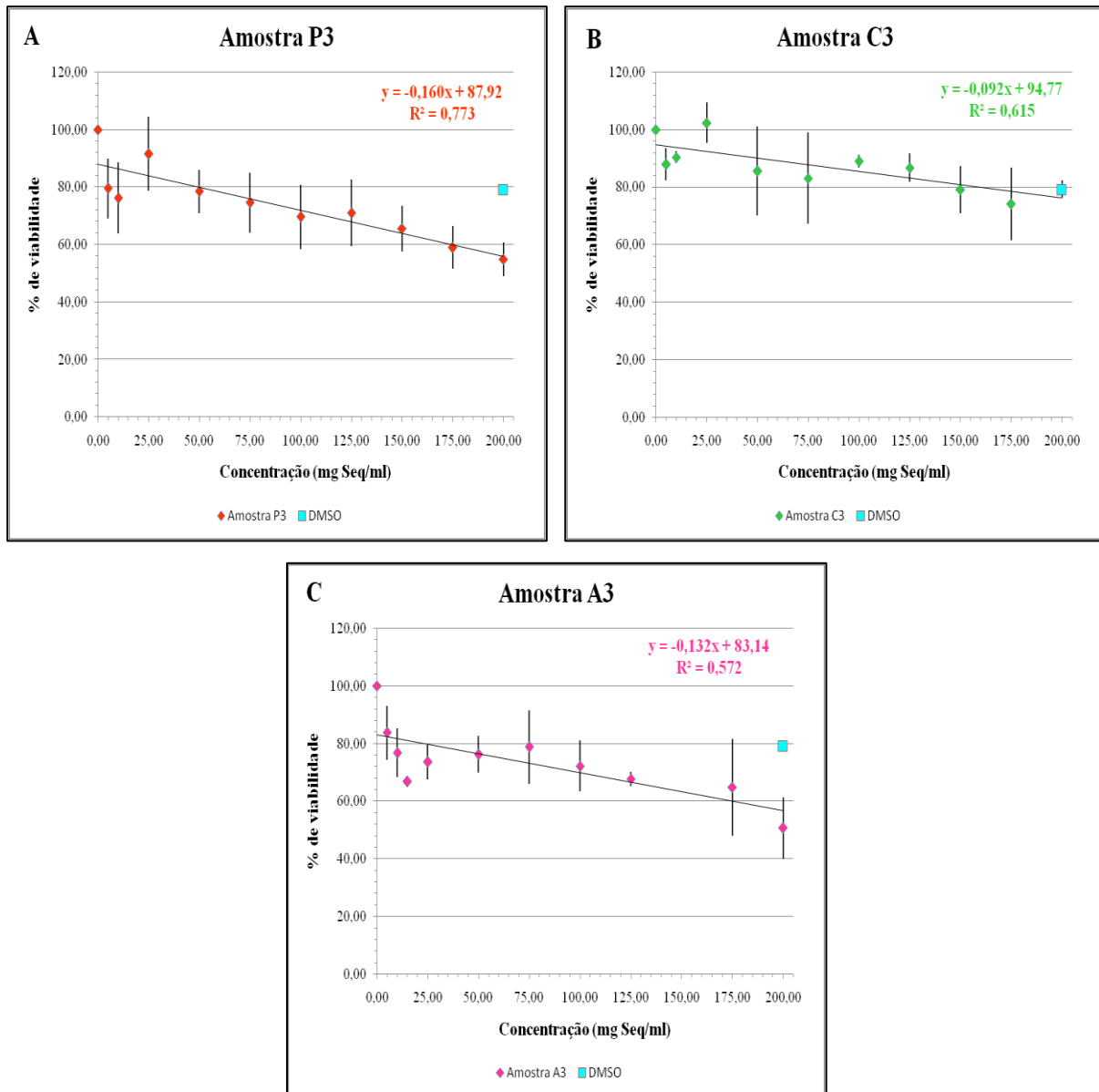


Figura 17 – Resultados do ensaio do VN aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 3 (diclorometano) das diferentes amostras do Estuário do Sado. Resultados são expressos como a percentagem média da viabilidade (\pm EP) de 3 experiências independentes. **A** – Amostra P3; **B** – Amostra C3; **C** – Amostra A3

(20,66%, Figura 17B). De entre estas frações nenhuma demonstrou diferenças significativas quando comparadas com o controlo.

Em relação aos valores de correlação, nas frações 3, estes já não são tão próximos como na fração 2. A amostra P é a que possui um valor mais alto de correlação e por isso possui uma maior correlação entre a % de viabilidade e a concentração da amostra, contrariamente, a amostra A é a que possui um valor menor de correlação, sendo por isso a que revela uma menor correlação, embora todas sigam um comportamento linear (Figura 17A e 17C).

Na fração 4 (metanol, Figura 18) das diferentes amostras, observamos uma maior redução da viabilidade celular com a amostra A, de cerca de 58,26% (Figura 18C). Tal como na fração 3, segue-se a amostra P (Figura 18A) e posteriormente a amostra C (Figura 18B), com valores de 49,58% e 24,99%, respetivamente. Apesar de a fração 4 da amostra A, não apresentar uma clara significância na ANOVA ($p = 0,055$), o valor obtido encontra-se muito próximo do nível de significância pretendido. Por esse motivo utilizou-se o Teste t de Student para se verificar se existia alguma diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade celular do controlo e as concentrações da amostra testadas. Neste teste verificou-se que existem algumas concentrações da amostra que são significativas estatisticamente em relação ao controlo, mais especificamente as concentrações de 75, 125, 150, 175 e 200 mg Seq/ml ($p = 0,038$; $p = 0,040$; $p = 0,014$; $p = 0,019$ e $p = 0,049$ respetivamente).

Analisando os resultados obtidos por amostra, mais especificamente os resultados da percentagem de viabilidade celular obtidos na concentração testada mais alta (200 mg Seq/ml) para todas as frações (Tabela 8), observa-se que a amostra P possui valores de redução de viabilidade para as diferentes frações 2, 3 e 4 testadas muito semelhantes entre si. Quanto à amostra C, foi a amostra que apresentou valores de redução da viabilidade menores. Por fim a amostra A, demonstrou ser a amostra que induziu uma maior redução da viabilidade celular, especificamente nas frações 3 e 4 e apresentou uma redução de 40% para a fração 2.

Analisando os valores da percentagem média de viabilidade celular de todas as frações e amostras (Tabela 8), pode-se evidenciar que a amostra A induziu a uma maior redução da viabilidade celular, seguindo-se da amostra P e por fim a amostra C.

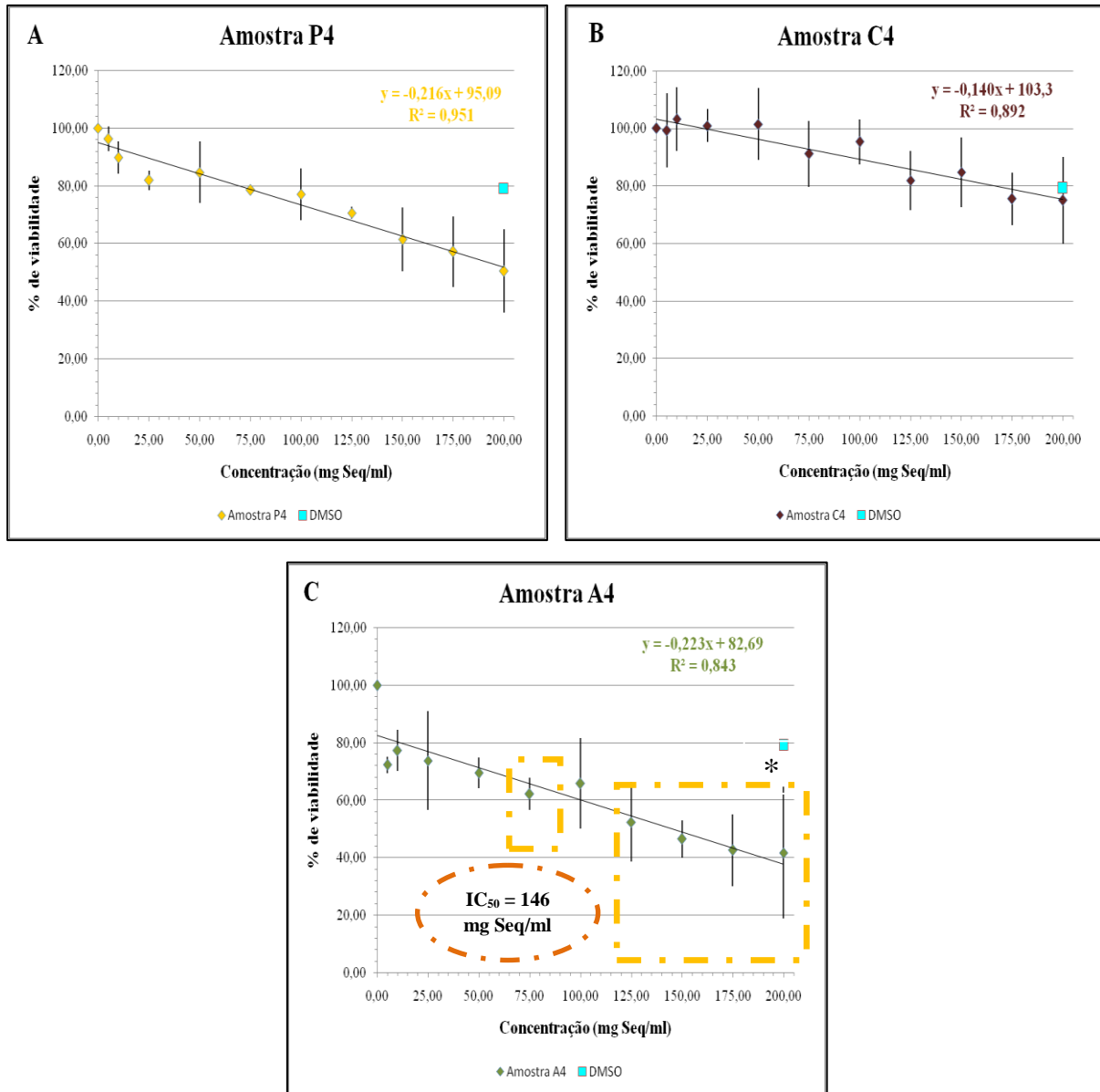


Figura 18 – Resultados do ensaio do VN quando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 4 (metanol) das diferentes amostras do Estuário do Sado. Resultados são expressos como a percentagem média da viabilidade (\pm EP) de 3 experiências independentes. **A** – Amostra P4; **B** – Amostra C4; **C** – Amostra A4 (*significância estatística, quando comparada com o controlo, nas concentrações de 75, 125, 150, 175 e 200 mg Seq/ml com $p = 0,038$; $p = 0,040$; $p = 0,014$; $p = 0,019$ e $p = 0,049$ respetivamente)

Para todas as frações foram estabelecidas curvas de dose-resposta a partir de modelos lineares, tendo estas curvas apresentado comportamentos semelhantes, destacando-se a fração A4 cujo IC_{50} foi calculado a 146 mg Seq/ml (Figura 18 C). Este valor encontra-se dentro da gama de valores testados da fração o que sugere que esta possui contaminantes que provocam a citotoxicidade. Para todas as outras frações os valores de IC_{50} extrapolados encontram-se acima da gama de concentrações testadas, apesar disto é de realçar que muitos dos valores encontram-se próximos da concentração mais alta testada (Tabela 8).

Tabela 8 – Percentagem média de viabilidade celular obtida para o valor máximo das concentrações testadas, no ensaio do VN após a exposição às frações e respectivos IC₅₀

Média da % de viabilidade celular (\pm EP)				
Frações	200 mg Seq/ml	IC ₅₀ mg Seq/ml	<i>p-value</i> *	DMSO ^a
P2	57,54 \pm 4,16	278	NS	79,16
P3	54,86 \pm 5,82	236	NS	79,16
P4	50,42 \pm 14,47	208	NS	79,16
C2	64,76 \pm 18,18	322	0,038	79,16
C3	79,34 \pm 3,09	483	NS	79,16
C4	75,01 \pm 15,06	380	NS	79,16
A2	60,00 \pm 3,01	262	NS	79,16
A3	50,62 \pm 10,68	245	NS	79,16
A4	41,74 \pm 22,90	146**	0,055	79,16

Percentagem média de viabilidade celular (\pm EP) é obtida através de 3 ensaios independentes.* *p-value* obtido quando existe significância estatística ($p \leq 0,05$), quando comparada com o controlo. ** Valor baixo do IC₅₀. ^a Valor obtido para a concentração de 20 μ l/ml de DMSO. NS – Significância não obtida.

3. Ensaio Cometa com enzima FPG

No ensaio do Cometa, não foram utilizados valores de concentração acima de 200 mg Seq/ml devido à interferência de citotoxicidade que pode existir por parte do solvente (DMSO 2%) e das amostras, de forma a evitar falsos positivos. Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Figuras 19, 20 e 21, os dados completos relativos à percentagem média de ADN, ao comprimento e momento da cauda encontram-se no Anexo 1.

Após a exposição de 48h às diferentes concentrações testadas de todos os extratos, verificou-se uma diferente resposta das células às diferentes amostras e respetivas frações. Na fração 2 a amostra P induziu um nível de danos no ADN mais elevado principalmente na última concentração testada, na presença da enzima FPG, 200 mg Seq/ml, com valores na ordem dos 20% de ADN na cauda (Figura 19A). Esta quando comparada com o respetivo controlo de solvente demonstrou significância estatística ($p=0,031$). Além disto, existe também uma diferença estatisticamente significativa nesta mesma concentração quando se comparam os resultados obtidos com e sem a utilização da enzima FPG no tratamento dos nucleóides ($p = 0,004$), o que sugere a indução de lesões oxidativas no ADN detetáveis pela enzima FPG. Contrariamente, as amostras C e A não apresentam diferenças quando comparadas com o controlo de solvente (Figura 19B e 19C, respetivamente).

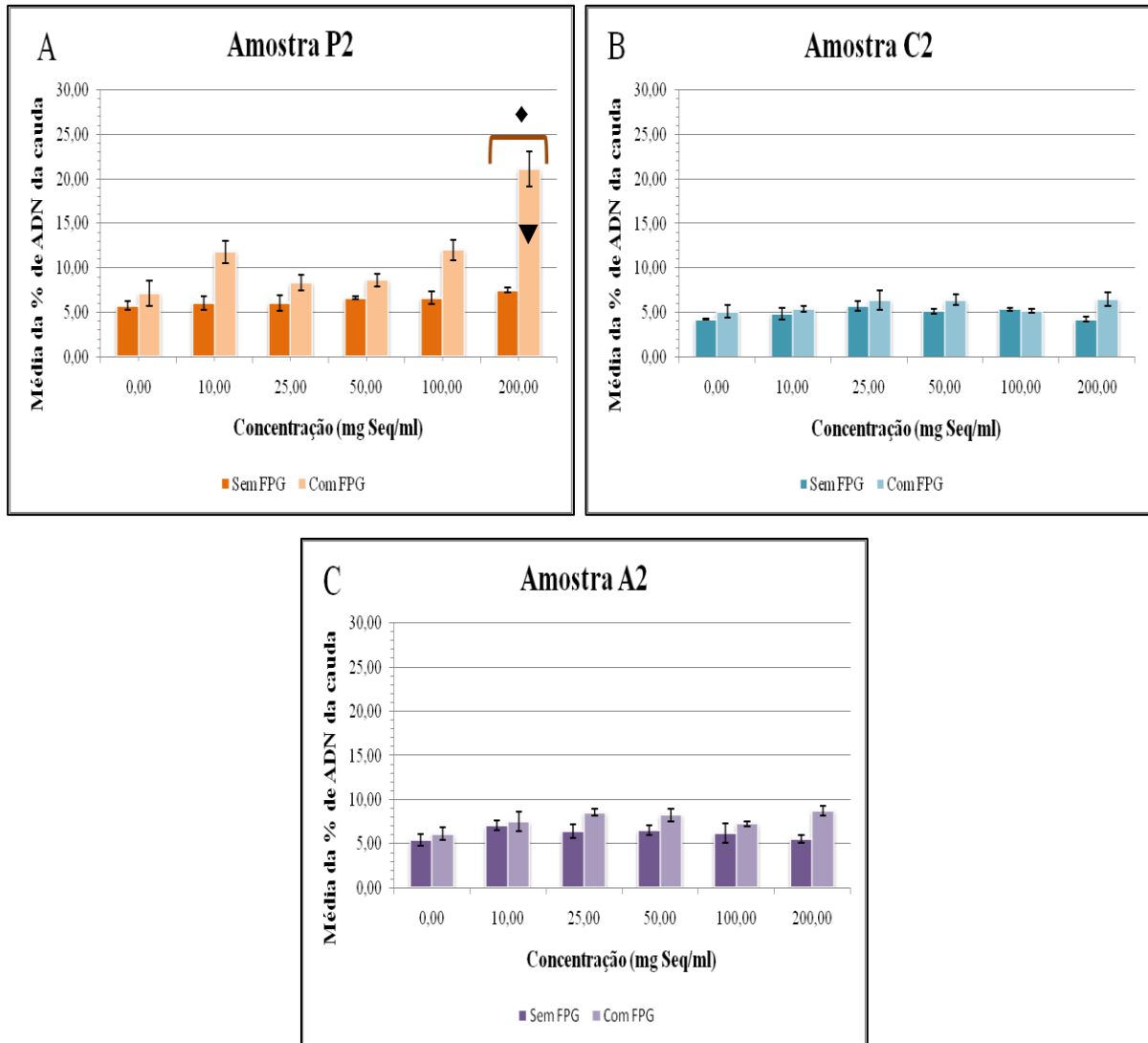


Figura 19 – Resultados do ensaio do cometa aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 2 (n-hexano) das diferentes amostras do Estuário do Sado. Resultados são expressos como a percentagem média de ADN na cauda (\pm EP) de 3 experiências independentes. **A** – Amostra P2; **B** – Amostra C2; **C** - Amostra A2. \blacklozenge - Diferença significativa estatisticamente entre o tratamento com e sem enzima, na mesma concentração. \blacktriangledown - Diferença significativa estatisticamente comparada com o controlo de solvente (com tratamento de FPG). Concentração 0 referente ao controlo de solvente DMSO a 20 μ l/ml. O controlo positivo (H₂O₂) induziu danos de ADN em 36,7 \pm 4,3% sem tratamento enzimático e 60,9 \pm 2,82% com tratamento enzimático.

Quanto à fração 3 os valores obtidos são semelhantes entre as três amostras (Figura 20), sendo a amostra C a que possui valores mais baixos (Figura 20B). Contudo nenhuma das três amostras revelou diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o controlo de solvente (Figura 20), falhando na indução significativa de quebras no ADN nestas condições experimentais.

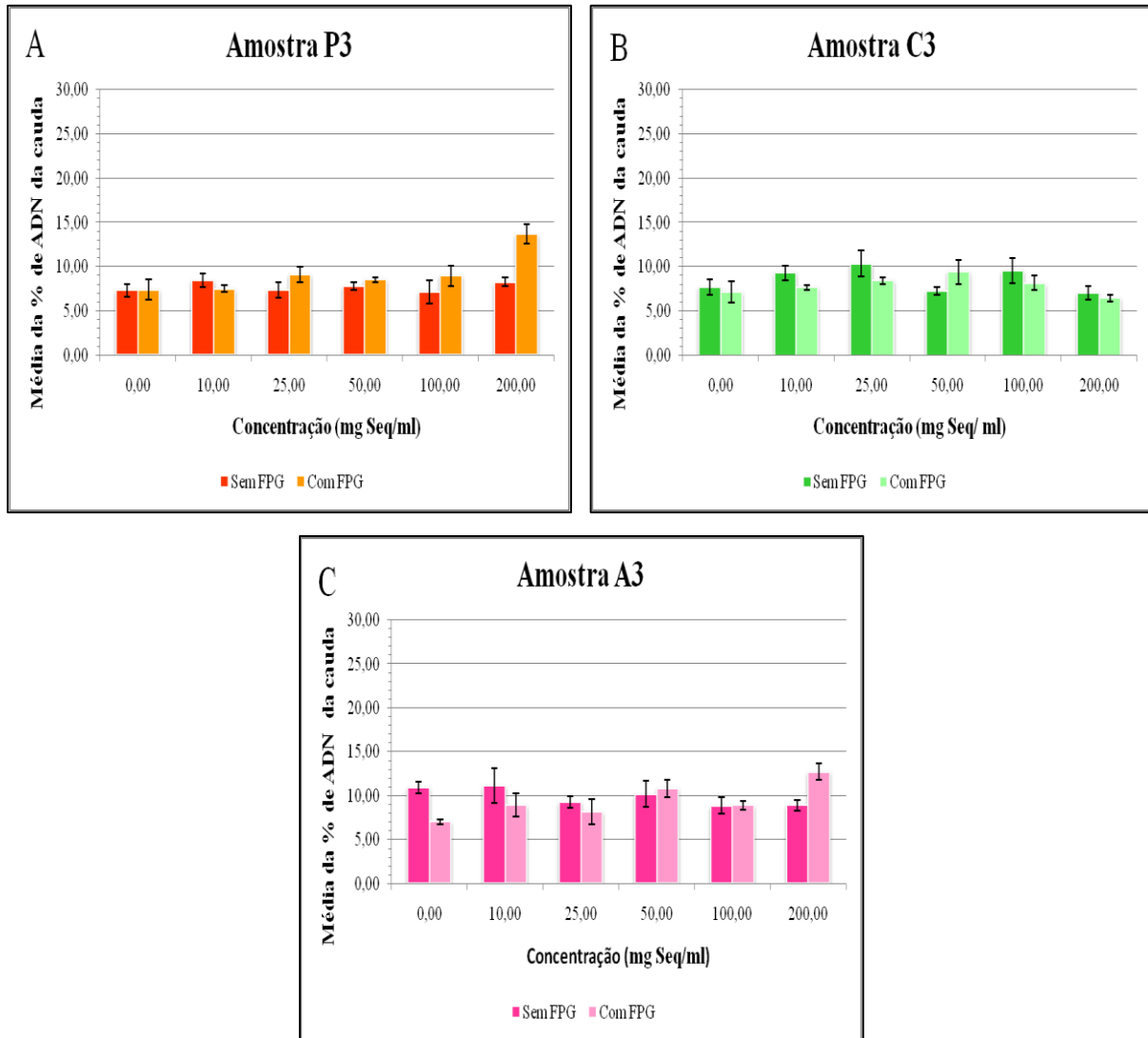


Figura 20 – Resultados do ensaio do cometa aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 3 (diclorometano) das diferentes amostras do Estuário do Sado. Resultados são expressos como a percentagem média de ADN na cauda (\pm EP) de 3 experiências independentes. **A** – Amostra P3; **B** – Amostra C3; **C** - Amostra A3. Concentração 0 referente ao controlo de solvente DMSO a 20 μ l/ml. O controlo positivo (H₂O₂) induziu danos de ADN em 29,4 \pm 0,83% sem tratamento enzimático e 4 \pm 2,49% com tratamento enzimático.

Na última fração, a 4 (Figura 21), a amostra P é mais uma vez a única que provoca danos significativos no ADN (Figura 21A), revelando um aumento significativo da média de percentagem de ADN da cauda a 25 e 200 mg Seq/ml, sem a utilização de enzima FPG, quando comparada com o respetivo controlo de solvente ($p = 0,027$ e $p = 0,014$ respetivamente). Para além disto, houve um aumento significativo da média de percentagem de ADN na cauda em todas as concentrações testadas acima de 25mg Seq/ml quando utilizada a enzima FPG (Figura 21A) com valores de $p = 0,006$; $0,006$; $0,012$ e $0,001$, da menor para a maior concentração. Quanto às amostras C e A, estas não possuem qualquer diferença

significativa estatisticamente neste ensaio, nestas condições experimentais (Figura 21B e 21C), falhando na indução de genotoxicidade.

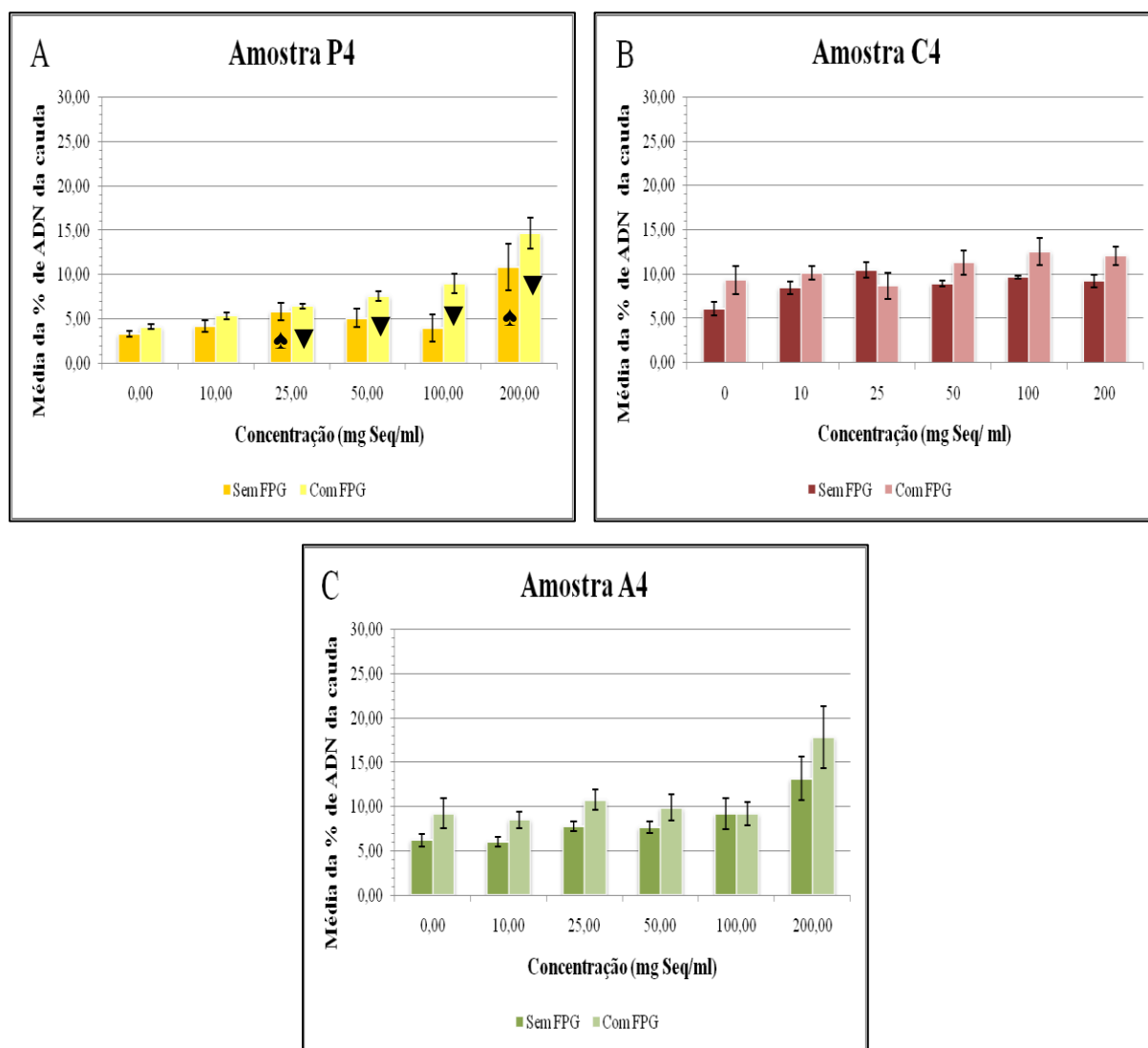


Figura 21 – Resultados do ensaio do cometa aquando a exposição de 48h das células HepG2 a diferentes concentrações da fração 4 (metanol) das diferentes amostras do Estuário do Sado. Resultados são expressos como a percentagem média de ADN na cauda (\pm EP) de 3 experiências independentes. **A** – Amostra P4; **B** – Amostra C4; **C** - Amostra A4 ♠ - Diferença significativa estatisticamente comparada com o controlo de solvente (sem tratamento de enzima). ▼ – Diferença significativa estatisticamente comparada com o controlo de solvente (com tratamento de enzima). Concentração 0 referente ao controlo de solvente DMSO a 20 μ l/ml. O controlo positivo (H₂O₂) induziu danos de ADN em 30 \pm 3,3% sem tratamento enzimático e 55,7 \pm 2,32% com tratamento enzimático.

A amostra P possui diferenças significativas tanto na fração 2 como na fração 4. Estas frações induziram os maiores danos no ADN, nas células HepG2, sendo a fração 4 aquela que tanto com como sem enzima FPG, induz um maior nível de lesões no ADN.

Com base nos resultados dos valores de média de percentagem de ADN na cauda para a concentração mais elevada (Tabela 9), torna-se difícil a ordenação das diferentes frações

quanto à sua genotoxicidade. No entanto, as amostras podem ser ordenadas quanto à sua indução de danos oxidativos no ADN da seguinte forma: a amostra C sendo a que induz menos danos, seguida da amostra A e por fim a amostra P revelando-se a amostra que induz mais danos oxidativos no ADN destas células (Tabela 10).

Tabela 9 – Percentagem média de danos no ADN sem e com a enzima FPG na concentração máxima testada (\pm EP)

Frações	Média de quebras no ADN sem FPG	Média de quebras no ADN com FPG
	200 mg Seq/ml	200 mg Seq/ml
P2	7,49 \pm 0,29	21,09 \pm 2,01
P3	8,26 \pm 0,52	13,67 \pm 1,10
P4	19,16 \pm 2,64	24,62 \pm 1,75
C2	4,25 \pm 0,30	6,48 \pm 0,75
C3	7,03 \pm 0,74	6,48 \pm 0,38
C4	9,23 \pm 0,75	12,09 \pm 1,04
A2	5,53 \pm 0,46	8,72 \pm 0,58
A3	8,91 \pm 0,63	12,71 \pm 0,95
A4	13,21 \pm 2,42	17,90 \pm 3,50

Tabela 10 – Percentagem dos sítios sensíveis à enzima FPG na concentração máxima testada (\pm EP)

Percentagem dos sítios sensíveis à FPG	
Frações	200 mg Seq/ml
C3	0* \pm 0,50
C2	2,23 \pm 0,56
C4	2,86 \pm 0,51
A2	3,19 \pm 0,52
A3	3,8 \pm 0,52
A4	4,69 \pm 1,25
P3	5,41 \pm 1,10
P4	5,46 \pm 1,19
P2	13,60 \pm 2,86

* Valor abaixo de 0

Comparando a mesma fração das diferentes amostras, obtêm-se também significância estatística entre algumas amostras. Para a fração 2, a amostra A e P quando expostas à enzima FPG apresentam uma diferença significativa estatisticamente nas concentrações 100 e 200mg Seq/ml ($p = 0,048$ e $p = 0,012$). Ainda nessa mesma fração, as amostras C e P quando expostas à enzima possuem uma diferença significativa ao nível da média de percentagem de

ADN na cauda, nas concentrações de 10, 100 e 200mg Seq/ml ($p = 0,031$; $p = 0,008$ e $p = 0,008$). Na fração 4, a diferença significativa existente é entre as amostras C e P quando expostas à enzima FPG, nomeadamente na concentração testada mais elevada ($p = 0,020$). Na fração 3 não se verificou nenhuma significância estatística para as amostras testadas. Todas estas diferenças entre as amostras, demonstram que as amostras possuem diferenças entre si. Nas Tabelas 11 pode-se observar esquematizado a comparação entre as frações das amostras e observar-se as que apresentam diferenças significativas.

Tabela 11 – Resultados da comparação estatística entre as mesmas frações de amostras diferentes.

Frações	P2	P3	P4	C2	C3	C4
C2	S	-	-	-	-	-
C3	-	<i>NS</i>	-	-	-	-
C4	-	-	S	-	-	-
A2	S	-	-	<i>NS</i>	-	-
A3	-	<i>NS</i>	-	-	<i>NS</i>	-
A4	-	-	S	-	-	<i>NS</i>

(S – significância obtida; NS – significância não obtida)

Para a avaliação da extensão dos danos feitos no ADN, uma das metodologias usadas como apoio à análise da percentagem de ADN na cauda é a média da % de nucleóides divididos por classes (Figuras 22, 23, 24) onde é possível fazer a comparação dessa média das amostras e frações quando o ensaio é feito com e sem enzima.

Recorrendo à média da % de nucleóides, é possível observar que na amostra P2 quando existe tratamento com FPG a % de nucleóides de classe 0 ($0\% \leq \text{ADN na cauda} < 20\%$) diminui e aumenta a classe 1 ($20\% \leq \text{ADN na cauda} < 40\%$), verificando-se também um aparecimento da classe 2 ($40\% \leq \text{ADN na cauda} < 60\%$) e da classe 3 de nucleóides ($60\% \leq \text{ADN na cauda} < 80\%$), nas duas concentrações mais altas (100 e 200 Seq/ml), o que não se verificou nos nucleóides sem tratamento de enzima FPG (Figura 22A).

Quanto às amostras C2 e A2, quando são expostas ao tratamento com FPG não apresentam alterações nas classes em relação a quando não é utilizada a enzima FPG (Figura 22B e 22C).

Na fração 3 as três amostras testadas, não apresentam diferenças entre as classes quando comparadas sem e com tratamento de FPG (Figura 23).

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

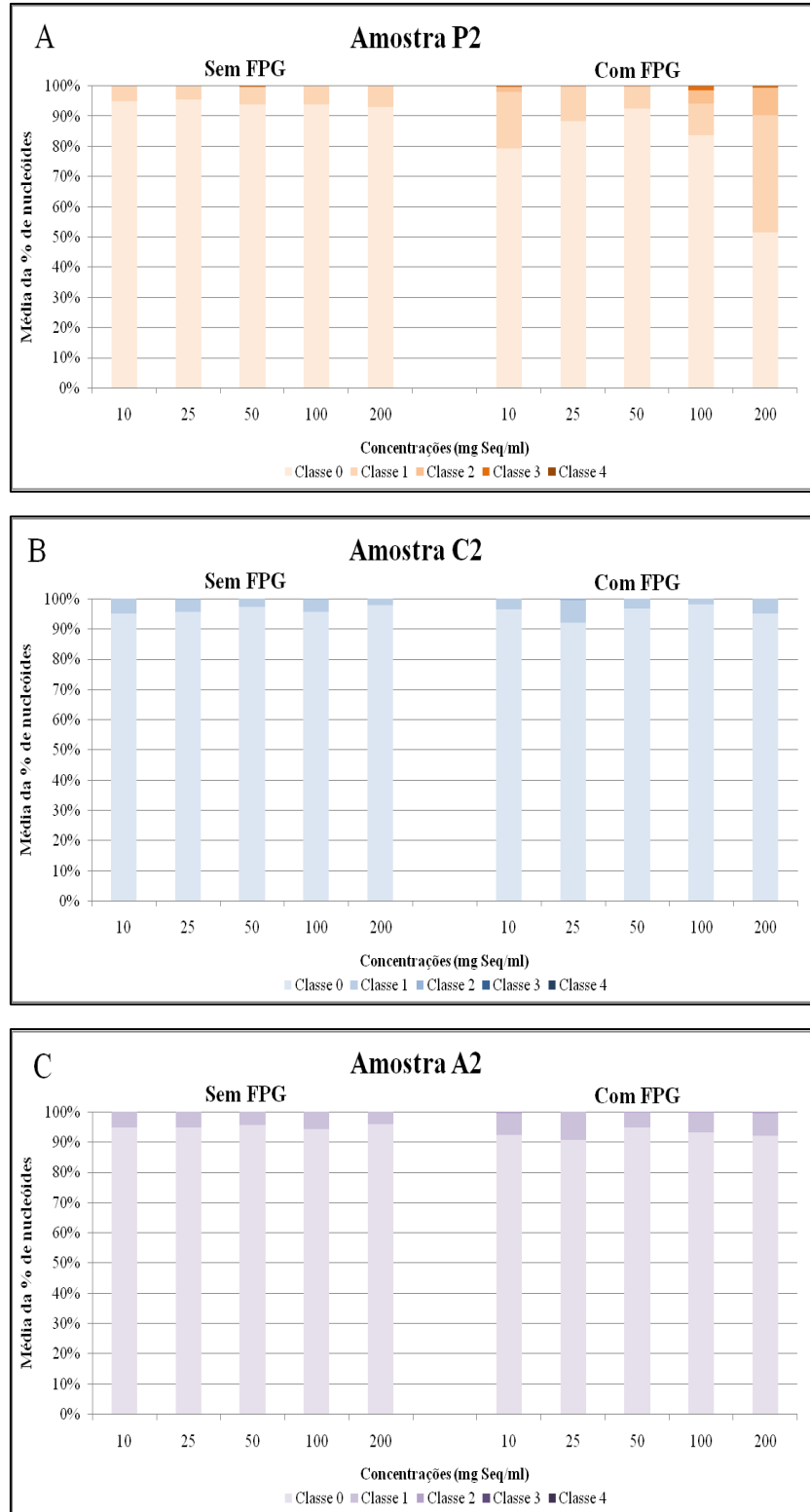


Figura 22 – Distribuição da percentagem média de nucleóides observados por classes. As classes foram obtidas a partir de 3 experiências independentes, em função da percentagem de ADN da cauda obtida em cada amostra, sem e com tratamento de FPG. **A** – Amostra P2; **B** – Amostra C2; **C** – Amostra A2

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

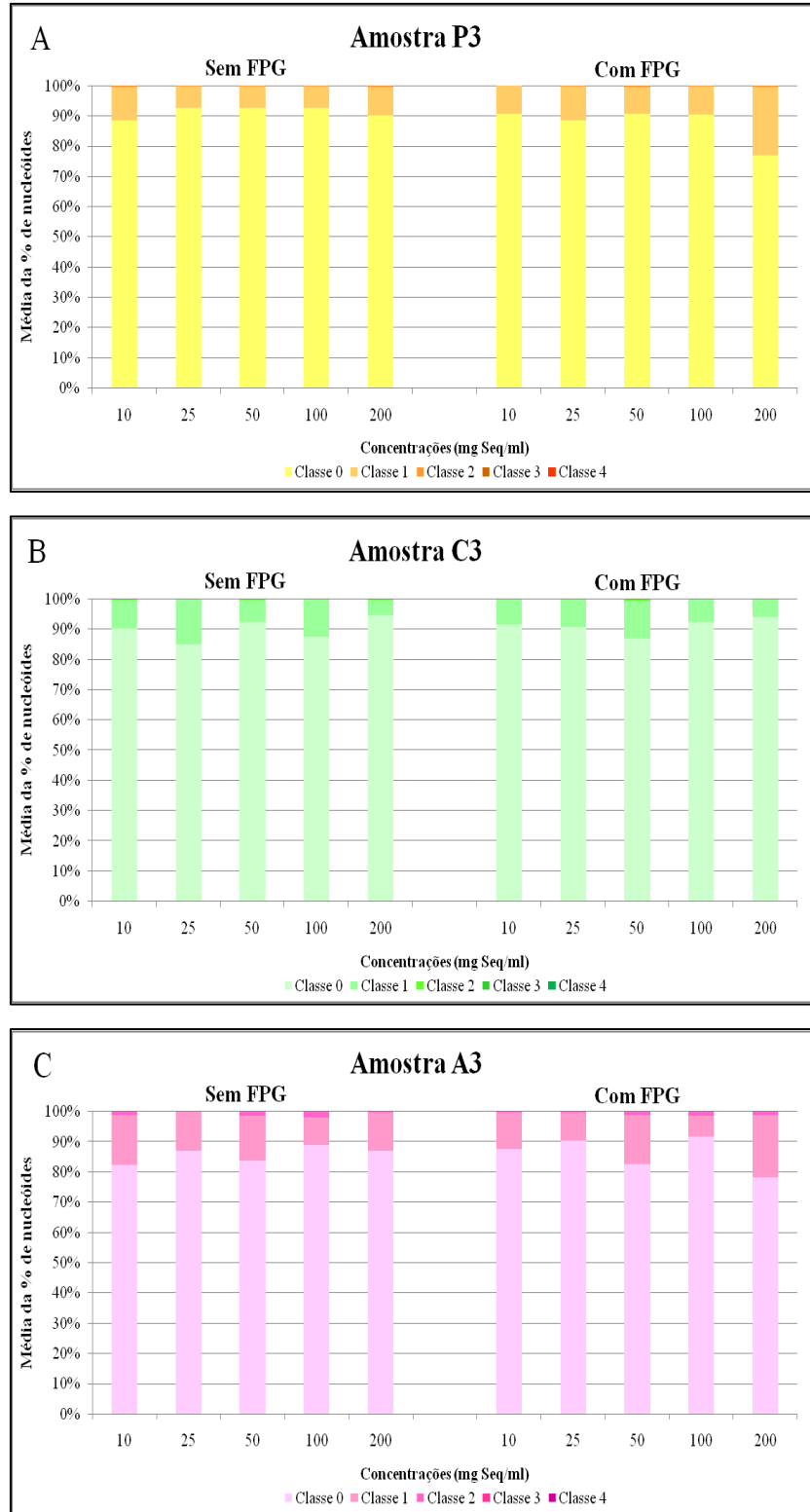


Figura 23 - Distribuição da percentagem média de nucleóides observados por classes. As classes foram obtidas a partir de 3 experiências independentes, em função da percentagem de ADN da cauda obtida em cada amostra, sem e com tratamento de FPG. **A** – Amostra P3; **B** – Amostra P3; **C** – Amostra A3

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

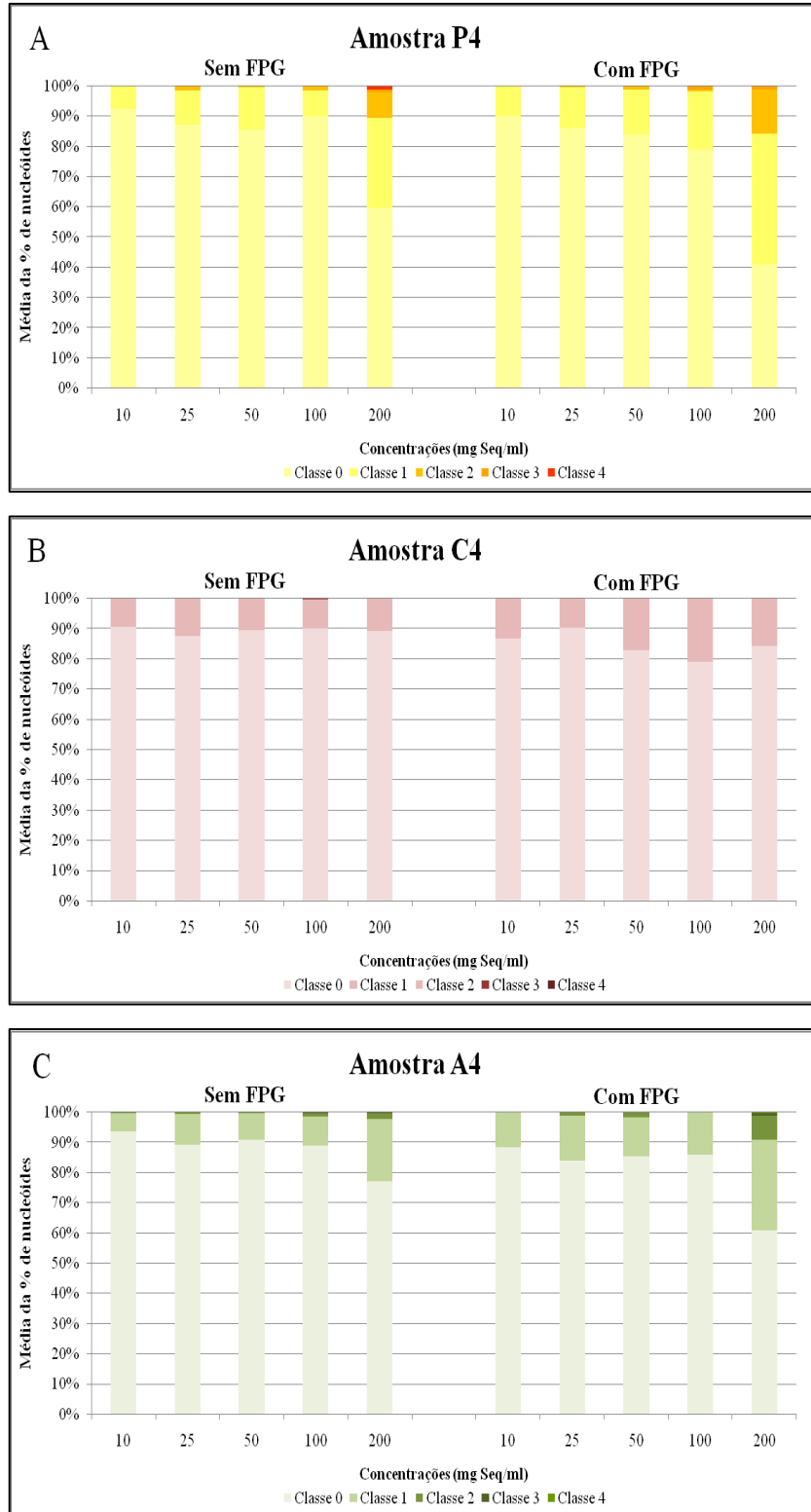


Figura 24 – Distribuição da percentagem média de nucleótidos observados por classes. As classes foram obtidas a partir de 3 experiências independentes, em função da percentagem de ADN da cauda obtida em cada amostra, sem e com tratamento de FPG. **A** – Amostra P4; **B** – Amostra C4; **C** – Amostra A4

Na fração 4, a amostra P, possui diferenças na % de nucleóides sem e com tratamento de FPG, havendo um aumento das classes 2 e 3 na concentração mais alta testada (200 mg Seq/ml) quando esta amostra é exposta ao tratamento com enzima (Figura 24A). O comportamento da amostra A é semelhante ao da amostra P (Figura 24C), e por fim a amostra C não possui alterações nas concentrações testadas sem e com FPG (Figura 24B).

Em suma, quando se compara entre amostras, a C é a mais linear tendo padrão semelhante da média de % de nucleóides nas três frações. Estes resultados encontram-se de acordo com os resultados obtidos tanto no ensaio do VN, onde não existem diferenças significativas nesta amostra. Quanto à amostra A, o padrão de resposta é diferente consoante a fração a que se estão a expor as células, o que também está de acordo com o ensaio do VN onde a fração 4 se destaca por induzir citotoxicidade, nas células HepG2, quando expostas a estas condições ambientais, contrariamente no ensaio do Cometa esta amostra não demonstrou diferenças significativas quando comparada com o controlo de solvente. Por fim, a amostra P no ensaio do Cometa revela induzir danos no ADN, tanto na fração 2 como na fração 4, quando comparadas com o controlo de solvente, destacando-se entre estas duas a 4, dado que apresenta diferenças significativas em todas as concentrações testadas acima dos 25 mg Seq/ml, com FPG (Figura 24A) e possui cometas com maior % de ADN na cauda. Contrariamente no ensaio do VN esta amostra não demonstra qualquer tipo de diferenças quando comparada com o controlo.

DISCUSSÃO

Os estuários, principalmente aqueles que se localizam perto de zonas habitadas estão sujeitos a vários tipos de pressões antropogénicas. O estuário do rio Sado localizado na península de Setúbal, não é exceção, sendo um dos estuários mais sujeito a esse tipo de pressões em Portugal. As pressões exercidas provêm de diversas fontes, entre elas atividades agrícolas exercidas de forma extensiva nas margens do estuário, descargas urbanas e industriais resultantes da cidade de Setúbal, e da sua cintura industrial, e ainda devido ao elevado tráfego marítimo que se faz sentir no porto de Setúbal. Além disso, este estuário é também extremamente utilizado para atividades piscatórias, pois possui algumas espécies de elevado valor económico, sendo uma fonte importante do peixe consumido na região, o que se torna uma mais-valia para a população que aí habita [1,4,26]. Sabe-se que hoje em dia que a contaminação do estuário, das suas águas e sedimentos, pode representar um grande problema para a saúde pública. Isto acontece porque estes contaminantes podem ser acumulados pelas espécies estuarinas nas suas partes edíveis, sendo este facto agravado pela capacidade de bioacumulação de muitas dessas espécies. Estes contaminantes podem ainda acumular-se nos produtos hortofrutícolas que são regados com águas estuarinas, entrando também deste modo para a cadeia alimentar humana [4,26,27,32].

1. Avaliação da desregulação endócrina (ensaio *E-screen*)

Os resultados do ensaio do *E-screen*, ensaio que permite a avaliação da desregulação endócrina, não se revelaram conclusivos devido à falta de reprodutibilidade do mesmo. De facto, após a realização de vários ensaios em que se utilizaram diferentes números de células plaqueadas, diferentes protocolos de coloração (cristal de violeta), diferentes compostos para indução da proliferação celular (17- β -estradiol e Bisfenol A) e, diferentes meios de cultura (com e sem vermelho de fenol), dada a diversidade dos resultados obtidos, conclui-se que não se conseguiu uma boa reprodutibilidade do ensaio. Apesar disto, todos os ensaios efetuados foram importantes pois permitiram a otimização do método.

Em suma, podemos retirar da otimização deste ensaio que as células MCF-7 adquiridas através da ATCC (ATCC No. HTB-22), não são as mais indicadas para o ensaio do *E-screen*. Além disso, ao longo do processo de otimização fomos tirando algumas ilações, entre elas o facto de a coloração com cristal de violeta a 0,2% (Protocolo 1) aparentar ser a mais eficaz, o

meio utilizado parece ser ideal para as células, e não existir grande diferença entre manter ou não o vermelho de fenol no meio no 1º dia de incubação das células.

Para que este ensaio seja reprodutível em ensaios futuros e se realize com sucesso é necessário, tal como preconizado por alguns autores, recorrer a um clone das células MCF-7 isolado nos Estados Unidos e que não se encontra comercialmente disponível. Este clone (clone MCF-7 BUS) foi já utilizado para a realização deste mesmo ensaio por diversos investigadores como Soto e colaboradores (1994) [21] Schilirò e colaboradores (2009) [34] e também Silva e colaboradores (2007) [24], entre outros, revelando ser um clone viável e com bons resultados obtidos.

Contudo e sempre na base da especulação se no nosso caso tivéssemos tido resultados consistentes e reprodutíveis seria de esperar que a amostra P apresentasse níveis de proliferação celular mais elevados em comparação com as amostras A e C, isto porque e recorrendo ao Anexo 2 é possível verificar que a amostra P é a que possui níveis mais elevados de DDT e PCBs, seguida da amostra A e por fim a amostra C. Este facto, é justificável segundo Giesy e colaboradores (2002) [74] pelo facto de os pesticidas organoclorados, como por exemplo o DDT, e os PCBs possuírem a capacidade de ativarem os recetores de estrogénio e induzirem proliferação celular.

Outro estudo [11] revela ainda que concentrações excessivas de HAPs e de metais como o Cd e o Zn podem levar à indução da síntese de vitelogenina e a distúrbios na síntese do cortisol em organismos estuarinos, como os peixes, e uma vez que as amostras P e A possuem quantidades elevadas de alguns desses compostos (Anexo 2), este facto deve ser tido em atenção, pois no caso do Zn os valores obtidos para este estuário chegam a ultrapassar o valor-guia a partir do qual são frequentes ocorrer danos.

2. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade baseia-se na viabilidade celular após as células serem expostas a um certo composto. Considerando o IC₅₀ de cada amostra e as curvas dose-resposta obtidas, observou-se que a fração 4 (fração metanólica) da amostra A é a única que teve a capacidade, na gama de doses testadas, de reduzir a viabilidade abaixo de 50%, nomeadamente quando é usada uma concentração de 146mg Seq/ml (Figura 18C). Assim, pode-se apontar para que esta fração seja a que contém contaminantes com um maior potencial citotóxico, sendo que esta apresenta diferenças significativas em várias das

concentrações testadas (Figura 16C), reforçando a suposição de que este é o extrato com o potencial citotóxico mais elevado nas células HepG2. Existem ainda outras frações com valores de IC₅₀ muito próximos da concentração mais alta testada neste ensaio, destacando-se as frações P3 (fração diclorometanólica) e P4 (fração metanólica), com valores de 237 e 209 mg Seq/ml, respetivamente, (Figuras 17A e 18A), o que sugere que também estas poderão possuir um potencial citotóxico. Após a análise dos resultados do ensaio de citotoxicidade, observou-se que as frações C2 e A4 foram as únicas que demonstraram possuir diferenças significativas em relação ao controlo. No entanto, o extrato C2 apresentou essas diferenças apenas na concentração mais alta, o que poderá ser devido à interferência do controlo de solvente nesta concentração (2% de DMSO) [19], sendo esta hipótese suportada pelo valor de redução de viabilidade celular obtido, de aproximadamente 20% para o DMSO, valor próximo do obtido na concentração mais alta testada deste extrato (Figura 16B).

De acordo com os valores de IC₅₀ as frações podem ser ordenadas da maior concentração inibitória para a menor da seguinte forma: C3 > C4 > C2 > P2 > A2 > A3 > P3 > P4 > A4. Olhando para esta ordenação, verifica-se que a amostra C é a que induz um menor efeito citotóxico, o que pode sugerir que as frações desta amostra contêm menos contaminantes quando comparadas com as mesmas frações das amostras A e P, o que se encontra em concordância com as quantidades de contaminantes existentes em cada amostra (Anexo 2). Além disso, com esta ordenação e analisando apenas as amostras A e P percebemos que a fração 2 é a que possui um menor potencial citotóxico. Contrariamente, a fração 4 é a que possui um maior potencial citotóxico, o que poderá sugerir que esta fração é a que contém a maior parcela dos contaminantes, ou pelo menos aqueles que tem um maior potencial de induzir citotoxicidade nas células.

Com os resultados das frações é possível ainda sugerir que o n-hexano (fração 2) é o solvente que aparentemente menos extrai contaminantes, ou que o tipo de contaminantes que ele extrai não se encontram em grande número nos sedimentos ou ainda que os contaminantes que ele extrai são os menos citotóxicos para esta linha celular. De facto, como composto orgânico apolar, ele extrai contaminantes de natureza mais apolar [75]. Estudos feitos por Varel e colaboradores (2008) [76] e por Oluseyi e colaboradores (2011) [77] afirmam que a maioria dos contaminantes classificados como HAPs e PCBs são de natureza apolar, o que nos permite sugerir que alguns destes compostos possam ter sido extraídos pela nossa fração 2, dependendo da sua polaridade. Por sua vez, o diclorometano (fração 3), um composto

organoclorado dos menos perigosos no meio ambiente, frequentemente utilizado como solvente, apresenta uma polaridade baixa e por isso é considerado pouco polar [78]. Neste trabalho, ele aparenta ser o solvente extrai menos contaminantes, dado que é a fração que não possui nenhum resultado significativo. O metanol (fração 4), por seu lado é um solvente polar o que sugere que esta fração extraiu componentes com uma maior polaridade [79]. O estudo realizado por Varel e colaboradores [76] afirma também que as frações com maior potencial mutagénico são as que possuem natureza polar, o que se encontra de acordo com os resultados obtidos neste trabalho em que as frações 4 são as que induzem quer citotoxicidade quer genotoxicidade. Os compostos de natureza polar podem desempenhar um papel muito importante na contaminação e toxicidade dos sedimentos [76]. Como é possível verificar num estudo feito por Oluseyi e colaboradores [77] o fracionamento de solventes não é linear, isto é, nem todos os compostos de um determinado grupo, como por exemplo os HAPs, são extraídos pelo mesmo solvente. Isso irá depender da polaridade que o composto possui, havendo assim compostos de variados grupos nos diferentes solventes utilizados para a extração de contaminantes.

A avaliação da genotoxicidade foi realizada através do ensaio do cometa. Neste estudo recorreu-se à utilização da enzima FPG, de modo a aumentar a sensibilidade do ensaio, uma vez que esta permite a identificação de potenciais efeitos de *stress* oxidativo no ADN [30], devido ao conhecimento de que muitos contaminantes estuarinos potencialmente presentes nos nossos extratos podem induzir danos no ADN através de mecanismos de *stress* oxidativo [26,30].

Na fração 4 da amostra P observou-se um aumento significativo da percentagem média de ADN na cauda quando comparado com o controlo de solvente, quando não existe tratamento enzimático, o que sugere que este extrato induz lesões no ADN das células HepG2 (Figura 21A). Para além disso, a fração P4 mostra ainda outras diferenças significativas aquando a aplicação do tratamento enzimático, quando se compara com o controlo, revelando danos oxidativos no ADN. Isto reforça por uma lado a sensibilidade da utilização da enzima FPG no ensaio do Cometa, e por outro lado a classificação desta amostra de sedimento como genotóxica. Analisando os dados (Figura 21), verificamos ainda que a fração 4 é a que induz valores mais altos de % de danos no ADN, apesar de as amostras A e C não apresentarem diferenças estatisticamente significativas comparativamente ao controlo de solvente, provavelmente porque o controlo de solvente apresenta valores um pouco mais elevados que

os da amostra P. Analisando a percentagem média de sítios sensíveis à enzima FPG, na concentração testada mais elevada neste ensaio (200 mg Seq/ml), podemos ordenar as frações das amostras da seguinte forma: C3 < C2 < C4 < A2 < A3 < A4 < P3 < P4 < P2 (Tabela 10). Esta análise permite-nos sugerir que a amostra P terá um maior potencial genotóxico, seguida da amostra A e C, quanto aos danos oxidativos de ADN, o que se encontra também em concordância com os valores de contaminação obtidos (Anexo 2).

Estes resultados de genotoxicidade vêm juntar-se aos já obtidos no ensaio de citotoxicidade, que sugerem que as frações podem ser ordenadas segundo o seu potencial citotóxico e genotóxico. Assim, sendo a fração 4 a mais citotóxica e genotóxica nestas condições experimentais, este conjunto de dados reforça a ideia que aquando do fracionamento das amostras esta fração poderá ser aquela que extraiu contaminantes com o potencial de induzir maior citotoxicidade e genotoxicidade nas células. Esta observação encontra-se em concordância com a atribuição dum maior potencial mutagénico das frações mais polares por outros autores [76]. A fração 3 é a fração intermédia quanto à indução de danos no ADN, não havendo, no entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa entre esta fração e o controlo de solvente. Por fim a fração 2, que apesar de ser a que possui valores de indução de danos mais baixos nas amostras A e C, na amostra P demonstra possuir diferenças estatisticamente significativas na concentração mais alta quando comparada com o controlo de solvente. Para além destas diferenças, esta mesma concentração quando comparada sem e com tratamento de enzima possui também diferenças significativas (Figura 19A). Assim, a fração P2, apesar de não ter revelado citotoxicidade no ensaio do VN, revela no ensaio do Cometa induzir genotoxicidade nas doses mais altas, tanto pela indução significativa de quebras como de danos oxidativos no ADN. Observando o Anexo 2, podemos verificar que a amostra P é a única que possui elevadas quantidades de HAPs e pesticidas, o que pode explicar as diferenças estatisticamente significativas obtidas na fração 2, uma vez que já foi sugerido anteriormente que o n-hexano extrai a maioria deste tipo de substâncias [76]. Contudo, estudos feitos em extratos de sedimentos de solo não têm conseguido estabelecer uma correlação significativa entre o conteúdo em HAPs e o potencial genotóxico da amostra, chegando mesmo a demonstrar que este tipo de contaminantes apenas representa 10 a 20% de toda a atividade mutagénica verificada nos extratos. Este facto sugere que os efeitos genotóxicos são provocados por diversos compostos orgânicos [76], o que pode explicar o facto de a amostra P apenas possuir diferenças na concentração mais alta apesar das

elevadas quantidades de HAPs. Além disso, o facto desta amostra P induzir também lesões genotóxicas na fração 4, e possuir quantidades muito elevadas de certos metais, sugerimos que estes metais presentes se encontrem em maior concentração nesta fração. Não obstante, não se poderá excluir a hipótese de que alguns HAPs com uma maior polaridade possam também estar retidos nesta fração, como já referido anteriormente [77].

Fazendo a comparação entre os valores das frações das diferentes amostras verificamos que existem diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as mesmas concentrações, nomeadamente, entre as frações P2 e C2, P2 e A2, P4 e C4 quando analisadas com a presença de tratamento de enzima (Tabela 11). Todas estas diferenças sugerem que existe uma diferença na quantidade e/ou na natureza dos contaminantes que cada fração possui, refletindo as diversas pressões exercidas nos locais de colheita das diferentes amostras. Assim com os resultados obtidos tanto no ensaio de citotoxicidade como no ensaio de genotoxicidade, parece existir uma área de maior contaminação (amostra P), zona de contaminação moderada (amostra A) e uma zona de baixa contaminação (amostra C), o que se encontra em concordância com os valores de contaminação (Anexo 2). Os nossos resultados encontram-se também de acordo com estudos feitos anteriormente por Costa e colaboradores (2011) [32], que revelaram outro tipo de consequências da exposição a estes sedimentos do Estuário do Sado, entre elas efeitos genotóxicos verificados em *Solea senegalensis* que vive neste estuário [1]. Existem ainda estudos de avaliação de sedimentos feitos noutros estuários, como por exemplo na Noruega, que revelam um padrão de contaminação semelhante ao nosso trabalho, uma vez que demonstram que sedimentos recolhidos perto de zonas industriais se encontram fortemente poluídos, contendo elevadas concentrações de HAPs e PCBs [80].

As zonas de amostragem possuem diferentes tipos de contaminantes, principalmente devido a três tipos de fatores: as fontes de poluição; as propriedades geoquímicas dos sedimentos, dado que existem diferenças na capacidade de adsorção de contaminantes pelo sedimento; e o hidrodinamismo associado a esses diferentes locais, sendo todos estes fatores importantes na determinação da citotoxicidade de cada um dos sedimentos [30].

As três amostras induziram diferentes efeitos nas células HepG2 o que pode estar associado às diferentes pressões antropogénicas exercidas nos diferentes locais, pois como se pode observar na Tabela 6 as amostras possuem diferenças consoante o local de recolha. Analisando com maior pormenor os locais de recolha das amostras conseguem avançar hipóteses que explicam algumas dessas diferenças. O local de recolha da amostra P, situa-se a

norte do estuário, e parece sofrer uma fraca influência de correntes fluviais, tendo um baixo hidrodinamismo, o que, conseqüentemente, origina uma maior deposição e acumulação de partículas e contaminantes tanto hidrofóbicos (por exemplo alguns HAPs) como hidrófilos (por exemplo metais) que podem ser adsorvidos pelas partículas que formam os sedimentos. A variação espacial da concentração de metais nos sedimentos estuarinos, principalmente os que se encontram perto de áreas urbanizadas, como é o caso do Estuário do Sado, é em geral, atribuída às misturas de contaminantes originários de fontes de poluição industrial [80]. Quanto ao local da amostra A, este situa-se a sul do estuário e parece ter um nível de contaminação mais baixo ou diferente do da amostra P. Isto pode explicar-se atendendo às diferentes fontes de contaminação, dado a amostra A ser maioritariamente influenciada por culturas intensivas de arroz, algumas práticas agrícolas e não se encontrar exposta, pelo menos de forma direta, à indústria pesada. Este conhecimento corrobora o facto desta amostra não conter níveis significativos de contaminantes mais ligados à indústria, como por exemplo HAPs ou PCBs. Para além disso, os níveis de metais existentes devem-se, provavelmente, a fatores naturais relacionados com a natureza geoquímica dos terrenos e também à existência de antigas explorações mineiras no Canal de Alcácer [4]. Contudo, não pode ser excluída a hipótese de existir um transporte deste tipo de contaminantes através de alguma corrente da zona norte para a zona sul do estuário. Por fim quanto ao local da amostra C, este situa-se mais longe dos sítios de maior acumulação dos contaminantes, apesar de se situar também a norte do estuário e ainda perto da zona industrial e urbana de Setúbal. As frações desta amostra não revelaram citotoxicidade nem genotoxicidade, o que provavelmente acontece devido à interseção de diferentes fatores, tais como, o elevado hidrodinamismo exercido tanto do rio como do mar, o baixo nível de deposição e acumulação de partículas devido às características do sedimento desse local (sedimento arenoso) o que indica um nível de contaminação mais baixo. Todos estes fatores associados com os resultados deste trabalho e de outro realizado recentemente por Pinto (2011) [30] sugerem a possibilidade de usar esta zona de amostragem (amostra C) como uma potencial referência para este estuário. Contudo, existem outros estudos que apontam a zona norte do estuário, onde esta amostra se encontra inserida, como uma zona onde os contaminantes que são descarregados no estuário são predominantemente retidos [1,4], mas os nossos resultados sugerem que poderá existir uma deposição preferencial ao longo da margem.

Apesar de não haver dados da análise química das frações, tendo em conta os valores das análises das amostras totais, é possível sugerir uma distribuição dos diferentes contaminantes pelas três frações devido às diferentes polaridades que estes possuem. Através do Anexo 2, verificamos que a amostra C possui quantidades relativamente baixas de contaminantes o que vai de encontro à sugestão de amostra limpa e de ausência de efeitos biológicos em células humanas. A amostra A, pelo contrário já possui quantidades de metais acima dos valores-guia (TEL e PEL) que podem estar associados à indução de lesões no ADN. A amostra P como já era esperado, devido aos resultados obtidos no decorrer deste estudo é a que apresenta valores mais elevados de alguns metais e de alguns HAPs ultrapassando também alguns dos valores-guia. Estas quantidades de contaminantes analisados nas análises químicas, encontram-se de acordo com outros estudos feitos sobre sedimentos estuarinos em que se estabeleceu uma associação entre valores elevados de HAPs e metais e zonas industriais, mais urbanizadas e portos [30], tal como se verifica na amostra P.

O facto de algumas amostras e concentrações induzirem citotoxicidade e não genotoxicidade ou vice-versa, pode ser hipoteticamente explicado pelas misturas de contaminantes muito complexas que existem nas amostras e ainda pela capacidade desses mesmos contaminantes interagirem uns com os outros. Além disso, tal como este estudo, existem outros feitos anteriormente em que foram estudados sedimentos estuarinos e que demonstraram que induzem citotoxicidade não induzem obrigatoriamente genotoxicidade [81], uma vez que os mecanismos que medeiam ambos os processos podem diferir.

Hoje em dia, é já sabido que os metais, PCBs, HAPs e DDT se encontram diretamente associados com a formação de ROS ou de alguns metabolitos com um grande potencial oxidativo [12, 15], e de facto, algumas das frações das amostras estudadas neste trabalho foram capazes de induzir *stress* oxidativo, ao nível genético, nas células. Para além disso, estes resultados estão de acordo com os resultados da análise química dos sedimentos (Anexo 2), dado que a amostra P que é a mais contaminada é também a que possui um nível mais elevado de sítios sensíveis à enzima FPG, sugerindo a existência de lesões oxidativas no ADN. Por hipótese, estas poderão estar associadas à existência de HAPs e metais nos extratos. Esta amostra possui ainda os valores mais elevados de pesticidas que são também conhecidos por induzir diversos danos no ADN das células, nomeadamente danos oxidativos [81], sugerindo que os pesticidas com uma menor polaridade possam ter sido extraídos pelo solvente n-hexano (fração 2), uma vez que esta fração é a que possui maior % de danos

oxidativos na amostra P. O facto de a fração 4, ser a que produz citotoxicidade na amostra A e genotoxicidade na amostra P, pode ser hipoteticamente explicado pela diferença de contaminantes das amostras, pois a amostra A possui essencialmente contaminantes metálicos, como já foi referido anteriormente, o que pode indicar que a genotoxicidade da amostra P possa ser preferencialmente induzida por metais, HAPs e PCBs ou pela sua mistura. A genotoxicidade da amostra P poderá ser explicada pelo facto dos metais constituírem cerca de 40% dos compostos cancerígenos, considerados hoje em dia os principais compostos genotóxicos presentes no ambiente, acoplado ao facto de possuírem a capacidade de iniciar reacções que conduzem à formação de ROS que possuem efeitos genotóxicos [82].

Em resumo e englobando todos os resultados obtidos geraram-se informações importantes e complementares para a caracterização da citotoxicidade e genotoxicidade dos sedimentos do Estuário do Sado. Apesar de todos estes resultados, para a correta avaliação do risco de exposição para a saúde pública e humana, devem ser considerados mais ensaios para a complementação dos resultados já obtidos, pois existe um risco de os ensaios realizados não revelarem todo o potencial tóxico das amostras [3].

Como já foi referido anteriormente, o Estuário do Sado é um importante local de pesca da região de Setúbal e por isso todas as amostras foram recolhidas em locais que são frequentemente usados como locais de pesca. As espécies capturadas são uma grande fonte alimentar nesta zona e também uma importante parcela na economia local [1,4,26]. Isto torna o problema da contaminação ambiental do estuário num problema de saúde pública não só nesta zona, mas também numa região mais alargada do país, uma vez que muitas das espécies aí pescadas são distribuídas a nível regional. Para além disso, os produtos hortofrutícolas que se cultivam nas margens deste estuário encontram-se também expostas aos contaminantes ainda que de forma indireta, pois são regados com as águas do estuário. Consequentemente, a população vai estar mais uma vez exposta uma vez que esses produtos fazem parte da sua alimentação diária. Estudos realizados em áreas estuarinas de outros países da União Europeia têm revelado uma associação entre as descargas de áreas industrializadas e mais urbanizadas e o potencial risco mutagénico dos sedimentos estuarinos [83]. Outros estudos demonstram ainda a existência de bioacumulação de contaminantes nas partes edíveis de várias espécies aquáticas, o que é uma agravante para as populações que consomem estas espécies, uma vez que muitos dos contaminantes presentes no estuário em concentrações mais altas estão

diretamente associados à ocorrência de doenças cardiovasculares graves e diversos tipos de cancro, como o cancro mamário [19,31].

Os presentes resultados conjuntamente com os de outros estudos apontam para a importância de continuar a estudar o impacto da exposição a esses contaminantes estuarinos na saúde humana e na ecologia do ecossistema. Uma vez que a identificação dos contaminantes presentes nos sedimentos e o estudo dos efeitos adversos que estes podem causar, representam um contributo relevante para a compreensão do risco a longo prazo para os ecossistemas envolventes [82]. Para a avaliação do potencial dos contaminantes sedimentares para indução de efeitos genotóxicos devem ser então feitos mais ensaios, cujos resultados complementem os já obtidos e apresentados neste trabalho. Uma dessas possibilidades é a realização do ensaio dos micronúcleos, que avalia a atividade clastogénica e aneugénica de poluentes cancerígenos [83,84]. Uma vez que as nossas amostras possuem As, Cd e benzo[a]pireno que, segundo a IARC pertencem ao Grupo 1 (sendo compostos já identificados como mutagénicos e cancerígenos para os humanos e animais) e ainda possuem Ni, Pb, benzo[a]antracina, criseno, benzo[a]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno e DDT que pertencem ao Grupo 2B (compostos provavelmente cancerígenos para o Homem), e são suspeitos de induzir a longo prazo efeitos genéticos adversos, o ensaio do micronúcleos seria uma boa forma de complementar os resultados obtidos neste estudo[83,85].

Os resultados obtidos não devem, porém, ser ignorados, pois estes resultados em conjunto com as análises químicas das amostras não fracionadas e com os resultados do Anexo 2, sustentam as afirmações de anteriores estudos realizados neste estuário que revelam que este possui um risco moderado de contaminação. Além disso, foi possível verificar que existem grandes quantidades de alguns metais, como o As, Cr, Cu, Pb e Zn, que ao contrário da maioria dos poluentes orgânicos, não podem ser quimicamente ou biologicamente degradados, ficando acumulados nos sedimentos do estuário [86]. Outros compostos que também se encontram no estuário são os pesticidas, diversos produtos deste tipo já foram proibidos devido aos seus efeitos mutagénicos e cancerígenos, contudo estes ainda persistem sobretudo em sedimentos e no solo devido às suas propriedades lipofílicas, que os tornam contaminantes a ter em conta aquando a avaliação dos sedimentos estuários [87].

Para consubstanciar uma melhor avaliação da contaminação deste estuário poderia sugerir-se a recolha e análise de mais amostras deste estuário, uma vez que neste trabalho é apenas utilizada uma amostra de cada zona do estuário. Além disso, podem ser

experimentados outros tipos de fracionamento de modo a que se consigam separar de uma forma mais eficaz os diferentes tipos de contaminantes consoante as suas características, o que não se sabe se foi conseguido neste método de fracionamento por não se terem resultados de análises químicas das frações [88]. Exemplos de outros fracionamentos que podem ser utilizados são o fracionamento por banhos de ultrassons ou por micro-ondas [77].

Uma vez que diversos compostos encontrados no estuário se encontram em mais que um ecossistema, é difícil para a população humana evitar a sua exposição, mesmo que seja mínima [77]. Dado isto torna-se de extrema importância avaliar os efeitos que estes compostos podem provocar no Homem e avaliar as quantidades em que estes se encontram no meio ambiente, neste caso específico no Estuário do Sado.

Deste estudo podemos retirar como conclusões finais que, um estudo deste tipo permite seleccionar as frações que deverão ser prioritariamente analisadas quanto ao seu conteúdo de contaminantes, quando não existe possibilidade ou verba para se fazer uma análise a todas as frações. Informa também sobre a utilidade da extração com diferentes solventes para estudos futuros, isto é, devido aos nossos resultados, o diclorometano parece não revelar muita importância, podendo-se ainda propor em estudos futuros a utilização de n-hexano:metanol como mistura de extração. Ainda com a perspectiva de ensaios futuros, existe a possibilidade de se realizarem ensaios *in vivo* com estas amostras, de forma a entender melhor os seus efeitos no contexto de um organismo por inteiro. Concluimos ainda que o ensaio do Cometa e as células HepG2 são adequados para a avaliação de efeitos genotóxicos deste tipo de amostras. Por fim, é importante focar que se espera integrar os dados obtidos neste estudo com os da toxicidade em organismos aquáticos, valores de contaminantes e com os dados do inquérito realizado a uma população local, de modo a que estes fatores todos em conjunto, contribuam para a avaliação do risco que este estuário pode ter para a saúde dessa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Costa P.M., Neuparth T.S., Caeiro S., Lobo J., Martins M., Ferreira A.M., Caetano M., Vale C., DelValls A. & Costa M.H. 2011. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus *in situ* studies. *Environmental Research*. 111 (1): 25-36.
- [2] Fernández-Tajes J., Flórez F., Pereira S., Rábade T., Laffon B. & Méndez J. 2010. Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. *Environmental Monitoring and Assessment*. 177:289–300.
- [3] Chen G., White P.A. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research*. 567: 151-225.
- [4] Caeiro S., Costa M.H., Ramos T.B., Fernandes F., Silveira N., Coimbra A., Medeiros G. Medeiros & Painho M. 2005. Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. *Ecological Indicators*. 5:151–169.
- [5] Antunes, J.C.S. 2011. *Solea senegalensis* como bioindicador da qualidade sedimentar estuarina. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente.
- [6] Mil-Homens M.,Stevens R.L.,Cato I.,Abrantes F. 2007. Regional geochemical baselines for Portuguese shelf sediments. *Environmental Pollution*. 148: 418-427.
- [7] Staal Y.C., Hebels D.G., van Herwijnen M.H., Gottschalk R.W., van Schooten F.J., van Delft J.H. 2007. Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis*. 28: 2632-2640.
- [8] Ohea T., Watanabe T. & Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*. 567: 109–149.
- [9] IARC. 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 92: 35-121.
- [10] IARC, A Review of Human Carcinogens, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100 F.
- [11] Bila D.M. & Dezotti M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*. 30 (3): 651-666.
- [12] Beyersmann D. & Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*. 82: 493-512.
- [13] Matovic V., Buha A., Bulat Z., Dukic-Cosic D. 2011. Cadmium Toxicity Revisited: Focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*. 62: 65-76.

- [14] IARC. 1991. Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 53: 179-249.
- [15] Pérez-Maldonado I.N., Herrera C., Batres L.E., González-Amaro R., Díaz-Barriga F., Yáñez L. 2005. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environmental Research*. 98:177-184.
- [16] Marabini L., Calo R., Fucile S. 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153,138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicology in Vitro*. 25: 1045-1052.
- [17] IARC. 1987. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 7: 367-373.
- [18] Ludewig G., Lehmann L., Esch H., Robertson L.W. 2008. Metabolic activation of PCBs to carcinogens in vivo - A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 25: 241-246.
- [19] Schilirò T., Pignata C., Rovere R., Fea E and Gilli G. 2009. The endocrine disrupting activity of surface waters and of wastewater treatment plant effluents in relation to chlorination. *Chemosphere*. 75 (3): 335-340.
- [20] Landrigan P., Garg A., and Droller D.B.J. 2003. Assessing the Effects of Endocrine Disruptors in the National Children's Study. *Environmental Health Perspectives*. 111:1678-1682.
- [21] Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N. and Serrano F.O. 1995. The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. *Environ Health Perspect*. 103(7):113-122.
- [22] Swart J.C., Pool E.J. and Wyk J.H. 2011. The implementation of a battery of in vitro and in vivo bioassays to assess river water for estrogenic endocrine disrupting chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74:138-143.
- [23] Karajapakse N., Silva E., Scholze M. and Kortenkamp A. 2004. Deviation from Additivity with Estrogenic Mixtures Containing 4-Nonylphenol and 4-*tert*-Octylphenol Detected in the E-SCREEN Assay. *Environmental Science & Technology*. 38: 6343-6352.
- [24] Silva E., Scholze M., Kortenkamp A. 2007. Activity of Xenoestrogens at Nanomolar Concentrations in the E-Screen Assay. *Environmental Health Perspectives*. 115 (1): 91-97.
- [25] Ribeiro C., Pardal M.A., Tiritan M.E., Rocha E., Margalho R.M., Rocha M.J. 2009. Spatial distribution and quantification of endocrine-disrupting chemicals in Sado River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*. 159 :415-427.

- [26] Costa PMB. 2008. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutation Research*. 654: 29-37.
- [27] Caeiro S., Costa M.H., DelValls A., Repolho T., Gonçalves M., Mosca A., Coimbra A.P., Ramos T.B., Painho M. 2009. Ecological risk assessment of sediment management areas: application to Sado Estuary, Portugal. *Ecotoxicology*, 18: 1165-1175.
- [28] Long E.R., MacDonald D.D. 1998. Recommended uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems, *Human and Ecological Risk Assessment*. 4:1019-1039.
- [29] Carreira S. 2011. Qualidade de bivalves estuarinos explorados para consumo: potencial risco para a espécie *Ruditapes decussatus*: um estudo de caso. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.
- [30] Pinto M. 2011. Characterization of cytotoxicity and genotoxicity of sediments from a potentially contaminated estuary. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Departamento de Biologia Animal.
- [31] Costa P.M., Caeiro S., Diniz M.S., Lobo J., Martins M., Ferreira A.M., Caetano M., Vale C., DelValls T.A., Costa M.H. 2009. Biochemical endpoints on juvenile *Solea senegalensis* exposed to estuarine sediments: the effect of contaminant mixtures on metallothionein and CYP1A induction. *Ecotoxicology*. 18: 988-1000.
- [32] Costa P.M., Caeiro S., Lobo J., Martins M., Ferreira A.M., Caetano M., Vale C., DelValls T., Costa M.H. 2011. Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Marine Pollution Bulletin*. 62: 55-65.
- [33] Costa P.M., Diniz M.S., Caeiro S., Lobo J., Martins M., Ferreira A.M., Caetano M., Vale C., DelValls T.A., Costa M.H. 2009. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*. 92: 202-212.
- [34] Schilirò T., Gorrasi I., Longo A., Coluccia S. and Gilli G. 2011. Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the E-screen assay in relation to pesticide residues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127(1-2):139-46.
- [35] Olea N. 2000. Disruptores endócrinos: posibles medidas de intervencion. La perspectiva europea. *Quadern CAPS*. 29: 36-42.
- [36] Yu M., Tsunoda H., Tsunoda M. *Environmental Toxicology. Biological and Health Effects of Pollutants*. Taylor & Francis Group. 3rd edition.

- [37] Bicchi C., Schilirò T., Pignata C., Fea E., Cordero C., Canale F. and Gilli G. 2008. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. *Science of the Total Environment*. 407(6):1842-51.
- [38] Witorsch R.J. 2002. Endocrine Disruptores: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 36: 118-130.
- [39] Falconer I.R., Chapman H.F., Moore M.R. and Ranmuthugata G. 2006. Endocrine-Disrupting Compounds: A Review of Their Challenge to Sustainable and Safe Water Supply and Water Reuse. *Environmental Toxicology*. 21(2): 181-91.
- [40] Bianco B., Christofolini D.M., de Souza A.M.B., Barbosa C.P. 2009. O papel dos desreguladores endócrinos na fisiopatologia da endometriose: revisão da literatura. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde, Santo André*. 35 (2): 103-110.
- [41] Bitsch N., Dudas C., Korner W., Failing K., Biselli S., Rimkus G. and Brunn H. 2002. Estrogenic Activity of Musk Fragrances Detected by the E-Screen Assay Using Human MCF-7 Cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 43: 257–264.
- [42] Rasmussen T.H., Nielsen F., Andersen H.R., Nielsen J.B., Weihe P. and Grandjean P. 2003. Assessment of xenoestrogenic exposure by a biomarker approach: application of the E-Screen bioassay to determine estrogenic response of serum extracts. *Environmental Health: A Global Access Science Source*. 2:12.
- [43] Bila D.M. 2005. Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- [44] Verbinnen R.T. & Nunes G.S. 2010. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando Clae-dad. *Quimica Nova*. 33 (9): 1837-1842.
- [45] Birnbaum, L.S. & Fenton, S. E. 2003. Cancer and Developmental Exposure to Endocrine Disruptors. *Environmental Health Perspectives*. 111:389–394.
- [46] Arcand-Hoy L.D. & Benson W.H. 1998. Fish Reproduction: An Ecologically Relevant Indicator of Endocrine Disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17 (1):49–57.
- [47] Villalobos M., Olea N., Brotons J.A., Olea-Serrano M.F., Almodovar J.M.R. and Pedraza, V. 1995. The E-Screen Assay: A Comparison of Different MCF7 Cell Stocks. *Environmental Health Perspectives*. 103:844-850.
- [48] Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13:57-149.
- [49] Körner W., Hanf V., Schuller W., Bartsch H., Zwirner M., Hagenmaier H. 1998. Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere*. 37: 2395-2407.

- [50] Souza S., Stein V., Cattelan L., Bobrowski L., Rocha B. 2005. Utilização de sementes de alface e rúcula como ensaios biológicos para a avaliação do efeito citotóxico e aleopático de extratos aquosos de plantas medicinais. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 5: 1519-5228.
- [51] Fotakis G., Timbrell J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 160: 171-177.
- [52] BioDiscoveries:
http://www.noabbiobiodiscoveries.com/assays/invitro/cytotoxicity_studies.pdf (Último acesso: 22 de Outubro 2012)
- [52] Rosa R. 2008. Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico do diseleneto de difenila em células de mamíferos. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- [53] Cruz A. 2003. Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de Draize na avaliação de produtos cosméticos. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.
- [54] Pithon M., Santana D., Santos R., Souza R., Freitas L., Romanos M. 2011. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de bráquetes ortodônticos cerâmicos com e sem canaleta metálica. *Revista de Odontologia da Universidade da Cidade de São Paulo*. 23 (3): 223-27.
- [55] Rogero S.O., Lugão A.B., Ikeda T.I., Cruz A.S. 2003. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*. 6 (3): 317-320.
- [56] Daguano J.K., Santos C., Rogero S.O. 2007. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Revista Matéria*. 12 (1): 134-139.
- [57] Andrade M. 2007. Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero. Tese de Mestrado. Departamento de Zoologia e Antropologia. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- [58] Benincá C. 2006. Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho - Jaguaruna (SC) e Santa Marta – Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Genética.
- [59] Amaral A.M., Barbério A., Voltolini J.C., Barros L. 2007. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). *Revista Brasileira de Toxicologia*. 20 (1,2): 65-72.
- [60] Ostting O. & Johanson K. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123 (1): 291-298.

- [61] Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/saibamais/ensaios-genotoxicidade.pdf> (Último acesso: 21 de Outubro 2012).
- [62] Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175 (1): 184-191.
- [63] Valgôde F.G.S. 2008. Avaliação do dano radioinduzido, capacidade de reparo e morte celular em células humanas tumorais (T-47D e MCF-7) e não tumorais (MCF-10) de mama. Tese de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo.
- [64] Ribeiro L.R., Priolli D.G., Miranda D.D.C., Paiva D.A., Júnior J.P., Martinez C.A.R. 2007. Avaliação do Dano Oxidativo ao DNA de Células Normais e Neoplásicas da Mucosa Cólica de Doentes com Câncer Colorretal. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 27(4): 391-402.
- [65] Google maps. Disponível em <http://maps.google.pt/>. (Último acesso: 29 Setembro 2012).
- [66] Šrut M., Traven L., Štambuk A., Kralj S., Žaja R., Micovic V., Klobucar G.I. 2011. Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. *Toxicology In Vitro*. 25: 308-314.
- [67] LBL- Breast Cancer Cell Collection: Cell Lines
- [68] ATCC. Disponível em <http://www.lgcstandards-atcc.org/>. (Último acesso: 30 Setembro 2012)
- [69] Uhl M., Helma C., Knasmüller S. 1999. Single-cell gel electrophoresis assays with human derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research*. 441: 215-224.
- [70] Knasmüller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A.T. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*. 402: 185-202.
- [71] Park S.-Y., Lee S.-M., Ye S.-K., Yoon S.-H., Chung M.-H., Choi J. 2006. Benzo a pyreneinduced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicology Letters*. 167:27-33.
- [72] Repetto G., Peso A., Zurita J.L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 3: 1125-1131.
- [73] Dusinska M., Collins A. 1996. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*. 24: 405-411.
- [75] Giesy J.P., Hilscherova K., Jones P.D., Kannan K., Machala M. 2002. Cell bioassays for

- detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin*. 45: 3–16.
- [76] Varel U., Streck G., Brack W. 2008. Automated fractionation procedure for polycyclic aromatic compounds in sediment extracts on three coupled normal-phase high-performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*. 1185: 31–42.
- [77] Oluseyi T., Olayinka K., Alo B., Smith R.M. 2011. Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 5 (7): 482-493.
- [78] Cortesão C., Vale C. 1995. Metals in Sediments of the Sado Estuary, Portugal. *Marine Pollution Bulletin*. 30 (I): 34-37.
- [79] Polarity Index - [macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity index.htm](http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm).
- [80] Rigaud S., Giorgio C.D., Radakovitch O., Garnier J., Méoa M.D. 2012. Genotoxicity of sediment extracts of the Berre lagoon (France). *Chemosphere*. 88:937–944.
- [81] Thomas K., Balaam J., Barnard N., Dyer R., Jones C., Lavender J., McHugh M. 2002. Characterisation of potentially genotoxic compounds in sediments collected from United Kingdom estuaries. *Chemosphere*. 49: 247-258.
- [82] Puglisi E., Murk A.J., Berg H., Grotenhuis T. 2007. Extraction and bioanalysis of the ecotoxicologically relevant fraction of contaminants in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26 (10): 2122– 2128.
- [83] Yang F., Zhang Q., Guo H., Zhang S. 2010. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. *Toxicology in Vitro*. 24: 2003-2011.
- [84] Urte Lübcke-von Varel U., Bataineh M., Lohrmann S., Löffler I., Schulze T., Flückiger-Isler S., Neca J., Machala M., Brack W. 2012. Identification and quantitative confirmation of dinitropyrenes and 3-nitrobenzanthrone as major mutagens in contaminated sediments. *Environment International*. 44: 31– 39.
- [85] Avaliação de risco à saúde humana por metais pesados em Santo Amaro da Purificação – Bahia. Implicações para a Saúde Pública. Capítulo VIII.
- [86] Ghrefat H.A., Yusuf N., Jamarh A., Nazzal J. 2012. Fractionation and risk assessment of heavy metals in soil samples collected along Zerqa River, Jordan. *Environmental Earth Science*. 66:199–208.
- [87] Ayed-Boussema I., Rjiba K., Moussa A., Mnasri N., Bacha H. 2012. Genotoxicity associated with oxidative damage in the liver and kidney of mice exposed to dimethoate subchronic intoxication. *Environmental Science and Pollution Research International*. 19 (2): 458-66.

- [88] Giorgio C.D., Malleret L., Gueydon-Morin C., Rigaud S., De Méoa M.D. 2011. Comparison of two extraction procedures for the assessment of sediment genotoxicity: Implication of polar organic compounds. *Mutation Research*. 725: 1– 12.
- [89] Carreira, S., Costa, P.M., Martins, M., Lobo, J., Costa, M.H., Caeiro, S., 2012. Ecotoxicological heterogeneity in transitional coastal habitats assessed through the integration of biomarkers and sediment contamination profiles: a case study with a commercial clam. *Archives of Environmental Contaminants and Toxicology* (*in press*).

ANEXOS

Anexo 1 – Valores de parâmetros do ensaio do Cometa

Tabela 1A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração A2.

Amostra A2														
Controlos				Concentração (mg se/ml)										
DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200		
Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	
1ª Réplica	3,17	5,78	12,29	51,82	5,92	7,02	6,30	7,51	5,33	6,53	2,97	6,41	4,90	6,73
2ª Réplica	6,76	8,39	19,49	39,12	8,94	11,09	8,83	9,72	8,48	10,71	9,69	8,18	7,11	9,95
3ª Réplica	6,34	4,22	44,54	66,68	6,23	4,48	4,08	8,45	5,77	7,55	5,87	7,19	4,59	9,47
Média	5,42	6,13	25,44	52,54	7,03	7,53	6,41	8,56	6,53	8,26	6,18	7,26	5,53	8,72
EP	0,65	0,70	5,64	4,60	0,55	1,11	0,79	0,37	0,57	0,73	1,12	0,30	0,46	0,58

Tabela 2A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração A3.

Amostra A3														
Controlos				Concentração (mg se/ml)										
DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200		
Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	
1ª Réplica	10,47	6,25	26,89	49,28	12,71	5,86	9,66	7,59	7,00	9,19	7,00	8,94	10,47	15,91
2ª Réplica	9,33	6,92	12,02	61,54	4,58	7,61	7,15	4,30	8,32	9,08	7,47	7,46	6,82	10,49
3ª Réplica	13,08	7,97	49,16	54,47	16,11	13,45	11,05	12,71	15,30	14,30	12,16	10,38	9,43	11,73
Média	10,96	7,04	29,36	55,10	11,13	8,97	9,29	8,20	10,21	10,86	8,88	8,92	8,91	12,71
EP	0,64	0,29	6,23	2,05	1,98	1,33	0,66	1,41	1,49	0,99	0,95	0,49	0,63	0,95

Tabela 3A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração A4.

Amostra A4														
Controlos				Concentração (mg se/ml)										
DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200		
Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	
1ª Réplica	8,60	14,88	26,62	59,15	7,90	11,30	7,99	13,87	9,79	14,41	15,30	13,02	21,23	29,97
2ª Réplica	5,86	5,34	11,13	49,62	5,21	8,73	9,29	11,48	7,52	9,65	6,94	9,51	11,29	12,65
3ª Réplica	4,27	7,55	19,18	35,01	4,96	5,55	6,11	7,06	5,91	5,70	5,41	5,15	7,11	11,07
Média	6,24	9,26	18,98	47,93	6,02	8,53	7,80	10,80	7,74	9,92	9,22	9,23	13,21	17,90
EP	0,73	1,66	2,58	4,05	0,54	0,96	0,53	1,15	0,65	1,45	1,77	1,32	2,42	3,50

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Tabela 4A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração C2.

Amostra C2														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	4,42	3,54	48,04	55,20	2,77	6,14	3,75	2,45	5,04	4,45	5,94	4,77	3,23	4,74
2ª Réplica	4,09	4,28	35,17	63,55	5,48	5,80	6,76	8,50	6,02	6,72	5,28	4,96	4,64	5,68
3ª Réplica	4,27	7,55	19,18	35,01	6,31	4,27	6,68	8,23	4,45	8,05	4,97	5,81	4,88	9,02
Média	4,26	5,12	34,13	51,25	4,85	5,40	5,73	6,39	5,17	6,41	5,40	5,18	4,25	6,48
EP	0,05	0,71	4,82	4,89	0,62	0,33	0,57	1,14	0,27	0,61	0,17	0,18	0,30	0,75

Tabela 5A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração C3.

Amostra C3														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	5,30	4,18	22,98	57,67	6,73	6,90	5,37	8,77	5,73	5,60	4,78	5,43	5,10	6,21
2ª Réplica	10,47	6,25	26,89	49,28	11,64	7,48	13,64	7,20	7,65	13,65	11,54	8,76	9,47	7,72
3ª Réplica	7,33	11,14	45,68	14,96	9,58	8,58	12,13	9,39	8,33	9,05	12,37	10,32	6,52	5,50
Média	7,70	7,19	31,85	40,64	9,32	7,65	10,38	8,45	7,23	9,43	9,56	8,17	7,03	6,48
EP	0,87	1,19	4,05	7,54	0,82	0,28	1,47	0,38	0,45	1,35	1,39	0,83	0,74	0,38

Tabela 6A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração C4.

Amostra C4														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	4,11	6,95	37,64	60,46	7,60	8,13	7,95	6,09	9,12	16,01	9,51	15,77	8,83	9,94
2ª Réplica	8,60	14,88	26,62	59,15	10,91	12,60	13,39	13,88	9,89	9,39	10,12	14,50	11,65	15,66
3ª Réplica	5,49	6,23	49,80	64,18	6,98	9,66	10,12	6,15	7,86	8,62	9,41	7,29	7,21	10,67
Média	6,07	9,35	38,02	61,27	8,50	10,13	10,49	8,71	8,96	11,34	9,68	12,52	9,23	12,09
EP	0,77	1,60	3,86	0,87	0,70	0,76	0,91	1,49	0,34	1,35	0,13	1,52	0,75	1,04

Tabela 7A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração P2.

Amostra P2														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	4,22	5,01	62,13	60,66	3,82	15,08	4,19	11,08	7,07	6,45	5,12	16,01	7,11	28,06
2ª Réplica	6,70	12,03	45,20	67,59	8,40	12,63	9,11	8,22	6,52	10,76	9,12	10,07	8,48	17,70
3ª Réplica	6,34	4,22	44,54	66,68	5,94	7,66	4,82	5,62	6,24	8,63	5,63	9,96	6,89	17,52
Média	5,75	7,09	50,63	64,98	6,06	11,79	6,04	8,30	6,61	8,61	6,62	12,01	7,49	21,09
EP	0,45	1,43	3,32	1,26	0,76	1,26	0,89	0,91	0,14	0,72	0,73	1,16	0,29	2,01

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Tabela 8A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração P3.

Amostra P3														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	5,30	4,18	22,98	57,67	6,64	6,10	4,60	6,58	6,69	7,97	3,36	5,47	6,47	13,04
2ª Réplica	9,33	6,92	12,02	61,54	7,73	8,28	7,50	8,86	7,38	8,01	6,92	9,09	9,05	10,74
3ª Réplica	7,33	11,14	45,68	14,96	10,96	8,18	9,90	11,76	9,24	9,58	11,17	12,39	9,26	17,22
Média	7,32	7,41	26,89	44,73	8,44	7,52	7,33	9,07	7,77	8,52	7,15	8,98	8,26	13,67
EP	0,67	1,17	5,72	8,62	0,75	0,41	0,88	0,87	0,44	0,31	1,30	1,15	0,52	1,10

Tabela 9A – Tabela com os valores dos três replicados da média da% de ADN na cauda na fração P4.

Amostra P4														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	4,11	6,95	37,64	60,46	5,45	8,52	9,81	10,17	4,96	12,97	4,82	16,65	22,31	24,49
2ª Réplica	5,86	5,34	11,13	49,62	7,16	7,51	7,67	9,20	10,39	9,75	7,14	10,25	10,16	19,43
3ª Réplica	5,49	6,23	49,80	64,18	9,44	9,91	13,70	10,99	10,78	11,23	13,49	11,79	25,00	29,93
Média	5,15	6,17	32,86	58,09	7,35	8,65	10,40	10,12	8,71	11,31	8,48	12,90	19,16	24,62
EP	0,31	0,27	6,59	2,52	0,67	0,40	1,02	0,30	1,08	0,54	1,49	1,11	2,64	1,75

Tabela 10A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

A2.

Amostra A2														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	3,69	6,26	11,83	43,66	7,31	6,30	8,34	7,18	6,79	6,45	3,05	6,68	5,50	5,93
2ª Réplica	6,97	6,63	19,28	38,24	8,22	10,14	7,58	10,13	8,29	10,63	8,66	8,79	8,79	9,67
3ª Réplica	9,60	5,74	44,08	63,60	8,41	6,98	4,34	10,59	10,70	10,76	7,94	9,44	6,68	11,61
Média	6,97	6,26	19,28	43,66	8,22	6,98	7,58	10,13	8,29	10,63	7,94	8,79	6,68	9,67
EP	0,99	0,15	5,63	4,45	0,19	0,68	0,71	0,62	0,66	0,82	1,02	0,48	0,55	0,96

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Tabela 11A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

A3.

Amostra A3														
Controlos				Concentração (mg se/ml)										
DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200		
Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	
1ª Réplica	12,50	9,57	32,79	48,93	13,24	7,39	10,88	8,66	7,77	14,03	9,05	10,02	10,26	18,65
2ª Réplica	10,94	6,45	12,45	51,98	6,49	9,39	7,27	5,99	7,86	10,30	8,79	6,68	9,14	13,11
3ª Réplica	11,96	6,89	50,30	53,26	15,08	15,54	10,24	14,25	17,90	14,72	14,57	11,08	9,48	10,39
Média	11,80	7,64	31,85	51,39	11,60	10,77	9,46	9,63	11,18	13,01	10,80	9,26	9,63	14,05
EP	0,26	0,56	6,31	0,74	1,51	1,42	0,64	1,41	1,94	0,79	1,09	0,76	0,19	1,40

Tabela 12A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

A4.

Amostra A4														
Controlos				Concentração (mg se/ml)										
DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200		
Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	
1ª Réplica	8,70	14,72	35,12	70,96	7,64	11,38	10,83	13,40	9,22	15,83	18,50	15,06	27,49	34,62
2ª Réplica	4,48	6,12	10,80	49,35	3,50	7,61	6,75	11,91	6,50	8,24	9,35	9,94	9,90	12,57
3ª Réplica	4,70	13,17	23,94	35,75	8,87	7,98	6,42	7,57	5,57	5,13	5,94	6,02	8,84	10,56
Média	5,96	11,34	23,29	52,02	6,67	8,99	8,00	10,96	7,10	9,73	11,26	10,34	15,41	19,25
EP	0,79	1,53	4,06	5,92	0,94	0,69	0,82	1,01	0,63	1,83	2,17	1,51	3,49	4,45

Tabela 13A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

C2.

Amostra C2														
Controlos				Concentração (mg se/ml)										
DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200		
Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	
1ª Réplica	4,67	4,84	39,04	46,92	4,22	5,08	5,35	4,17	4,73	6,88	4,74	4,61	3,32	5,06
2ª Réplica	4,39	4,84	35,81	59,60	5,06	6,05	5,62	6,95	7,62	9,24	6,62	7,39	7,20	6,12
3ª Réplica	4,70	13,17	23,94	35,75	7,60	2,75	8,34	7,97	5,71	9,48	5,73	5,99	5,23	10,74
Média	4,59	7,61	32,93	47,42	5,63	4,63	6,44	6,37	6,02	8,53	5,70	5,99	5,25	7,30
EP	0,06	1,60	2,65	3,98	0,59	0,56	0,55	0,66	0,49	0,48	0,31	0,46	0,65	1,01

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Tabela 14A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

C3.

Amostra C3														
	Controles				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	6,27	5,00	25,39	48,97	13,97	7,39	5,72	8,31	7,04	7,34	5,28	7,02	5,62	7,41
2ª Réplica	12,50	9,57	32,79	48,93	13,71	7,66	15,90	8,82	9,07	17,76	13,89	12,78	10,74	11,69
3ª Réplica	9,03	19,82	48,84	18,97	10,98	7,97	11,14	8,83	8,02	7,65	14,53	10,40	6,55	5,16
Média	9,27	11,47	35,67	38,96	12,89	7,67	10,92	8,66	8,04	10,92	11,23	10,07	7,64	8,09
EP	1,04	2,53	4,00	5,77	0,55	0,10	1,70	0,10	0,34	1,98	1,72	0,96	0,91	1,11

Tabela 15A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

C4.

Amostra C4														
	Controles				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	5,43	4,74	45,45	68,36	11,01	10,94	10,19	9,16	12,44	21,17	11,68	24,69	10,86	14,99
2ª Réplica	8,70	14,72	35,12	70,96	10,37	13,49	24,03	14,25	12,93	13,17	13,62	14,93	13,16	15,69
3ª Réplica	6,72	6,22	50,89	59,26	8,82	10,05	12,33	7,84	9,06	9,78	11,30	8,36	8,32	13,51
Média	6,95	8,56	43,82	66,19	10,07	11,49	15,52	10,42	11,48	14,71	12,20	15,99	10,78	14,73
EP	0,55	1,80	2,67	2,05	0,38	0,59	2,48	1,13	0,70	1,95	0,42	2,74	0,81	0,37

Tabela 16A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

P2.

Amostra P2														
	Controles				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	4,09	5,01	49,57	56,81	4,26	18,92	4,16	13,33	8,51	7,68	4,83	23,57	7,78	28,73
2ª Réplica	6,68	10,90	46,38	57,19	8,96	11,56	9,60	9,40	7,02	11,31	10,00	11,43	9,99	16,53
3ª Réplica	9,60	5,74	44,08	63,60	7,98	15,59	7,09	7,31	10,01	11,20	8,45	12,41	9,32	21,47
Média	6,79	7,22	46,68	59,20	7,07	15,36	6,95	10,01	8,51	10,06	7,76	15,80	9,03	22,24
EP	0,92	1,07	0,92	1,27	0,83	1,23	0,91	1,02	0,50	0,69	0,88	2,25	0,38	2,05

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Tabela 17A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

P3.

Amostra P3														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	6,27	5,00	25,39	48,97	6,11	6,41	4,82	7,36	8,04	7,63	5,87	5,42	7,12	13,55
2ª Réplica	10,94	6,45	12,45	51,98	7,72	9,89	10,34	8,44	8,48	9,15	8,01	11,86	8,22	11,85
3ª Réplica	9,03	19,82	48,84	18,97	9,41	6,54	12,36	12,28	10,27	9,92	14,84	13,35	10,24	22,27
Média	8,75	10,43	28,89	39,98	7,75	7,61	9,18	9,36	8,93	8,90	9,57	10,21	8,53	15,89
EP	0,78	2,72	6,15	6,08	0,55	0,66	1,30	0,86	0,39	0,39	1,56	1,40	0,53	1,86

Tabela 18A – Tabela com os valores dos três replicados da média do comprimento da cauda na fração

P4.

Amostra P4														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	5,43	4,74	45,45	68,36	6,66	12,43	11,06	13,38	8,33	19,74	7,83	26,23	30,16	40,17
2ª Réplica	4,48	6,12	10,80	49,35	8,30	5,97	8,52	8,69	11,57	8,25	5,58	11,75	9,46	19,46
3ª Réplica	6,72	6,22	50,89	59,26	10,78	17,47	14,77	14,11	12,38	13,90	14,37	17,30	30,24	34,38
Média	5,54	5,69	35,72	58,99	8,58	11,96	11,45	12,06	10,76	13,96	9,26	18,43	23,29	31,34
EP	0,37	0,27	7,25	3,17	0,69	1,92	1,05	0,98	0,71	1,92	1,52	2,44	3,99	3,56

Tabela 19A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração A2.

Amostra A2														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	0,28	0,56	2,37	24,67	0,61	0,69	0,76	0,79	0,58	0,64	0,20	0,65	0,49	0,61
2ª Réplica	0,72	0,88	4,75	17,70	1,03	1,53	1,11	1,23	0,97	1,35	1,12	1,18	0,92	1,23
3ª Réplica	1,19	0,46	24,82	45,50	0,89	0,87	0,42	1,18	0,94	1,02	0,89	0,98	0,58	1,68
Média	0,73	0,63	10,65	29,29	0,84	1,03	0,76	1,07	0,83	1,01	0,74	0,93	0,66	1,17
EP	0,15	0,07	4,11	4,82	0,07	0,15	0,11	0,08	0,07	0,12	0,16	0,09	0,08	0,18

Tabela 20A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração A3.

Amostra A3														
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	1,65	0,79	12,36	25,64	2,02	0,62	1,38	0,84	0,79	1,81	0,81	1,23	1,45	3,56
2ª Réplica	1,37	0,67	2,13	33,64	0,50	1,01	0,80	0,40	0,93	1,23	0,96	0,75	0,94	1,68
3ª Réplica	2,04	0,79	29,28	32,34	2,97	2,76	1,47	2,38	3,52	2,76	3,17	1,76	1,27	1,79
Média	1,69	0,75	14,59	30,54	1,83	1,47	1,22	1,21	1,75	1,93	1,65	1,25	1,22	2,34
EP	0,11	0,02	4,57	1,43	0,42	0,38	0,12	0,35	0,51	0,26	0,44	0,17	0,09	0,35

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Tabela 21A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração A4.

	Amostra A4													
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	1,14	2,84	13,64	47,08	1,08	1,76	1,15	2,22	1,34	2,77	3,54	2,37	6,85	12,49
2ª Réplica	0,55	0,50	1,90	27,50	0,43	0,95	1,03	1,65	0,91	1,28	1,37	1,73	1,78	2,37
3ª Réplica	0,41	1,60	7,01	15,02	0,80	0,65	0,75	0,80	0,50	0,52	0,60	0,65	0,90	1,80
Média	0,70	1,65	7,52	29,87	0,77	1,12	0,98	1,56	0,92	1,53	1,84	1,58	3,18	5,55
EP	0,13	0,39	1,96	5,39	0,11	0,19	0,07	0,24	0,14	0,38	0,51	0,29	1,07	2,00

Tabela 22A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração C2.

	Amostra C2													
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	0,38	0,28	20,07	28,67	0,23	0,51	0,37	0,37	0,41	0,62	0,64	0,43	0,26	0,42
2ª Réplica	0,40	0,39	15,30	39,47	0,58	0,59	0,59	1,09	0,68	0,89	0,50	0,66	0,52	0,58
3ª Réplica	0,41	1,60	7,01	15,02	0,82	0,26	0,87	1,00	0,45	1,04	0,57	0,58	0,51	1,40
Média	0,40	0,76	14,13	27,72	0,54	0,45	0,61	0,82	0,51	0,85	0,57	0,56	0,43	0,80
EP	0,00	0,24	2,20	4,09	0,10	0,06	0,08	0,13	0,05	0,07	0,02	0,04	0,05	0,18

Tabela 23A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração C3.

	Amostra C3													
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	0,60	0,35	8,21	29,83	1,25	0,66	0,51	1,02	0,50	0,55	0,43	0,53	0,47	0,64
2ª Réplica	1,65	0,79	12,36	25,64	1,78	0,78	2,51	0,86	0,89	2,92	1,97	1,32	1,25	1,32
3ª Réplica	0,90	2,71	27,81	4,99	1,70	1,04	1,73	1,13	1,15	1,13	2,40	1,34	0,77	0,55
Média	1,05	1,28	16,13	20,15	1,58	0,83	1,58	1,00	0,85	1,53	1,60	1,06	0,83	0,84
EP	0,18	0,42	3,44	4,43	0,10	0,06	0,34	0,05	0,11	0,41	0,35	0,15	0,13	0,14

Tabela 24A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração C4.

	Amostra C4													
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	0,49	0,61	21,45	45,24	1,21	1,25	1,03	0,89	1,86	5,10	2,17	5,11	1,47	1,85
2ª Réplica	1,14	2,84	13,64	47,08	1,48	2,31	4,65	2,33	1,57	1,75	1,99	2,58	1,85	3,13
3ª Réplica	0,57	0,68	28,03	39,58	0,81	1,40	1,64	0,76	1,03	1,13	1,37	0,91	0,92	1,83
Média	0,73	1,37	21,04	43,97	1,17	1,65	2,44	1,32	1,49	2,66	1,84	2,87	1,42	2,27
EP	0,12	0,42	2,40	1,30	0,11	0,19	0,65	0,29	0,14	0,71	0,14	0,70	0,16	0,25

Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina

Tabela 25A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração P2.

	Amostra P2													
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	0,37	0,45	31,95	36,22	0,38	4,83	0,41	2,43	1,09	0,67	0,51	6,81	0,84	9,91
2ª Réplica	0,62	1,58	22,27	40,01	1,09	1,79	1,26	1,13	0,74	1,58	1,28	1,96	1,31	3,65
3ª Réplica	1,19	0,46	24,82	45,50	0,91	1,68	0,74	0,81	0,82	1,25	1,04	1,70	1,01	4,58
Média	0,72	0,83	26,35	40,57	0,79	2,77	0,80	1,46	0,89	1,17	0,94	3,49	1,05	6,05
EP	0,14	0,22	1,67	1,56	0,12	0,59	0,14	0,29	0,06	0,15	0,13	0,96	0,08	1,12

Tabela 26A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração P3.

	Amostra P3													
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	0,60	0,35	8,21	29,83	0,66	0,56	0,37	0,69	0,71	0,81	0,44	0,47	0,59	2,13
2ª Réplica	1,37	0,67	2,13	33,64	0,85	1,03	1,09	1,08	0,90	0,95	0,89	1,32	1,10	1,57
3ª Réplica	0,90	2,71	27,81	4,99	1,64	0,91	1,58	1,79	1,39	1,32	2,13	2,11	1,41	4,54
Média	0,96	1,24	12,71	22,82	1,05	0,83	1,01	1,19	1,00	1,03	1,15	1,30	1,04	2,74
EP	0,13	0,43	4,47	5,19	0,17	0,08	0,20	0,19	0,12	0,09	0,29	0,27	0,14	0,53

Tabela 27A – Tabela com os valores dos três replicados da média do momento da cauda na fração P4.

	Amostra P4													
	Controlos				Concentração (mg se/ml)									
	DMSO		H ₂ O ₂		10		25		50		100		200	
	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima	Sem Enzima	Com Enzima
1ª Réplica	0,49	0,61	21,45	45,24	0,70	1,56	1,41	1,97	0,83	3,38	0,63	5,75	10,48	11,77
2ª Réplica	0,55	0,50	1,90	27,50	0,85	0,73	0,90	1,06	1,54	1,05	0,78	1,55	1,42	5,10
3ª Réplica	0,57	0,68	28,03	39,58	1,43	2,83	2,65	2,27	1,69	1,90	2,32	2,62	8,54	12,00
Média	0,54	0,59	17,13	37,44	0,99	1,71	1,65	1,77	1,36	2,11	1,24	3,31	6,81	9,62
EP	0,01	0,03	4,53	3,02	0,13	0,35	0,30	0,21	0,15	0,39	0,31	0,73	1,59	1,31

Anexo 2 – Intervalos de valores dos contaminantes das amostras C, A e P no Estuário do Sado

Contaminantes				Amostra			SQGs		
				C	A	P	TEL	PEL	
Elemento (ug.g-1)	Não metálico	As	<5	20<V<30	10<V<20	7,24	41,6		
		Se	<5	<5	<5	NA	NA		
	Metálico	Cd	<5	<5	<5	0,68	4,21		
		Cr	<5	70<V<80	70<V<80	52,3	160		
		Cu	<5	90<V<100	>100	18,7	108		
		Ni	<5	20<V<30	10<V<20	15,9	42,8		
		Pb	<5	30<V<40	50<V<60	30,2	112		
		Zn	10<V<20	300<V<400	300<V<400	124	271		
		Organico (ng.g-1)	HAP	3-ring	Acenaftileno	< d.l.	<5	5<V<10	5,87
	Acenafteno				<5	<5	5<V<10	6,71	88,9
	Fluoreno				<5	<5	5<V<10	21,2	144
	Fenantreno				10<V<20	30<V<40	60<V<70	86,7	544
	Antracina				<5	<5	5<V<10	46,9	245
4-ring	Fluoranteno		<5	30<V<40	200<V<300	113	1494		
	Pireno		10<V<20	30<V<40	100<V<200	153	1398		
	Benz[a]antraceno		<5	10<V<20	70<V<80	74,8	693		
	Criseno		< d.l.	5<V<10	40<V<50	108	846		
5-ring	Benzo[b]fluoranteno		<5	10<V<20	70<V<80	NA	NA		
	Benzo[k]fluoranteno		<5	5<V<10	40<V<50	NA	NA		
	Benzo[e]pireno		<5	10<V<20	70<V<80	NA	NA		
	Benzo[a]pireno		<5	10<V<20	80<V<90	88,8	763		
6-ring	Dibenzo[a,h]antraceno		< d.l.	10<V<20	10<V<20	6,22	135		
	Indeno[1,2,3-cd]pireno		< d.l.	10<V<20	100<V<200	NA	NA		
	Benzo[ghi]perileno		< d.l.	10<V<20	70<V<80	NA	NA		
tHAP			20<V<30	>200	>1000	1684	16770		
Pesticidas organoclorados	tDDT		<5	<5	<5	3,89	51,7		
	BHC		<5	<5	<5	0,32	0,99		
tPCB			<5	<5	5<V<10	21,6	189		

Os valores dos contaminantes foram obtidos através da técnica de extração *Inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS) para os contaminantes metálicos. Para os contaminantes orgânicos, foi utilizada a técnica *Gas chromatography-mass system* (GC-MS). TEL – *Threshold effect level*; PEL – *Probable effect level*; SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient*. + Concentração acima do TEL. ++ Concentração acima do PEL. – Concentração abaixo do TEL e PEL. < d.l. Concentração abaixo do limite de deteção. V – Valor da concentração.

Nota: Os resultados desta tabela foram gentilmente cedidos por Carreira *et al.*, (*in press*) [89].