

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



**Caracterização do potencial genotóxico de sedimentos
estuarinos em sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo***

Joana Soares Sacadura

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



**Caracterização do potencial genotóxico de sedimentos
estuarinos em sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo***

Joana Soares Sacadura

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Doutora Maria João Silva (Orientadora Externa)

Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Professora Doutora Deodália M. Dias (Orientadora Interna)

Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2014

RESUMO

O estuário do Sado (Oeste de Portugal) está sujeito a várias fontes de poluição associadas a centros urbanos, indústrias pesadas, actividades mineiras e agricultura. Este estuário permanece um local importante de actividade pesqueira para consumo próprio e para mercados locais e externos, assim como para actividades recreativas e turísticas. No entanto, estudos anteriores revelaram vários contaminantes presentes nos sedimentos aquáticos, maioritariamente metais, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Estes compostos podem ser absorvidos e acumulados nas partes comestíveis das espécies estuarinas e nos produtos agrícolas locais entrando, deste modo, na cadeia alimentar humana, colocando em risco a saúde humana. Neste contexto, o presente estudo tem como objectivo analisar os efeitos genotóxicos, *in vitro* e *in vivo*, de extractos de sedimentos do estuário do Sado. Para esse fim, os sedimentos foram recolhidos de quatro locais de pesca (P, C, A e E) do estuário e os contaminantes orgânicos e inorgânicos totais foram extraídos com uma mistura de metanol:diclorometano. Células HepG2 foram expostas aos extractos e a um agente antimutagénico, para a análise da genotoxicidade utilizando o ensaio do cometa, a fim de analisar a possível reversão de danos oxidativos induzidos pelos contaminantes. Adicionalmente, recorreu-se a um modelo de ratinhos transgénicos baseados no plasmídeo *lacZ* expostos por via oral a duas doses de extracto P para testes de genotoxicidade *in vivo*. Neste modelo foi realizado o ensaio do micronúcleo, do cometa e de mutações em vários órgãos de ratinho. Nos resultados *in vitro* não se verificou a reversão dos danos oxidativos induzidos pelos extractos de sedimentos por parte da quercetina, nas condições testadas. *In vivo*, verificou-se a indução de micronúcleos, embora o ensaio do cometa não revelasse resultados positivos. Aparentemente, não se verificou mutagenicidade *in vivo*, embora sejam necessários mais estudos para concluir a análise de mutações. Globalmente, os resultados obtidos neste estudo reflectem o potencial efeito adverso para a saúde humana associado aos contaminantes encontrados nos sedimentos do estuário, contribuindo para a avaliação de risco.

Palavras-chave: extracto de sedimento; Estuário do Sado; genotoxicidade; *stress* oxidativo; ratinho transgénico

ABSTRACT

The Sado Estuary (West Portugal) is subject to several sources of pollution associated with an urban center, heavy-industries, mining activities and agriculture. It remains a site for fishing activity for personal consumption and for local and external market, and also for recreational and touristic activities. Previous studies revealed several contaminants in the aquatic sediments, mostly metals, pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. These compounds can be absorbed and accumulated in edible parts of estuarine species and in local agriculture products, thus entering the human food chain and posing a risk to human health. In this context, this study aims at analyzing the genotoxic effects, *in vitro* and *in vivo*, of sediment extracts from the Sado Estuary. For this end, sediments were collected from four fishing sites (P, C, A and E) of the Estuary and total organic and inorganic contaminants were extracted with a mixture of methanol:dichloromethane. HepG2 cells were exposed to the extracts and an antimutagenic agent, for genotoxicity analysis using the comet assay, in order to see whether there was a reversion of the contaminant-induced oxidative damage. Furthermore, a *lacZ* plasmid-based model of transgenic mice was orally exposed to two doses of extract P for *in vivo* genotoxicity testing. For the *in vivo* analysis, the micronucleus assay, comet assay and mutant frequency analysis were performed in several mouse tissues. *In vitro* results failed to elicit a potential reversion of the contaminant-induced oxidative damage by quercetin, in the tested conditions. *In vivo*, there was a positive induction of micronuclei, however there was no positive results in comet assay. Overall, the results obtained in the present study reflect the potential hazard effect to human health associated with the contamination of estuarine sediments, contributing to risk assessment.

Keywords: Sediment extract; Sado Estuary; genotoxicity; oxidative stress; transgenic mouse

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora Maria João Silva por todo o apoio e disponibilidade demonstrada, por tudo o que me ensinou, pela paciência e pela oportunidade que me deu de colaborar num projecto pelo qual tinha grande interesse e claro, por me ter dado esta oportunidade fantástica de aprender tantas técnicas diferentes.

Agradeço também à Professora Doutora Deodália Dias por todo o seu apoio e disponibilidade demonstrada, e por defender os meus interesses durante a elaboração desta tese.

Gostaria de agradecer também ao Director do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, à Coordenadora do Departamento de Genética Humana, Doutora Glória Isidro e ao Coordenador da Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Doutor João Lavinha pela oportunidade de desenvolver o meu trabalho neste Instituto.

Em segundo lugar gostaria de agradecer em especial a algumas pessoas que me apoiaram ao longo deste meu percurso e sem as quais seria impossível realizar todo este trabalho. Ao Mestre Miguel Pinto a presença incondicional, em todos os momentos para me apoiar, ensinar, esclarecer, aconselhar e ajudar desde as primeiras técnicas até à escrita, pelo apoio moral constante e pela confiança que depositou em mim, pela paciência e claro, pela amizade sem a qual esta jornada não teria sido a mesma coisa. À Doutora Henriqueta Louro por toda a ajuda e ensinamentos que me prestou com os ratinhos e não só, tanto nas técnicas como na interpretação de resultados e até na escrita, pela disponibilidade e pela paciência que teve para me esclarecer as dúvidas. À Mestre Ana Maria Tavares pela ajuda e ensinamentos que me prestou em algumas das técnicas, pelo apoio moral sempre que precisei e pela amizade. A todos os outros colegas dentro e fora do projecto que me ajudaram a realizar este trabalho.

Por fim gostaria de agradecer: à minha família, aos meus pais e irmão por acreditarem em mim e por toda a ajuda e apoio, sem os quais nada disto se realizaria; ao meu namorado e aos meus amigos por serem uma fonte de inspiração e bom humor, pela paciência que têm para me aturar, por estarem lá, nos bons e maus momentos, e por todo o apoio constante que me dão.

Um muito obrigado a todos.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
AGRADECIMENTOS.....	v
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas	xi
INTRODUÇÃO.....	1
1. Poluição aquática - Contaminação de sedimentos estuarinos.....	1
2. Área de estudo - O estuário do Sado	2
2.1. Descrição da área e pressões antropogénicas associadas.....	2
2.2. Contaminação no estuário do Sado	3
2.2.1. Efeitos biológicos dos principais contaminantes estuarinos	4
2.2.2. Efeitos adversos observados em organismos aquáticos.....	8
2.3. O Projecto HERA.....	9
2.3.1. Componente epidemiológica	9
2.3.2. Caracterização da contaminação do sedimento estuarino.....	10
2.3.3. Efeitos dos contaminantes em espécies estuarinas.....	12
2.3.4. Efeitos citotóxicos e genotóxicos em células humanas	13
2.3.5. Estudo dos metais pesados em amostras de vegetais, água e solo.....	13
3. Caracterização de efeitos genotóxicos	14
3.1. Estudos de genotoxicidade <i>in vitro</i> de extractos de sedimentos	15
3.1.1. A linha celular HepG2	15
3.1.2. Determinação da citotoxicidade: O Ensaio do Vermelho Neutro	16
3.1.3. Análise da genotoxicidade: O Ensaio do Cometa	18
3.1.4. Análise do <i>Stress</i> Oxidativo	19
3.2. Estudos de Genotoxicidade <i>in vivo</i>	22
3.2.1. Modelo de ratinho transgénico com o plasmídeo <i>LacZ</i>	23
3.2.2 Mutagénese num modelo de ratinhos transgénico	25
3.2.3 Ensaio do Micronúcleo <i>in vivo</i> em eritrócitos	28
OBJECTIVOS	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33

1. Reagentes.....	33
2. Amostragem e análise química dos sedimentos	33
3. Preparação dos extractos de sedimento para ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	34
4. Ensaio <i>in vitro</i>	35
4.1. Cultura de células HepG2	35
4.2. Ensaio de Citotoxicidade: Ensaio do Vermelho Neutro	35
4.3. Ensaio de Genotoxicidade: Ensaio do Cometa.....	36
4.3.1. Tratamento <i>in vitro</i> da linha celular HepG2 e alterações ao procedimento geral do ensaio do cometa	36
4.3.2. Ensaio do Cometa - Procedimento geral.....	37
5. Ensaio <i>in vivo</i>	38
5.1. Ratinhos transgénicos: Manutenção, Tratamento e Sacrifício	38
5.2. Ensaio do Cometa em Sangue Periférico de Ratinhos	40
5.3. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico de Ratinho	40
5.4. Ensaio do Cometa em Órgão de Ratinhos.....	41
5.5. Extração de DNA genómico de tecidos	41
5.6. Recuperação do transgene <i>LacZ</i> e Determinação da Frequência de Mutantes	43
6. Análise Estatística	45
RESULTADOS.....	47
1. Citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i> , em células HepG2	47
1.1. Determinação da concentração de quercetina mais efectiva (exposição longa).....	47
1.2. Co-exposição a quercetina e aos extractos de sedimentos	48
1.3. Determinação da concentração de quercetina para uma exposição curta.....	51
2. Ensaio de genotoxicidade <i>in vivo</i>	53
2.1. Variação do peso e consumo de água ao longo do período de exposição.....	53
2.2. Genotoxicidade	54
2.2.1. Ensaio do Cometa em sangue periférico.....	54
2.2.2. Ensaio do Micronúcleo em sangue periférico de ratinho	55
2.2.3. Ensaio do cometa em órgãos de ratinho.....	57
3. Determinação da Frequência de Mutantes em tecidos de órgãos de ratinhos	59
3.1. Extração de DNA genómico de tecidos	59

3.2. Análise de mutações no transgene <i>lacZ</i>	60
DISCUSSÃO.....	65
1. Ensaio <i>in vitro</i> em células HepG2, e potencial antioxidante da quercetina	65
2. Ensaio <i>in vivo</i>	71
CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXOS.....	97
ANEXO A – Resultados da percentagem de DNA na cauda obtidos em estudos recentes	97
ANEXO B – Dados experimentais dos ensaios <i>in vivo</i> efectuados neste trabalho.	98
ANEXO C – Dados experimentais de ensaios <i>in vivo</i> anteriores.....	103

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação de agentes genotóxicos pela IARC.....	4
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos e níveis de contaminação das amostras de sedimentos utilizadas neste trabalho.....	11
Tabela 3 – Média da percentagem de reticulócitos por grupo de tratamento a diferentes tempos de exposição.....	57
Tabela 4 – Quantificação do DNA genómico extraído dos órgãos dos ratinhos (Fígado e Baço).....	60
Tabela 5 – Resultados do tempo de Electroporação: tempo que levou a corrente a passar pelas células (1ª experiência)	61
Tabela 6 – Frequência de mutantes (FM) no gene <i>lacZ</i> do fígado de ratinhos transgénicos C57BL/6 do grupo controlo (R1 e R2) e de fígado de ratinhos de uma experiência anteriormente realizada (N2)	62
Tabela 7 – Resultados do tempo de electroporação: tempo que levou a corrente a passar pelas células (2ª experiência)	63

Lista de Figuras

Figura 1 – Mapa da área de estudo, o estuário do Sado, com indicação dos diferentes locais de amostragem (C, P, E e A) utilizados neste trabalho	3
Figura 2 – Principais mecanismos de carcinogenicidade de metais	6
Figura 3 – Foto da linha celular HepG2, observadas ao microscópio óptico de inversão numa ampliação de 100x	16
Figura 4 – Ensaio do Vermelho Neutro	17
Figura 5 – Fotografias de nucleóides capturadas pelo <i>software</i> Comet Imager 2.2 (MetaSystems).....	19

Figura 6 – Esquema das potenciais vias de intervenção de um antimutagénico nos processos de mutagénese em humanos	20
Figura 7 – Estrutura molecular da quercetina.....	21
Figura 8 – Esquema dos efeitos benéficos e tóxicos da quercetina <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	22
Figura 9 – Plasmídeo pUR288 usado para gerar os ratinhos transgénicos C57BL/6	24
Figura 10 – Ensaio de frequência de mutação em ratinhos transgénicos com o plasmídeo <i>LacZ</i> ; Esquema da recuperação do transgene <i>lacZ</i> do modelo de ratinho baseado em plasmídeo para análise de mutações.....	26
Figura 11 – Metabolismo da lactose em <i>E. coli</i>	27
Figura 12 – Mecanismo de formação de micronúcleo em eritrócitos policromatófilos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCEs)	29
Figura 13 – Foto de esfregaço de sangue periférico de ratinho corado com laranja de acridina, para o ensaio do micronúcleo observado num microscópio de fluorescência numa ampliação de 1000x	30
Figura 14 – Esquema dos passos principais do ensaio do vermelho neutro em células	36
Figura 15 – Esquema dos passos principais do ensaio do Cometa	38
Figura 16 – Ilustração da imobilização de um ratinho num cilindro imobilizador.....	39
Figura 17 – Esquema representativo do ensaio de micronúcleo em sangue periférico de ratinho.....	41
Figura 18 – Distinção entre os vários tipos de reticulócitos de ratinho de acordo com a quantidade de RNA no citoplasma	41
Figura 19 – Esquema da condição de selecção das colónias de bactérias <i>E. coli</i> para o ensaio de frequência de mutação em ratinhos transgénicos com o plasmídeo <i>LacZ</i>	45
Figura 20 – Resultados do ensaio do vermelho neutro em células HepG2 após uma exposição de 49 h a quercetina em concentrações diferentes (0,1 a 100 μ M)	47
Figura 21 – Resultados do ensaio do cometa em células HepG2 após uma exposição a concentrações diferentes de quercetina, durante 49h	48
Figura 22 – Resultados do ensaio do cometa em células HepG2 após exposição a quercetina durante 1 h (10 μ M) seguida de co-exposição a quercetina (10 μ M) e diferentes concentrações de amostras de extractos dos vários sedimentos do estuário do Sado durante 48h	49
Figura 23 – Resultados do ensaio do cometa em células HepG2 após uma exposição a concentrações diferentes de quercetina, durante 49h (2ª experiência)	51
Figura 24 – Resultados do ensaio do vermelho neutro em células HepG2 após uma exposição de 1 h de quercetina em concentrações diferentes; e a 30 min de H ₂ O ₂ (100 μ M) seguida de uma exposição de 1 h de quercetina as mesmas concentrações.....	52
Figura 25 – Resultados do ensaio do cometa em HepG2 após exposição a 30 min de H ₂ O ₂ (100 μ M) seguida de 1 h de quercetina a diferentes concentrações	52

Figura 26 – Consumo médio diário de água de um ratinho por grupo de tratamento, ao longo do tempo de exposição (28 dias).....	53
Figura 27 – Peso corporal médio de um ratinho por grupo de tratamento, ao longo do tempo de exposição (28 dias).....	54
Figura 28 – Resultados do ensaio do cometa em sangue periférico de ratinho, a diferentes intervalos de exposição, para o grupo controlo e os 2 grupos expostos ao extracto de sedimento P do estuário do Sado	55
Figura 29 – Resultados do ensaio do Micronúcleo em sangue periférico de ratinho, para grupos de ratinhos expostos a diferentes concentrações do extracto de sedimento P do estuário do Sado, em diferentes tempos de exposição	56
Figura 30 – Resultados do ensaio do cometa em órgãos de ratinho, após exposição de 28 dias a diferentes concentrações do extracto de sedimento P do estuário do Sado	58
Figura 31 – Controlo da extracção de DNA genómico	60
Figura 32 – Controlo da hidrólise do DNA por electroforese em gel de agarose a 1 % (1 ^o experiência).....	61
Figura 33 – Controlo da hidrólise do DNA por electroforese em gel de agarose a 1 % (2 ^o experiência).....	62

Lista de Abreviaturas

As – Arsénio
ATCC – <i>American Type Culture Collection</i>
ATP – Adenosina trifosfato
B[a]P – Benzo[a]pireno
bp – Pares de base
BrEt – Brometo de etídio
Cd – Cádmió
Cr – Crómio
Cu – Cobre
DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DMEM/F-12 - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico, em inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP – Desvio Padrão
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA – <i>European Food Safety Authority</i>
ENA – Anomalias nuclear em eritrócitos
ENDO III – Endonuclease III
ENU – Etil-nitrosureia
EP – Erro padrão
FF – Fração fina

FM – Frequência de mutações
FPG – Formamido-pirimidina-DNA glicosilase
GC-MS – Cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrômetros de massa, em inglês
Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GSH – Glutathione
GST – glutathione-S-transferase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio
HAP – Hidrocarboneto aromático policíclico
HEPES – Ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-2-etanossulfónico
HepG2 – Linha celular de carcinoma hepatocelular humano
IARC – *International Agency for Research on Cancer*
ICP-MS – Espectrômetro de massa acoplado a plasma indutivo, em inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*
IPTG – isopropil-1-tiol-β-galactósido
MO – Matéria orgânica
MOT – Matéria orgânica total
NCE - Eritrócito normocromático
Ni – Níquel
Pb – Chumbo
PBS – Tampão fosfato salino, em inglês *Phosphate buffered saline*
pc – peso corporal
PCB – Bifenilo Policlorado, em inglês *polychlorinated biphenils*
PCE - Eritrócito policromatófilo
PEL – *Probable effect level*
P-gal – fenil-β-D-galactósido
ROS – Espécies reactivas de oxigénio
SDS – Dodecil sulfato de sódio, em inglês *sodium dodecyl sulfate*
Se – Selénio
SEQ – Sedimento equivalente
SFBi – soro fetal bovino inativado pelo calor
SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient*.
TE – Tris-EDTA
TEL – *Threshold effect level*
UFC – Unidades formadoras de colónias
VN – Vermelho neutro
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
Zn – Zinco

INTRODUÇÃO

1. Poluição aquática - Contaminação de sedimentos estuarinos

Uma das consequências da exploração antropogénica do meio ambiente, particularmente da industrialização, é a produção de resíduos e efluentes tóxicos indesejáveis. A descarga de contaminantes através de águas residuais de fontes industriais, domésticas e agrícolas directamente nos lagos, rios e regiões costeiras, constituem a maior fonte de poluição aquática (Chen e White, 2004). Vários estudos têm demonstrado que muitos dos resíduos e efluentes industriais, particularmente da metalurgia, refinarias de petróleo, de papel e indústrias químicas, contém agentes potencialmente genotóxicos, mutagénicos e/ou carcinogénicos (Ohe *et al.*, 2004; Chen e White, 2004). Este potencial para causar efeitos adversos por parte dos compostos orgânicos e inorgânicos de vários tipos de efluentes industriais encontra-se predominantemente associado ao material particulado. Isto é, o movimento após a emissão da descarga e a compartimentação dos compostos hidrofóbicos, incluindo muitas substâncias genotóxicas, vai resultar na adsorção às partículas em suspensão que, no final, se vão incorporar nos sedimentos do fundo aquático. Assim, estes contaminantes ambientais, de origem diversa, podem ser continuamente reintroduzido na coluna de água através da ressuspensão e transferência trófica. Consequentemente, os sedimentos poderão tornar-se um reservatório de agentes potencialmente perigosos, e a sua sedimentação vai contribuir para a exposição, directa ou indirecta, dos organismos bentónicos, ou das populações humanas locais, assim como para a sua bioacumulação no meio ambiente (Chen e White, 2004; Ohe *et al.*, 2004; Chapman e Wang, 2001).

Os estuários, em particular, estão sujeitos a uma variedade de pressões antropogénicas do tipo urbanas ou industriais localizadas ao longo das margens. Mais importante, o facto destes ambientes serem semi-fechados e terem uma capacidade de auto-renovação limitada torna a sua contaminação mais problemática. A contaminação dos sedimentos estuarinos é assim reconhecida como uma importante fonte de pressão na saúde do ecossistema e, por esta razão, a avaliação adequada da contaminação dos sedimentos num estuário e o seu significado biológico e ecológico é crucial (Caeiro *et al.*, 2005). No entanto, a análise do impacto da contaminação dos

sedimentos, em organismos estuarinos ou populações humanas localmente expostas, é um desafio devido à complexidade geoquímica dos sedimentos, às pressões antropogénicas impostas e à natureza físico-química particular dos corpos de água em transição. A deposição e libertação de contaminantes nos sedimentos estuarinos é uma equação complexa que depende de múltiplos factores abióticos, tais como a carga de matéria orgânica (MO) dos sedimentos, a dimensão dos grãos de areia, ou a agitação ou hidrodinamismo do local. A combinação de todos estes parâmetros, com a provável presença de múltiplas classes de contaminantes, contribui para a dificuldade na avaliação do potencial impacto de sedimentos contaminados nos organismos expostos (Costa *et al.*, 2012).

2. Área de estudo - O estuário do Sado

2.1. Descrição da área e pressões antropogénicas associadas

O estuário do Sado (Figura 1), localizado na costa sudoeste de Portugal, é o segundo maior do país, com uma área de, aproximadamente, 24 000 ha (180 km²). Sendo um estuário biogeograficamente muito heterogéneo, é de grande importância tanto ecológica como para actividades humanas. No entanto, encontra-se sujeito a uma grande variedade de pressões antropogénicas que entram em conflito com o facto de parte do estuário ser classificado como reserva natural (Costa *et al.*, 2008). A margem norte inclui a cidade de Setúbal, áreas urbanas adjacentes, aterros para resíduos perigosos e um parque de indústria pesada, como por exemplo fábricas de produtos químicos (pesticidas e fertilizantes), de papel, uma central termoelétrica, estaleiro de navios e instalações de exploração de minério, contribuindo todas como potenciais fontes de poluição (Carreira *et al.*, 2013). Para além disso, na margem sul encontra-se a península de Tróia, mais afastada das grandes fontes de poluição, reconhecida como uma área importante para o turismo e lazer. Ainda nesta margem do estuário existem áreas agrícolas, principalmente zonas de arrozais, salinas tradicionais e aquaculturas cada vez mais intensivas. O próprio rio Sado cruza-se com regiões com minas de pirite assim como áreas de agricultura mais a montante, o que permite o transporte de substâncias potencialmente tóxicas que poderão, por sua vez, ficar retidas nos sedimentos aquáticos. Algumas destas actividades incluem a descarga de contaminantes como metais, fertilizantes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

(HAPs) ou mesmo pesticidas nas águas do estuário que podem alterar a qualidade da água e do sedimento e gerar efeitos adversos nas comunidades bióticas (Caeiro *et al.*, 2005; Caeiro *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012).

No estuário existe uma intensa actividade piscatória, realizada pelas populações locais e as espécies capturadas como, por exemplo, o berbigão (*Cerastoderma edule*), a amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*), o choco (*Sepia officianalis*), o caranguejo (*Carcinus maenas*) e o linguado (*Solea senegalensis*), não só são consumidas por estas comunidades mas também poderão ser distribuídas nacionalmente (Carreira *et al.*, 2013, Rodrigo *et al.*, 2013, Gonçalves *et al.*, 2013, Costa *et al.*, 2012). Adicionalmente, nas zonas a montante do estuário, as práticas agrícolas, em particular a colheita de tomate e de arroz, utilizam a água do estuário e constituem o principal uso do solo (Carreira, 2011). Assim, a potencial bioacumulação destes contaminantes nas espécies bentónicas ou nos produtos agrícolas, podem constituir uma via de exposição indirecta, através da cadeia alimentar, para as populações locais.

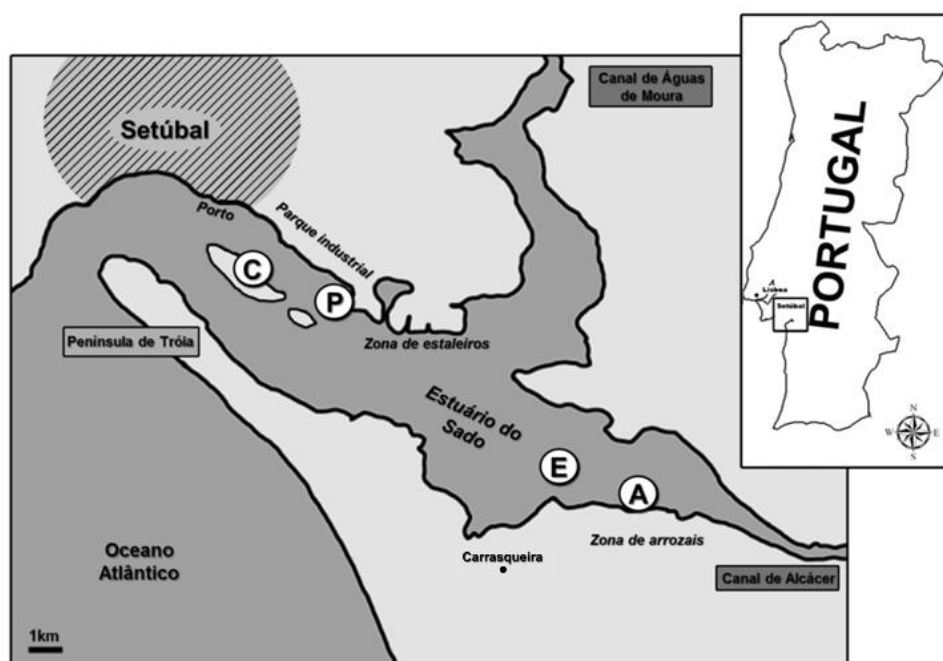


Figura 1 – Mapa da área de estudo, o estuário do Sado, com indicação dos diferentes locais de amostragem (C, P, E e A) utilizados neste trabalho [Adaptado de Pinto *et al.*, (2014a)].

2.2. Contaminação no estuário do Sado

Estudos recentes na área confirmaram a ocorrência de diversos contaminantes nos sedimentos do estuário, tanto na área norte (industrial/urbana) como na sul

(rural), incluindo metais, pesticidas, bifenilos policlorados (PCBs) e HAPs, consideradas substâncias de interesse primário (Caeiro *et al.*, 2005; Caeiro *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012; Carreira *et al.*, 2013). Uma análise a sedimentos de 153 estações do estuário do Sado, no que diz respeito ao seu conteúdo em metais e metalóides, fracção fina, MO e o potencial redox, revelou a existência de diversas áreas contaminadas. De facto, segundo um índice de risco ecológico (SQG-Q; *Sediment quality guideline quotient*), 3 % das estações encontravam-se altamente contaminadas, possuindo um alto potencial para induzir efeitos biológicos adversos, enquanto 47 % mostraram contaminação moderada (Caeiro *et al.*, 2005). Outro estudo mais recente, integrando diversos parâmetros químicos e biológicos identificou também algumas áreas de alto risco, por conterem contaminantes capazes de causarem efeitos adversos na biota (Caeiro *et al.*, 2009).

2.2.1. Efeitos biológicos dos principais contaminantes estuarinos

Tal como referido anteriormente, a maioria dos contaminantes existentes na água e nos sedimentos são compostos potencialmente genotóxicos, mutagénicos e/ou carcinogénicos que poderão causar efeitos adversos tanto na biota indígena como nas populações humanas localmente expostas. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) efectua uma acção coordenada de avaliação dos resultados de testes de genotoxicidade e classifica os vários agentes em diferentes grupos, de acordo com a sua capacidade de induzir o aparecimento de cancro no homem, no sentido de uniformizar os critérios dos testes de genotoxicidade (Tabela 1). Vários poluentes encontrados no estuário do Sado, foram classificados pela IARC como carcinogénicos, provavelmente carcinogénicos ou possíveis carcinogénicos para o homem, como é o caso de alguns HAPs, metais e compostos organoclorados incluindo pesticidas organoclorados (IARC, 1991; 2012).

Tabela 1 – Classificação de agentes genotóxicos pela IARC

Grupo	Descrição do Agente
1	Cancerígeno para o Homem
2A	Provavelmente cancerígeno para Homem
2B	Possivelmente cancerígeno para o Homem
3	Não classificável em relação ao Homem
4	Provavelmente não cancerígeno para o Homem

(Adaptado de IARC).

Os diferentes contaminantes encontrados no estuário têm mecanismos de mutagénese distintos. No entanto, uma grande variedade possui como denominador comum, a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que medeia a indução de danos no DNA.

Os HAPs são contaminantes ambientais muito difundidos, devido à sua formação durante a combustão incompleta de MO. Em particular, os processos industriais que envolvem a pirólise ou combustão de carvão são uma das maiores fontes de HAPs. Estes compostos orgânicos, que contêm apenas átomos de carbono e hidrogénio e são formados por 2 ou mais anéis aromáticos, podem ser encontrados no ar, água, solos e sedimentos, geralmente a níveis residuais excepto quando perto das suas fontes (IARC, 2010). Muitos HAPs são pro-mutagénicos, i.e. tornam-se genotóxicos apenas após a activação enzimática (fase I de destoxificação). Este processo produz substâncias altamente reactivas e genotóxicas, como diol-epóxidos e ROS (Miller e Ramos, 2001). Estes dois tipos de metabolitos podem causar danos no DNA, uma vez que os HAPs activados têm a tendência de formar aductos no DNA, sendo que as ROS estão envolvidas na oxidação de bases gerando, por exemplo, aductos com a guanina (8-oxoguanina). A IARC classificou muitos destes compostos como carcinogénicos, provavelmente carcinogénicos ou possíveis carcinogénicos para o homem (Tabela 1). O benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) é o único HAP classificado no grupo 1, sendo carcinogénico e teratogénico, e o seu mecanismo de acção genotóxica envolve o metabolismo e a formação de espécies reactivas que formam aductos covalentes no DNA (IARC, 2012). Alguns estudos já revelaram que o B[*a*]P é provavelmente responsável por cerca de metade da mutagenicidade nas fracções de extractos de sedimentos contendo HAP (Chen e White, 2004). Em estudos *in vivo* em ratinhos, também já se observou um aumento das respostas tumorais em tecidos linfóides, hematopoiéticos e em vários órgãos, incluindo pulmões, fígado, esófago e língua, após exposição ao B[*a*]P (IARC, 2012).

Os metais, quando comparados com material orgânico, são moléculas pequenas que estão presentes naturalmente no ambiente e são essenciais para a vida. Contudo, alguns podem-se tornar tóxicos dependendo da sua concentração, estado de oxidação, forma (em complexo ou não) e via de exposição. Na verdade os metais não são degradados pelos organismos vivos e existe o risco de se acumularem até níveis

perigosos, onde podem interagir com macromoléculas celulares, vias metabólicas e processos genéticos (Beyersmann e Hartwig, 2008). A IARC classificou alguns metais e metalóides como carcinogénicos, possíveis ou prováveis carcinogénicos para o homem (Tabela 1). Estes compostos podem ser genotóxicos, apesar do mecanismo exacto de acção ainda não ser completamente conhecido (Figura 2). Considera-se que alguns metais (como por exemplo o Cd, Hg, Ni ou Pb) e metalóides (como o As) podem provocar um desequilíbrio do metabolismo oxidativo (com uma subsequente produção de ROS) e/ou um enfraquecimento da actividade das enzimas de reparação do DNA, apresentando assim um mecanismo de acção indirecto (Beyersmann e Hartwig, 2008). De facto, tem sido sugerido que os metais e metalóides aumentam os danos no DNA agindo como co-mutagénicos, potenciando a formação de aductos de DNA-HAP activados e a produção de ROS, como já observado em células de hepatoma de rato expostas a As (Maier *et al.*, 2002), ou células de leucemia humana co-expostas a PCBs e Cu (Srinivasan *et al.*, 2001). Além disso, também se observou genotoxicidade ao nível dos cromossomas, dado que o As, por exemplo, tem sido reportado como um agente aneugénico a doses baixas mas também clastogénico a doses elevadas (Rossman, 2003; Beyersmann e Hartwig, 2008).

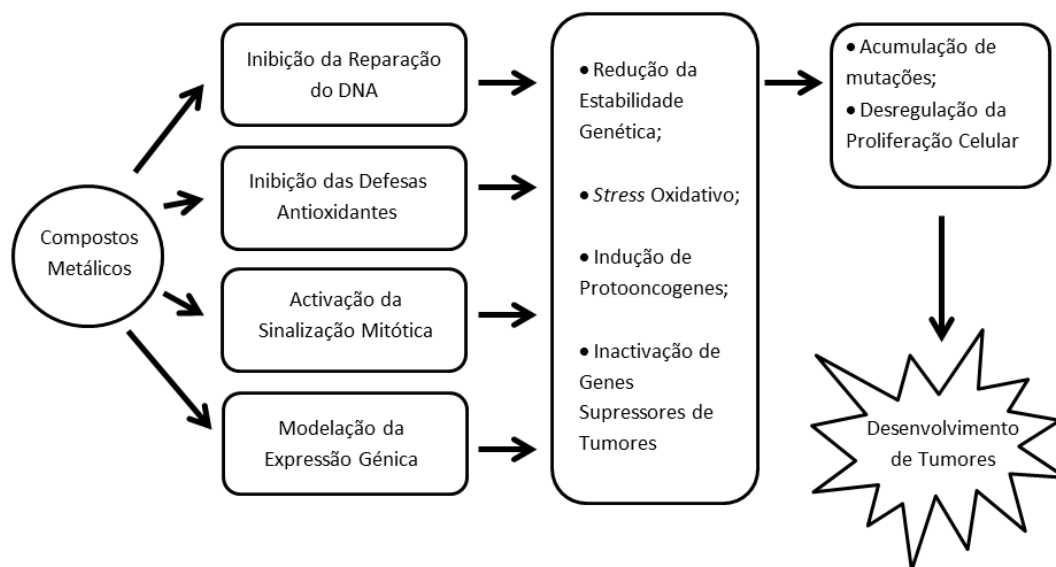


Figura 2 – Principais mecanismos de carcinogenicidade de metais (Adaptado de Beyersmann e Hartwig, 2008).

Por outro lado, os PCBs são compostos orgânicos usados como dieléctricos em transformadores, em fluidos de arrefecimento, sistemas hidráulicos, pesticidas e retardadores de chamas, e como plastificantes em tintas, papel de cópia, adesivos,

selantes e plásticos (OMS, 1993). Os PCBs segundo a classificação da IARC são provavelmente carcinogénicos para o homem (IARC, 1987). A estabilidade destes compostos, que aliás é a razão do seu vasto uso comercial, levou à sua distribuição no ambiente e, apesar da sua produção ter diminuído, ou mesmo sido banida em alguns países, estes compostos ainda persistem no ambiente e são rotineiramente encontrados em soro humano, leite materno e amostras de tecido adiposo (Ludewig *et al.*, 2008). Alguns estudos ligaram a exposição a PCBs à formação de aductos de DNA e quebras na cadeia de DNA mas também ao *stress* oxidativo (Ludewig *et al.*, 2008). Estes compostos podem sofrer activação metabólica, formando-se metabolitos electrofílicos com capacidade para reagirem com macromoléculas celulares como proteínas, lípidos e o próprio DNA (Ludewig *et al.*, 2008).

Finalmente, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), ainda encontrado no estuário do Sado (Carreira *et al.*, 2013), é uma mistura complexa de *para-para'*-DDT, seus isómeros e compostos relacionados. Tem sido usado desde 1943 como um insecticida não sistémico com um amplo espectro de actividades, nomeadamente para o controlo de vectores da malária, tifoide, febre-amarela e doença do sono, e também na agricultura. O seu uso foi banido em alguns países e foi restringido desde 1970 em muitos outros para o controlo de vectores de doenças (como é o caso de Portugal desde que assinou a Convenção de Estocolmo). O DDT é ubiqüitário no ambiente, altamente persistente e tem sido encontrado em alimentos, solos e sedimentos. No entanto, os níveis residuais em tecidos humanos têm vindo a diminuir lentamente com o decréscimo do uso do DDT mundialmente (IARC, 1991). A IARC concluiu que, apesar de não existir provas adequadas para a carcinogenicidade do DDT em humanos, existem indícios suficientes em experimentação animal para que o DDT seja classificado como possivelmente carcinogénico (Grupo 2B) para os humanos (IARC, 1991). Foi observado que os DDTs e os seus metabolitos induzem apoptose em células mononucleares de sangue periférico que é precedida por um aumento dos níveis de ROS (Pérez-Maldonado *et al.*, 2005).

Tal como descrito anteriormente, apesar destes diversos compostos terem uma potencial toxicidade individualmente (particularmente vários HAPs e metais), vários estudos têm mostrado que estes podem ter efeitos aditivos, sinérgicos ou antagonísticos quando combinados numa mistura complexa (Tarantini *et al.*, 2011;

Beyersmann e Hartwig, 2008; Hreljac e Filipic, 2009). Pelo modo de acção destes químicos, é plausível que a formação de ROS, ou metabolitos oxidados, possa ser um mecanismo comum para a indução de danos no DNA, por metais (Beyersmann e Hartwig, 2008), HAPs (Xue e Warshawsky, 2005), PCBs (Marabini *et al.*, 2011), ou DDTs (Pérez-Maldonado *et al.*, 2005). Existe um nível de tolerância biológico para radicais livres que, quando excedido pode causar um nível elevado de danos oxidativos em biomoléculas (como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos) resultando em efeitos biológicos nocivos (Marabini *et al.*, 2011; Collins, 2009). Para além disso, nalguns estudos observou-se que a co-exposição a DDTs (i.e. isoformas e metabolitos) pode aumentar a frequência de micronúcleos induzido por B[a]P em células HepG2, mesmo quando o DDT sozinho não provoca efeitos clastogénicos (Wu *et al.*, 2003). Esta observação é corroborada pelas observações de que os pesticidas induzem a expressão de enzimas envolvidas na activação dos HAPs e outros xenobióticos orgânicos (Dehn *et al.*, 2005; Medina-Díaz e Elizondo, 2005).

2.2.2. Efeitos adversos observados em organismos aquáticos

Foi adicionalmente observado que estes contaminantes presentes nos sedimentos tinham o potencial para induzir efeitos adversos, incluindo genotoxicidade, em espécies aquáticas locais (Carreira *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013). Foram observadas lesões genotóxicas em *Solea senegalensis* (linguado), expostos a sedimentos contaminados com HAPs e metais, através da análise de anomalias nucleares em eritrócitos (ENA; uma variante do teste de micronúcleo convencional) e do ensaio do cometa em sangue periférico do peixe (Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011a). Os resultados observados incluíram a indução de efeitos clastogénicos e de quebras no DNA. Também foi demonstrado por ensaios bioquímicos que a toxicidade dos contaminantes, existentes no sedimento, pode ser influenciada por processos antagonísticos e sinérgicos que resultam de uma exposição a uma mistura complexa de contaminantes (Costa *et al.*, 2009a; Costa *et al.*, 2011b; Costa *et al.*, 2012). Estes ensaios permitiram também observar uma indução de *stress* oxidativo em linguados expostos aos sedimentos. Adicionalmente, análises de biomarcadores histopatológicos também mostraram lesões hepáticas

induzidas em peixes expostos a estes sedimentos contaminados (Costa *et al.*, 2009b; Costa *et al.*, 2011a).

Em suma, ao longo do estuário do Sado observou-se, em estudos anteriores, contaminação devido a fontes antropogénicas. Para além disso, os sedimentos contaminados revelaram induzir genotoxicidade em espécies aquáticas locais de valor comercial. Surgiu, assim, a necessidade de avaliar o risco ambiental, incluindo ecológico e para a saúde humana, associado à contaminação dos sedimentos do estuário do Sado. Essa necessidade justifica-se devido aos potenciais efeitos adversos exercidos pelos contaminantes retidos, que podem ser perigosos para as populações bentónicas locais, mas também para os seres humanos expostos através da agricultura, actividades recreativas ou ocupacionais (por exemplo, pesca) e, mais importante ainda, através da cadeia alimentar.

2.3. O Projecto HERA

No contexto da contaminação e efeitos adversos observados na biota local, e descritos anteriormente, surge o projecto HERA (financiado pela Fundação para Ciência e Tecnologia; PTDC/SAU-ESA/100107/2008) onde este trabalho se insere. Este projecto teve o objectivo geral de avaliar o potencial risco ambiental, incluindo ecológico e para a saúde humana, de um ambiente estuarino contaminado, nomeadamente o estuário do Sado. Nesse sentido, o projecto desenvolveu-se em diversas componentes, nomeadamente: i) uma componente do foro epidemiológico envolvendo a população local, ii) outra relacionada com a caracterização da contaminação do sedimento estuarino tendo em conta as fontes de contaminação, as seguintes iii) visando os efeitos dos contaminantes em espécies estuarinas e iv) os efeitos citotóxicos e genotóxicos em células humanas e, por fim, v) o estudo dos metais pesados em amostras de vegetais, água e solo colhidas na margem sul do estuário, junto da povoação da Carrasqueira.

2.3.1. Componente epidemiológica

Neste projecto foi efectuado um estudo epidemiológico para investigar potenciais vias de contaminação humana numa população com actividades piscatórias e agrícolas da Carrasqueira, uma vila situada na margem sul do estuário do Sado. O

estudo realizou-se através de um questionário (incluindo dados socio-demográficos, hábitos alimentares, e de saúde global e reprodutiva). O estudo confirmou a várias vias de exposição humana aos contaminantes do estuário do Sado por via ocupacional, recreativa e através do consumo de água e organismos aquáticos (como peixes e moluscos) [Machado *et al.*, (submetido)]. Os resultados globais sugerem que existe um potencial efeito para a saúde decorrente da exposição ao estuário do Sado.

2.3.2. Caracterização da contaminação do sedimento estuarino

Outra componente do projecto, teve como objectivo a caracterização de várias amostras de sedimentos do estuário do Sado em termos de contaminantes e parâmetros físico-químicos (Carreira *et al.*, 2013).

Resumidamente, os sedimentos analisados (utilizados também no presente trabalho) foram colhidos em 4 locais do estuário do Sado (Figura 1), provenientes de duas áreas distintas: a área Norte, considerada na generalidade uma zona urbana e industrial (locais P e C), e a área Sul, considerada na generalidade uma zona agrícola e fluvial (locais A e E). Os resultados apresentaram uma heterogeneidade de contaminantes nos sedimentos do estuário e uma diferença evidente entre áreas com influência industrial (norte) e com influência agrícola (sul). A amostra C foi colhida num banco de areia localizado a norte mas ainda afastado da zona industrial de Setúbal, num local com alto hidrodinamismo, e consiste num sedimento essencialmente arenoso, com percentagem de fracção fina (FF) e matéria orgânica total (MOT) muito baixas (Tabela 2). Esta amostra foi considerada uma amostra de referência por ter sido determinada, essencialmente, como não contaminada. A amostra P, colhida perto da zona industrial de Setúbal, é um sedimento essencialmente vasoso, com níveis moderados de contaminantes metálicos (As, Cr, Ni, Cu, Zn e Pb) e orgânicos (pireno, fluoranteno, B[a]P, acenaftileno, acenafteno e dibenzo[a,h]antraceno). A amostra E, colhida perto de uma zona agrícola com pouco hidrodinamismo, local de pesca (apanha de bivalves), é um sedimento essencialmente vasoso, com níveis moderados de contaminantes, particularmente metais (Zn, Cr, Ni, Cu e As). Finalmente, a amostra A, colhida junto ao efluente de drenagem de arrozais adjacentes, também zona de pesca, com pouco hidrodinamismo, apresenta níveis moderados de contaminantes, particularmente metais (As, Cr, Ni, Cu, Zn e Pb) (Carreira *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos e níveis de contaminação das amostras de sedimentos utilizadas neste trabalho

			Amostras				TEL	PEL
			C	A	E	P		
		TOM (%)	1	9	7	10		
		FF (%)	4	74	64	53		
		Contaminante						
Elemento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Metalóides	As	3,50	25,02*	26,44*	19,70*	7,24	41,60
		Se	0,63	0,72	0,59	1,92	n/a	n/a
	Metais	Cd	0,13	0,43	0,33	0,27	0,68	4,21
		Cr	2,30	87,61*	62,22*	77,67*	52,30	160,00
		Cu	4,04	92,30*	74,15*	178,64**	18,70	108,00
		Ni	1,71	22,79*	17,15*	16,67*	15,80	43,00
		Pb	5,73	32,70*	25,30	56,45*	30,20	112,00
		Zn	14,51	385,11**	269,79*	327,51**	124,00	271,00
	SQG-Q elementos	0,04	0,62	0,49	0,68			
Orgânico ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	HAP 3-aneis	Acenaftileno	< d.l.	1,98	0,90	9,77*	5,87	128,00
		Acenafteno	0,41	1,78	1,16	9,00*	6,71	88,90
		Fluoreno	0,43	2,80	1,18	8,41	21,20	144,00
	4-aneis	Fenantreno	10,25	35,03	15,86	66,02	86,70	544,00
		Antracina	0,31	1,54	1,15	9,00	46,90	245,00
		Fluoranteno	2,75	38,99	14,38	207,29*	113,00	1494,00
		Pireno	2,64	36,23	14,89	175,12*	153,00	1398,00
	5-aneis	Benzo[<i>a</i>]antraceno	2,10	13,01	4,44	72,16	74,80	693,00
		Criseno	< d.l.	7,87	3,44	40,88	108,00	846,00
		Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	1,62	14,24	4,94	78,17	n/a	n/a
		Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	0,51	7,02	3,15	49,74	n/a	n/a
		Benzo[<i>e</i>]pireno	1,94	13,54	4,50	70,04	n/a	n/a
	6-aneis	Benzo[<i>a</i>]pireno	0,92	12,83	4,05	86,29	88,80	793,00
		Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno	< d.l.	0,70	0,04	15,09*	6,22	135,00
		Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	< d.l.	14,43	3,67	101,85	n/a	n/a
		Benzo[<i>ghi</i>]perileno	< d.l.	13,03	4,72	78,14	n/a	n/a
		tHAP	23,88	215,03	82,47	1076,98	1684,00	16770,00
	SQG-Q HAPs	0,00	0,02	0,01	0,09			
Pesticidas organoclorados	tDDT	0,02	0,21	0,13	1,22	3,89	51,70	
	HCB	0,02	0,05	0,06	0,04	20,00	480,00	
	SQG-Q Pesticidas	0,00	0,00	0,00	0,05			
PCB	tPCB	0,18	0,26	0,27	5,37	34,10	277,00	
	SQG-Q PCBs	0,00	0,00	0,00	0,02			
	SQG-Q orgânicos	0,00	0,01	0,00	0,06			
	SQG-Q total	0,01	0,16	0,12	0,21			

Adaptado de Carreira *et al.*, (2013). Os contaminantes são apresentados por grama de peso de sedimento seco. Os valores de MOT e FF são expressos em percentagem relativamente ao peso de sedimento seco. < d.l. abaixo do limite de detecção; n/a – valor não disponível; MOT – matéria orgânica total; FF – fracção fina (partículas < 63 μm); SQG-Q – *Sediment quality guideline quotient*; TEL – *Threshold effect level*; PEL – *Probable effect level*. *acima do valor de TEL. **acima do valor de PEL.

Foi efectuada uma estimativa do risco ecológico associado ao ambiente sedimentar, através do índice SQG-Q. Este índice funciona como um indicador da

tendência para observar efeitos biológicos adversos na biota devido á mistura de contaminantes com diferentes concentrações (Long e MacDonald, 1998), classificando as amostras de acordo com três categorias de impacto: Categoria 1: $SQG-Q \leq 0,1$ - Baixo potencial para induzir efeitos adversos; Categoria 2: $0,1 > SQG-Q < 1$ - Potencial moderado para induzir efeitos adversos; Categoria 3: $SQG-Q \geq 1$ - Potencial alto para induzir efeitos adversos. As amostras de sedimento contaminadas do estuário do Sado revelaram possuir um risco moderado (Carreira *et al.*, 2013). De acordo com Macdonald *et al.*, (1996) para o cálculo do índice de risco ecológico SQG-Q, são utilizados os seguintes valores-guia: TEL (*Threshold Effect Level*), que representa a concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos adversos para os organismos aquáticos e o PEL (*Probable Effect Level*), que define a concentração acima da qual frequentemente são esperados efeitos adversos para os organismos.

2.3.3. Efeitos dos contaminantes em espécies estuarinas

Adicionalmente, estudos recentes têm-se focado na caracterização dos efeitos adversos em espécies aquáticas expostas aos sedimentos do estuário do Sado, recolhidas de diferentes áreas de pesca. Uma análise de biomarcadores a uma espécie de amêijoia comercial (*Ruditapes decussatus*, obtidas nos locais de amostragem P e E, respectivamente), revelou a existência de uma indução de *stress* oxidativo (peroxidação lipídica e a actividade da catalase) que se podia correlacionar tanto com os contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes (Carreira *et al.*, 2013). Para além disso, observaram-se lesões histopatológicas e alterações nas guelras e glândulas digestivas dessas amêijoas (Costa *et al.*, 2013). Em concordância, uma análise ao choco (*Sepia officinalis*) revelou também uma indução de *stress* oxidativo nestas espécies (Rodrigo *et al.*, 2013). Efectuou-se também uma análise do risco ambiental, utilizando linguados jovens (*Solea senegalensis*), nos quais foram analisadas alterações histológicas no fígado e biomarcadores de *stress* oxidativo (metalotionina, peroxidação lipídica, e actividade da glutathione-S-transferase (GST) e da catalase) (Gonçalves *et al.*, 2013). Aqui, embora se tenha observado diferenças nos padrões dos marcadores histopatológicos entre as áreas urbano/industrial (local P) e agrícola (locais A e E), não foram observadas diferenças significativas entre as alterações cumulativas nos animais dos dois locais. No entanto, os resultados são consistentes com uma contaminação

fraca a moderada do estuário e indicam que o *stress* oxidativo é o factor mais importante quando se analisa a diferença entre os locais (Gonçalves *et al.*, 2013).

2.3.4. Efeitos citotóxicos e genotóxicos em células humanas

Outro objectivo deste projecto foi o de caracterizar os efeitos citotóxicos e genotóxicos das amostras de sedimentos colhidos em locais de pesca do estuário do Sado, numa linha celular humana (HepG2) (Pinto, 2011; Pinto *et al.*, 2014a). Após uma exposição de 48 h aos extractos dos sedimentos das duas áreas (amostras P e F *versus* amostras A e E), as células HepG2 apresentaram efeitos adversos, com uma relação dose-resposta em comparação com a amostra de referência (amostra C). Os extractos provenientes da zona industrial do estuário do Sado causaram um maior efeito citotóxico e genotóxico (quebra total da cadeia de DNA e clastogénese). Contudo os extractos provenientes da zona rural do estuário demonstraram um potencial superior para induzir danos oxidativos no DNA, revelados pelo ensaio do cometa modificado com FPG. Contudo, importa ainda confirmar se o *stress* oxidativo será o mecanismo mais preponderante na indução de efeitos genotóxicos. Apesar do estuário ter sido classificado como moderadamente contaminado, os resultados sugerem que os sedimentos da zona industrial são significativamente mais genotóxicos e evidenciam danos mais permanentes (indução de micronúcleo) do que os da zona rural. Estas descobertas sugerem que a mistura de contaminantes presentes nos sedimentos testados é genotóxica para as células humanas. No entanto, dado que os sistemas *in vitro* não conseguem mimetizar completamente os sistemas de defesa de um organismo vivo, como um todo, tal como, os sistemas metabólicos e imunitários, preconiza-se a utilização de experiências em animais para confirmar os achados em células.

2.3.5. Estudo dos metais pesados em amostras de vegetais, água e solo

Por fim, a avaliação do perfil de metais pesados em amostras de vegetais, solos e água de poços perto das culturas agrícolas da população da Carrasqueira, fonte de consumo importante, levantaram também algumas preocupações, particularmente para as crianças (Castanheira *et al.*, 2013). De facto, 4 dos vegetais analisados (batatas,

alfaces, tomates e couves) já apresentavam um valor de consumo diário excedente ao estabelecido pela *European Food Safety Authority* (EFSA), particularmente para o As.

Em suma, com o projecto HERA confirmou-se a existência de contaminação no estuário, assim como potenciais vias de exposição, efeitos em espécies aquáticas locais e efeitos adversos induzidos pelos contaminantes numa linha celular humana. A integração dos dados obtidos nestas diferentes componentes do projecto possibilitará a avaliação do risco ambiental, incluindo ecológico e para a saúde humana de um ecossistema costeiro com um impacto antropogénico (Chapman *et al.*, 2013). Neste contexto, estudos dos mecanismos envolvidos na genotoxicidade observada em células humanas bem como estudos em ratinhos poderão contribuir como uma boa linha de evidência para a avaliação do potencial risco para a saúde humana (Pinto *et al.*, 2014a; Pinto *et al.*, 2014b).

3. Caracterização de efeitos genotóxicos

A genotoxicidade é a propriedade de um agente químico ou físico causar alterações no material genético das células levando à formação de mutações génicas e/ou cromossómicas que precedem o aparecimento de cancro. Nem todos os carcinogénicos são genotóxicos; contudo, a quase totalidade de substâncias genotóxicas são carcinogénicas. O estudo de toxicidade ao nível genético é importante para a caracterização de agentes com um potencial genotóxico, tal como a detecção de aductos de DNA, alterações ou lesões ao nível do DNA e dos cromossomas, assim como estudos de reparação de danos no DNA, em modelos celulares e animais. A análise de diferentes biomarcadores, de exposição ou efeito, *in vitro* ou *in vivo*, é usada para avaliar o potencial genotóxico de um xenobiótico ou de uma mistura de xenobióticos. Entre os biomarcadores de efeitos biológicos precoces, os ensaios mais aplicados são os ensaios do micronúcleo e o ensaio de electroforese de célula única em gel vulgarmente designado por ensaio do cometa. Os biomarcadores de exposição incluem a quantificação de aductos de DNA e o ensaio de troca de cromatídeos irmãos, entre outros.

No entanto, a caracterização do potencial genotóxico de sedimentos aquáticos é um desafio, devido à presença de uma mistura complexa de contaminantes, e pode

ser efectuada recorrendo aos sedimentos no seu todo, a águas intersticiais, elutriados ou extractos de sedimentos (Chen e White, 2004). Neste contexto, recorrer apenas a uma análise química dos sedimentos poderá não evidenciar os potenciais efeitos adversos dos diferentes compostos presentes nestas matrizes, tendo em conta, tal como referido anteriormente, que muito destes podem interagir para potenciar os efeitos genotóxicos (Staal *et al.*, 2007; Tarantini *et al.*, 2011). Contudo, os ensaios biológicos podem ter limitações no que se refere ao estabelecimento de relações de causalidade entre um efeito mutagénico observado e a presença de um certo contaminante numa amostra de sedimentos aquáticos, visto que não existe muita compreensão do comportamento de mutagénicos numa mistura ambiental tão complexa. Daí ser preciso cuidado ao fazer considerações em relação à avaliação do potencial risco dos sedimentos aquáticos de forma a não subestimá-lo (Chen e White, 2004).

3.1. Estudos de genotoxicidade *in vitro* de extractos de sedimentos

A avaliação da genotoxicidade de extractos obtidos a partir de amostras de sedimentos tem sido efectuada maioritariamente recorrendo ao uso de linhas celulares ou de espécies aquáticas para avaliar o risco ecológico (Woo *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010; Šrut *et al.*, 2011), ou de células de mamíferos, pela sua capacidade presumida de reflectir os potenciais efeitos adversos em humanos (Aouadene *et al.*, 2008; Chen e White, 2004). No entanto, estudos utilizando linhas celulares humanas, no sentido de avaliar um potencial risco para a saúde humana, são escassos. Embora haja estudos descrevendo o potencial de desregulação endócrina (Higley *et al.*, 2012) ou de indução de metalotioneína em células humanas, existe uma lacuna quanto à indução de efeitos genotóxicos por parte de extractos de sedimentos. Neste contexto, estudos *in vitro* podem também fornecer informação valiosa para os efeitos e respostas decorrentes da exposição a agentes químicos ou físicos e daí, poder-se derivar uma medida de toxicidade e informação sobre os mecanismos subjacentes aos efeitos observados (MacGregor *et al.*, 2001).

3.1.1. A linha celular HepG2

Uma vez que os xenobióticos podem ser genotóxicos ou produzir metabolitos genotóxicos, o fígado é o órgão de eleição para estudar estes efeitos, pois é o órgão

chave da biotransformação de xenobióticos. Neste contexto, a linha celular HepG2, isolada de um carcinoma hepatocelular (Figura 3) bem diferenciado de um indivíduo caucasiano com 15 anos (ATCC), é uma alternativa prática para avaliar a genotoxicidade de contaminantes ambientais (Knasmüller *et al.*, 2004; Valentin-Severin *et al.*, 2003). Devido às suas enzimas de fase I e fase II intactas e indutíveis, as células HepG2 são capazes de activar ou detoxificar xenobióticos, e daí reflectir o metabolismo dos xenobióticos no corpo humano melhor do que células metabolicamente incompetentes usadas em ensaios *in vitro* (Mersch-Sundermann *et al.*, 2004; Uhl *et al.*, 1999). Estudos anteriores nestas células mostraram que as células HepG2 são capazes de expressar enzimas de defesa antioxidante como a desmutase superoxide, catalase, glutathione (GSH) peroxidase e GST em pé de igualdade com os hepatócitos humanos primários (Lee *et al.*, 2002). Assim, estas células são de grande utilidade para a identificação de pro-oxidantes e antioxidantes com relevância *in vivo*, na detecção de substâncias citotóxicas e genotóxicas e, por extensão, citoprotectoras, antigenotóxicas e co-genotóxicas (Mersch-Sundermann *et al.*, 2004).

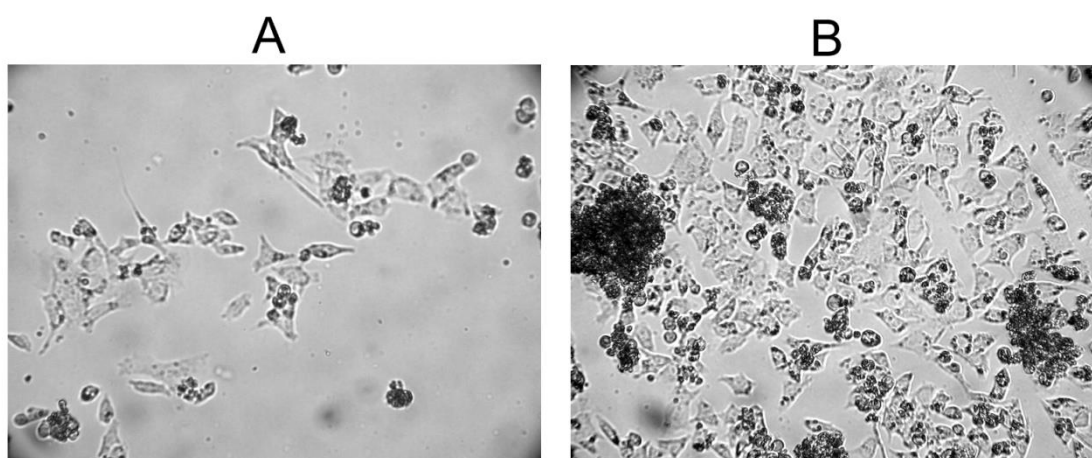


Figura 3 – Foto da linha celular HepG2, observadas ao microscópio óptico de inversão numa ampliação de 100x. **A** – baixa densidade celular; **B** – elevada densidade celular.

3.1.2. Determinação da citotoxicidade: O Ensaio do Vermelho Neutro

Antes de proceder à avaliação da genotoxicidade, é necessário uma avaliação prévia dos potenciais efeitos citotóxicos, i.e. controlar a viabilidade celular na presença do composto a testar, de forma a evitar a ocorrência de falsos positivos nos ensaios de genotoxicidade. O ensaio de incorporação do vermelho neutro (VN) é um dos ensaios mais utilizados para aplicações ambientais e biomédicas. É utilizado em investigação

básica e aplicada, sendo incluído como o primeiro ensaio de não-genotoxicidade *in vitro* aceite para a avaliação regulamentar de químicos (Repetto *et al.*, 2008). Este ensaio baseia-se na capacidade de células viáveis incorporarem e ligarem o corante supravital VN (Figura 4A). Este corante é um catiónico fraco que penetra a membrana celular através de difusão passiva não iónica e concentra-se nos lisossomas, onde se liga através de ligações hidrofóbicas electroestáticas a grupos aniónicos e/ou fosfato da matriz lisossomal. O corante é depois extraído das células viáveis usando uma solução de etanol acidificada, e a absorvância do corante dissolvido é quantificada usando um espectrofotómetro (Figura 4B). Quando uma célula morre ou o gradiente de pH é reduzido, não é possível reter o corante. Consequentemente, a quantidade de corante retido é proporcional ao número de células viáveis. Para além disso, a captação do VN por células viáveis pode ser modificado por alterações na superfície das células ou nas membranas lisossomais. É portanto possível distinguir entre célula viável, danificada ou morta de acordo com a sua capacidade lisossomal específica de incorporar o corante (Repetto *et al.*, 2008).

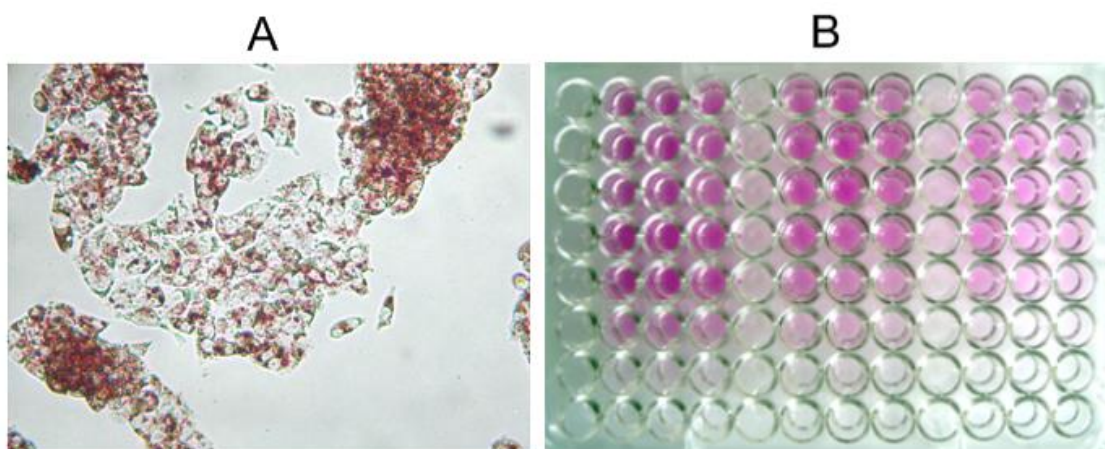


Figura 4 – Ensaio do Vermelho Neutro. **A** – Foto de células HepG2 após incorporação do VN, observado num microscópio óptico de inversão numa ampliação de 100x; **B** – Fotografia de uma placa de cultura de 96 poços no final do ensaio, com o corante VN extraído das células. A quantidade de corante diminui com o aumento da concentração do composto testado (da esquerda para a direita).

Existem vantagens e desvantagens do ensaio do VN em comparação com outros testes de viabilidade utilizados. O processo é muito sensível e fica imediatamente disponível para quantificação. É pelo menos duas vezes mais barato, apresenta menos interferência, é mais sensível e não utiliza reagentes instáveis. Em comum com outros procedimentos utilizados em cultura de células, existem certas limitações devido ao carácter dos compostos a serem testados: substâncias voláteis,

instáveis ou explosivas em água, ou com baixa solubilidade, apresentam alguns problemas (Repetto *et al.*, 2008).

3.1.3. Análise da genotoxicidade: O Ensaio do Cometa

O ensaio de electroforese de célula única em gel (*single-cell gel electrophoresis*) ou do cometa tornou-se um dos testes de genotoxicidade de preferência para a análise de danos no DNA, com aplicações em, biomonitorização humana e epidemiologia molecular (Dusinska e Collins, 2008), assim como em investigação fundamental da lesão do DNA e sua reparação (Collins e Azqueta, 2012). Este ensaio permite a detecção de quebras ao nível do DNA, através da medição da migração dos fragmentos do DNA, a partir de DNA nuclear imobilizado em gel agarose, em condições electroforéticas alcalinas. O campo eléctrico aplicado faz com que o DNA danificado migre no gel, criando-se uma imagem semelhante a um cometa, com cabeça e cauda, quando observado ao microscópio (Figura 5). Os danos no DNA que este ensaio permite detectar são: quebras de cadeia dupla e simples, locais de excisão-reparação incompletas, locais lábeis às bases, alterações na conformação, entre outros. No entanto, não é possível distinguir e identificar o tipo específico de danos, mas sim a globalidade dos danos induzidos (Azqueta e Collins, 2013). A simplicidade, sensibilidade, rapidez, versatilidade e economia do ensaio do cometa têm sido as razões pelas quais este ensaio tem vindo a ser cada vez mais aplicado para a avaliação da genotoxicidade *in vitro* ou *in vivo* (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003). Adicionalmente, de forma a tornar o ensaio mais específico assim como mais sensível, após a lise celular, pode-se introduzir um passo extra de digestão dos nucleóides com uma enzima que reconheça um tipo específico de danos, criando uma quebra no local do aducto. Neste contexto, a endonuclease III (ENDO III) é usada para detectar pirimidinas oxidadas e o formamido-pirimidina-DNA-glicosilase (FPG) para detectar o produto da oxidação das purinas, a 8-oxoguanina, assim como outras purinas alteradas. Em cada caso, nos locais sensíveis às enzimas formam-se quebras de DNA adicionais, aumentando a intensidade da cauda do cometa (Collins, 2014). A contagem dos nucleóides é efectuada através da análise quantitativa da intensidade da fluorescência emitida pelo DNA, após coloração, utilizando sistemas de análise de imagem acoplados ao microscópio de fluorescência. Os parâmetros mais usados,

determinados por *software*, são o comprimento da cauda e a percentagem de DNA na cauda.

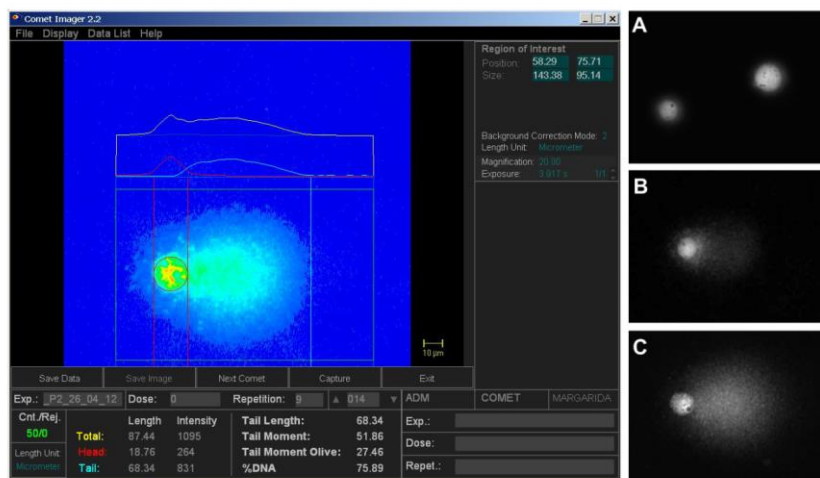


Figura 5 – Fotografias de nucleóides capturadas pelo *software* Comet Imager 2.2 (MetaSystems). **A** – Nucleóides não danificados; **B** – Nucleóide com danos moderados no DNA; **C** – Nucleóide com elevados danos no DNA.

3.1.4. Análise do *Stress* Oxidativo

Os danos oxidativos podem resultar quando o balanço crítico entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante fica desequilibrado. Um excesso de ROS pode oxidar moléculas críticas, e a modificação através da oxidação do DNA, de proteínas e lípidos por oxidantes tem sido implicada em várias condições patológicas, como o cancro, envelhecimento e doenças cardiovasculares (Halliwell *et al.*, 1992). Para proteger as moléculas contra os radicais livres tóxicos e outras ROS, as células têm desenvolvido defesas antioxidantes por componentes endógenas enzimáticas e/ou não enzimáticas (Gordon, 1996). Estas defesas actuam na prevenção da formação de radicais, remoção de radicais antes da ocorrência de danos, prevenção de mutações, reparação de danos oxidativos e eliminação de moléculas danificadas (Gordon, 1996). Apesar da presença de um sistema de defesa antioxidativa eficaz nas células, este pode ficar sobrecarregado em condições de *stress* oxidativo (Arranz *et al.*, 2007).

Os estudos da presença de *stress* oxidativo podem ser efectuados através da análise da concentração de antioxidantes no plasma [por exemplo, vitamina C, carotenóides, GSH, etc.], através da actividade de enzimas antioxidantes [por exemplo, GSH redutase, superóxido dismutase, catalase, GSH peroxidase (remove o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e os lípidos peroxidados)] e através da análise de produtos de

oxidação (malonaldeído, indicador de peroxidação lipídica e de 8-oxoguanina) (Fang *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2006). O ensaio do cometa tem sido utilizado extensivamente para monitorizar o *stress* oxidativo, devido à possibilidade de detectar bases oxidadas, através da inclusão da FPG para evidenciar purinas oxidadas (como a 8-oxoguanina) e da Endo III para evidenciar pirimidinas oxidadas (Collins, 2014). Um aumento da percentagem de DNA na cauda após a incubação com a enzima, em comparação com o valor obtido sem tratamento enzimático, indica a presença de bases oxidadas (Collins, 2014).

No entanto, as ROS podem induzir danos ao nível do DNA através da produção de quebras de cadeia simples, quebras de cadeia dupla, locais lábeis às bases, ou purinas e pirimidinas oxidadas (Arranz *et al.*, 2007). Usado como um agente padrão, o H₂O₂, por exemplo, é um agente oxidante que pode estar envolvida na formação de radicais hidroxilo que são altamente reactivos e destrutivos e que provocam danos directos no DNA (Arranz *et al.*, 2007; Aherne e O'Brien, 2000a). Uma das questões que surge neste contexto é se os danos no DNA provenientes de ROS geradas por alguns dos contaminantes presentes nos sedimentos, podem ser revertidos através da aplicação de um agente antimutagénico. Estes agentes exógenos, muitos deles provenientes da dieta, poderão actuar a diversos níveis na sua acção antimutagénica (Figura 6), como é o caso de muitos polifenóis.

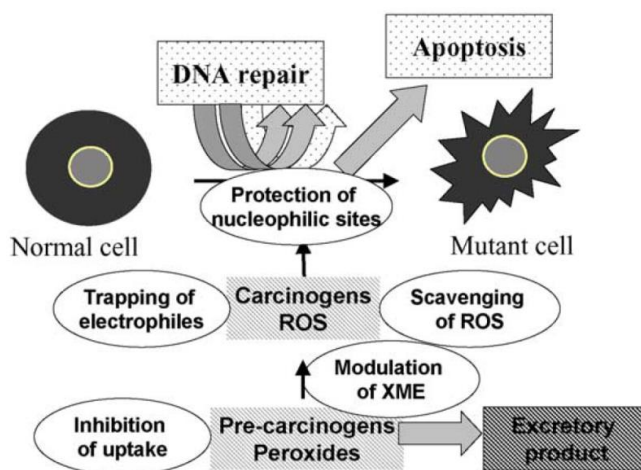


Figura 6 – Esquema das potenciais vias de intervenção de um antimutagénico nos processos de mutagénese em humanos (Ferguson *et al.*, 2004).

Estes últimos constituem um dos mais numerosos e omnipresentes grupos de metabolitos secundários de plantas, com mais de 8.000 estruturas fenólicas

conhecidas actualmente. Os polifenóis naturais variam de moléculas simples (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides) a compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas, taninos) (Barcelos *et al.*, 2011b). Entre os flavonóides, o subgrupo mais comum e largamente distribuído (Bravo, 1998), a quercetina e a rutina são os mais frequentemente estudados e estão presentes em vários vegetais, frutos, sementes, nozes, chás e no vinho tinto (Boots *et al.*, 2008). Vários estudos têm relatado que farmacologicamente, estes compostos atuam como antioxidantes (Gupta *et al.*, 2010), antivirais (Davis *et al.*, 2008), agentes anti-tumorais, anti-inflamatórios (Guardia *et al.*, 2001) e anti-agregantes plaquetários (Sheu *et al.*, 2004). Estes flavonóides actuam como quelantes de catiões divalentes e *scavengers* de radicais livres, que permite prevenir a oxidação do DNA. Eles podem, por isso, estar envolvidos na prevenção da citotoxicidade mediada por radicais livres e na prevenção da peroxidação lipídica, que estão associados ao envelhecimento celular e a doenças crónicas (Bravo, 1998). Estes agentes antimutagénicos têm a capacidade de prevenir a oxidação do DNA e também induzir a produção de certas enzimas metabólicas que inactivam agentes mutagénicos ou que inibem a activação de pro-mutagénicos (Barcelos *et al.*, 2011b; Ramos *et al.*, 2008).

Particularmente, a quercetina (Figura 7) tem mostrado ser um excelente antioxidante *in vitro* e, dentro da família dos flavonóides, é o *scavenger* de ROS e espécies reactivas de nitrogénio mais potente (Barcelos *et al.*, 2011b; Ramos *et al.*, 2008; Noroozi *et al.*, 1998; Aherne e O'Brien, 2000b).

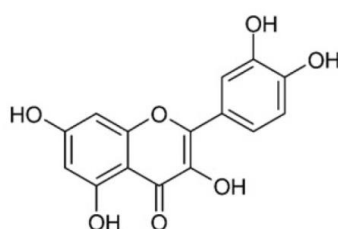


Figura 7 – Estrutura molecular da quercetina [Adaptado de Boots *et al.*, (2008)].

De facto, vários estudos mostraram que a quercetina apresenta uma inibição elevada de ROS gerado pelo H_2O_2 e dos danos induzidos no DNA por diversos compostos, com uma relação dependente da concentração (Barcelos *et al.*, 2011a; Aherne e O'Brien, 2000a; Musonda e Chipman, 1998). Para além disso, em estudos anteriores de genotoxicidade *in vitro*, a quercetina não demonstrou quaisquer efeitos

adversos, o que sugere que a quercetina possa ser um composto anti-genotóxico eficaz (Barcelos *et al.*, 2011a; Barcelos *et al.*, 2011b; Aherne e O'Brien, 2000a; Najafzadeh *et al.*, 2009). Adicionalmente sugere-se que a quercetina está envolvida na activação indirecta de factores de transcrição que regulam a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes (Arredondo *et al.*, 2010). Esta acção também já foi observada em células HepG2, para a catalase, superóxido dismutase e GST e GSH (Alía *et al.*, 2006a; Alía *et al.*, 2006b). No entanto, sugere-se que os polifenóis possam também aumentar o *stress* oxidativo, e a capacidade da quercetina ser citotóxica ou agir como um agente pro-oxidante *versus* antioxidante depende da sua concentração (Halliwell, 2007; Ramos *et al.*, 2008; Boots *et al.*, 2008). A quercetina tem provado ser um excelente antioxidante que também possui capacidades anti-inflamatórias, anti-proliferativas e de indução da alteração da expressão génica *in vitro* (Figura 8). Os efeitos tóxicos da quercetina *in vitro* estão provavelmente associados à formação de possíveis produtos tóxicos após a oxidação da quercetina durante a actividade de *scavenging* das ROS (Boots *et al.*, 2008).

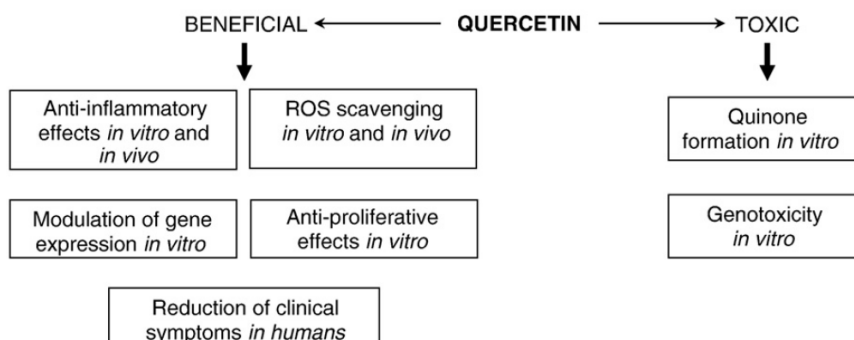


Figura 8 – Esquema dos efeitos benéficos e tóxicos da quercetina *in vitro* e *in vivo* (Boots *et al.*, 2008).

3.2. Estudos de Genotoxicidade *in vivo*

Embora exista uma crescente tendência para a redução da experimentação animal e uma crescente utilização de abordagens *in vitro*, a maioria dos estudos que abordam a toxicidade de compostos presentes em sedimentos aquáticos passam pela aplicação de uma variedade de testes, *in* e *ex situ*, em espécies aquáticas (Thomas *et al.*, 2002, Chen e White, 2004, Kammann *et al.*, 2004, Boettcher *et al.*, 2010, Costa *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2010). De facto, a caracterização dos efeitos adversos ou potenciais efeitos adversos, exercidos na biota local é importante no âmbito da avaliação de risco ecológico. No entanto, esta abordagem fornece pouca informação

quanto ao potencial risco para a saúde humana decorrente da exposição a estes contaminantes por vias directas ou indirectas (i.e. por contacto em actividades recreativas ou ocupacionais, ou pela cadeia alimentar). Assim, a utilização de um modelo de ratinho para a caracterização dos potenciais efeitos genotóxicos dos contaminantes presentes em sedimentos estuarinos, poderá contribuir para a avaliação do risco para saúde humana. Isto é, embora os ensaios *in vitro* possibilitem caracterizar os efeitos adversos induzidos, não permitem compreender (nem substituir) o comportamento dos contaminantes num organismo inteiro. Apenas os estudos *in vivo* têm em conta a complexidade de um organismo, desde a exposição até ao *endpoint* a analisar, incluindo a variabilidade, entre tecidos e órgãos, em processos básicos (por exemplo, taxa de proliferação celular, metabolismo e capacidade de reparar o DNA) que pode influenciar a taxa de mutações (Louro *et al.*, 2010).

Para os ensaios *in vivo* são utilizados frequentemente animais transgênicos, i.e., cujo genoma foi alterado pela introdução artificial de material genético de outra espécie. O desenvolvimento da tecnologia de animais transgênicos permitiu a introdução de DNA estranho na linha germinal de mamíferos por microinjecção de oócitos fertilizados, e a sua expressão. Como permite a introdução de genes específicos nos animais, esta técnica cria novas possibilidades de sistemas para o estudo de doenças genéticas humanas e de mutagénese *in vivo*. O ratinho é a escolha óbvia para este tipo de manipulações, graças às suas pequenas dimensões, curto tempo de geração, à riqueza de conhecimentos em relação ao seu genoma em comparação com o de outros mamíferos e às homologias encontradas entre o genoma de ratinho e humano através de técnicas de mapeamento génico (Lewis, 1994). Alguns ensaios com ratinhos transgênicos permitem determinar a incidência de mutações após a exposição a compostos ambientais, tal como em ensaios de carcinogenicidade. Isto irá permitir, teoricamente, a integração de efeitos genotóxicos primários com influências secundárias, assim como avaliar uma potencial toxicidade selectiva de tecido.

3.2.1. Modelo de ratinho transgênico com o plasmídeo *LacZ*

Vários modelos de animais transgênicos são usados para estudar frequências de mutações (FM) espontâneas ou induzidas *in vivo* em qualquer tecido de interesse

para análise. Estes modelos têm em comum o facto de usarem um gene bacteriano marcador inserido num vector *shuttle*. A diferença entre eles está no tipo de gene repórter, *lacZ*, *lacI*, *supF*, ou *rpsL*, e no tipo de vector *shuttle*, bacteriófago lambda ou plasmídeo. Enquanto os sistemas baseados em bacteriófagos lambda são limitados na sua sensibilidade, detectando principalmente mutações e pequenas deleções, os sistemas baseados em plasmídeos podem também detectar rearranjos grandes (Dollé *et al.*, 1999a).

Neste trabalho, utilizou-se o modelo de ratinho transgénico C57BL/6 baseado em plasmídeo *LacZ* (Gossen *et al.*, 1995), que possui inserido no seu genoma múltiplas cópias do plasmídeo pUR288 (Figura 9), que foi construído por Rütther e Müller-Hill, (1983), e contém como gene alvo de mutações o gene *lacZ* de *Escherichia coli*. Para além disso, este plasmídeo tem o comprimento de 5 346 pares de base (bp) e possui locais de restrição únicos para as enzimas *PstI* (E.C.3.1.23.31), *HindIII* (E.C.3.1.23.21) e *SacI* (E.C.3.1.23.34), entre outras. Contém a sequência operadora *lac*, situada a montante do *lacZ*, à qual se liga a proteína repressora *lacI*. Possui uma origem de replicação (*ori*) ColE1 de *E. coli*. A presença adicional do gene de resistência à ampicilina (*amp^R*) permite o crescimento selectivo de bactérias contendo o plasmídeo em meio de cultura a que foi adicionado esse antibiótico. Finalmente, este plasmídeo contém o local de ligação da proteína activadora de catabolito (CAP), responsável pelo fenómeno de repressão por catabolito.

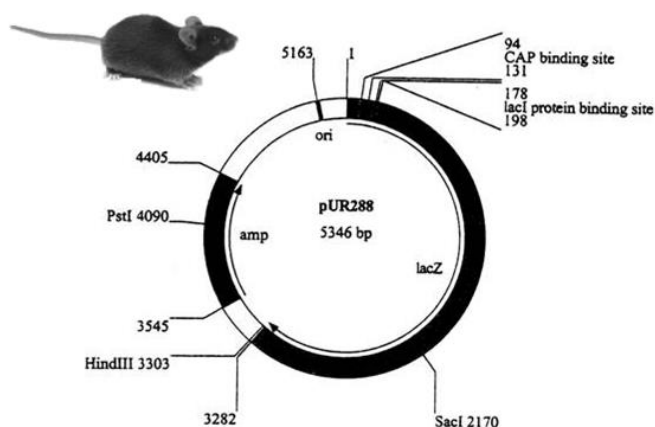


Figura 9 – Plasmídeo pUR288 usado para gerar os ratinhos transgénicos C57BL/6 [Adaptado de Gossen *et al.*, (1995)].

Este modelo permite, para além da aplicação de diversos ensaios de genotoxicidade (tais como os ensaios do micronúcleo, do cometa, troca de

cromatídeos irmãos), a detecção de mutações num gene alvo em múltiplos órgãos, após uma exposição a um dado agente (Louro e Silva, 2011).

3.2.2 Mutagénese num modelo de ratinhos transgénico

Os ratinhos transgénicos que contêm o gene *LacZ* como alvo de mutagénese em todas as células do corpo, incluindo células germinais, foram desenvolvidos para estudar os efeitos mutagénicos de químicos *in vivo* (Gossen *et al.*, 1989; Kohler *et al.*, 1991; Gossen e Vijg, 1993a). Neste modelo é possível detectar mutações em vários órgãos e tecidos, de uma forma fácil e eficiente, sendo necessário um tempo de fixação das mutações, após a exposição e antes do sacrifício (Gossen *et al.*, 1995). As mutações detectáveis podem ser pontuais, pequenas inserções e deleções, assim como grandes rearranjos, i.e. quando os pontos de quebra estão no repórter *LacZ* e noutro local do genoma do ratinho. Este sistema é apropriado para o estudo de mutações espontâneas, por exemplo, em relação ao envelhecimento, ou para monitorizar os efeitos nocivos de mutagénicos, incluindo agentes clastogénicos como a radiação ionizante. O uso deste modelo permite aprofundar o conhecimento dos mecanismos envolvidos tanto para mutagénese espontânea como induzida *in vivo* (Gossen *et al.*, 1995). Uma das vantagens do sistema baseado em plasmídeos, comparado com os vectores lambda, é o facto da recuperação do plasmídeo não ser dependente do seu tamanho e, mais importante, de permitir a detecção de grandes deleções que se estendam para as regiões flanqueantes de cromossomas (Gossen *et al.*, 1995).

Após a extracção do material genómico do ratinho, os plasmídeos contendo o gene repórter *lacZ* são excisados do DNA genómico por uma enzima de restrição (*HindIII*) e são separados do DNA genómico total utilizando esferas magnéticas anti- β -galactosidase e uma proteína de fusão *lacI/LacZ* (Figura 10). Este complexo proteico vai ligar-se especificamente ao anticorpo da β -galactosidase que reveste as esferas magnéticas, possibilitando assim a ligação das esferas ao plasmídeo devido à elevada afinidade que a proteína repressora *lacI* tem para a sequência operadora do operão da lactose (*lac*) (*lacI protein binding site*) (Gossen *et al.*, 1995; Gossen *et al.*, 1993). Após a recuperação do plasmídeo, o isopropil-1-tiol- β -galactósido (IPTG), um indutor do operão da lactose, compete para o local de ligação, libertando o plasmídeo das esferas

magnéticas. Segue-se a recirculação do plasmídeo linear, que é efectuada através da enzima T4 DNA ligase. O plasmídeo circularizado é depois transferido para uma estirpe hospedeira de *E. coli* Δ LacZ/galE⁻ através de electroporação (Louro *et al.*, 2002; Gossen *et al.*, 1995). Para a introdução do plasmídeos nas células bacterianas através da electroporação, são necessárias células electrocompetentes, que possuem uma capacidade acrescida da receber o DNA exógeno devido ao estado de sensibilidade da membrana, que é adquirida na final da fase exponencial de crescimento (Inoue *et al.*, 1990). A técnica de electroporação permite a passagem do DNA para as células bacterianas competentes, através da criação de poros reparáveis na membrana celular após uma descarga eléctrica de alta voltagem (Watson *et al.*, 1992).

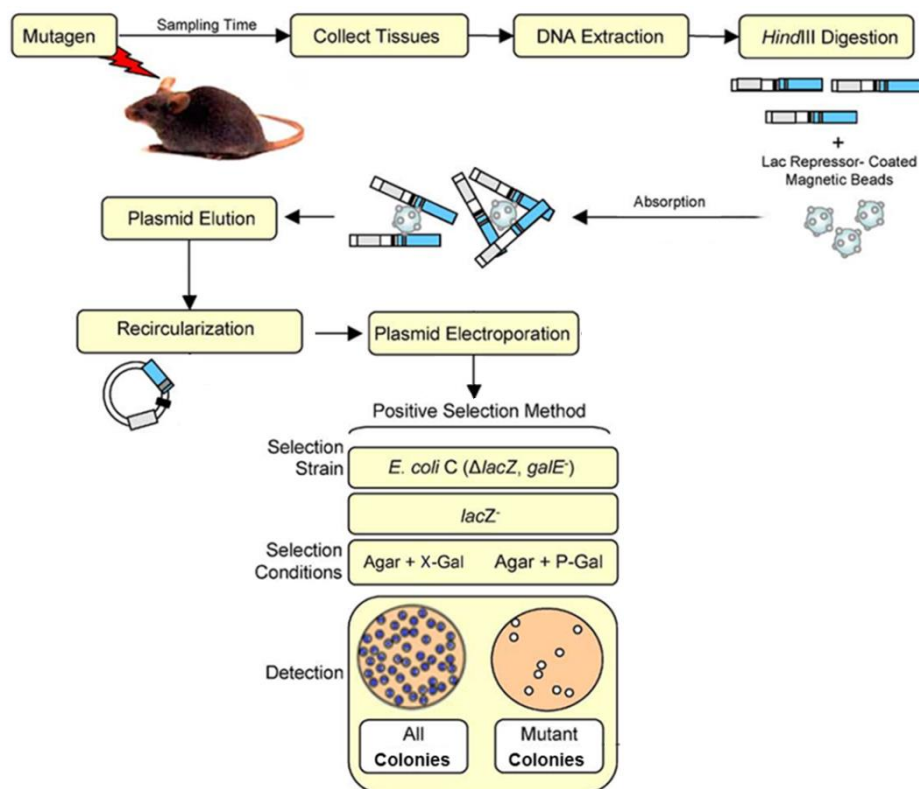


Figura 10 – Ensaio de frequência de mutação em ratinhos transgénicos com o plasmídeo *LacZ*; Esquema da recuperação do transgene *lacZ* do modelo de ratinho baseado em plasmídeo para análise de mutações. O gene *LacZ*, localizado nos plasmídeos inseridos no genoma do ratinho, são recuperados através de hidrólise enzimática do DNA genómico pela enzima *Hind*III e a separação é imunomagnética. Após a sua eluição das esferas magnéticas, e recircularização do plasmídeo este é utilizado para transformar bactérias *E.coli* C (Δ *lacZ*, *galE*⁻) através de electroporação. Parte das bactérias transformadas são incubadas em placas de agar não selectivo (X-gal) (1:1000) e o restante em placas de meio selectivo de mutantes (P-gal). A frequência de mutantes (FM) é calculada como a razão entre estas [Adaptado de Lambert *et al.*, (2005)].

Esta estirpe hospedeira *E. coli* Δ LacZ/galE⁻ é caracterizada pela deleção total do gene *LacZ*, gene que codifica a enzima β -galactosidase, como tal, não consegue

metabolizar a lactose (Figura 11). Esta estirpe possui também uma mutação pontual no gene que codifica a enzima galactose epimerase (ou UDP-galactose 4-epimerase; galE⁻). Isto implica que se as bactérias forem transformadas com o plasmídeo não mutado, i.e. o gene *LacZ* funcional, a bactéria tem a capacidade de iniciar o metabolismo da lactose, contudo devido à mutação galE⁻ não consegue degradar o metabolito UDP-galactose que é tóxico, provocando a morte celular destas bactérias (Gossen *et al.*, 1992; Dollé *et al.*, 1996). Esta mutação em galE facilita a selecção positiva dos mutantes de *LacZ* quando as bactérias são cultivadas em meio contendo o análogo da lactose, fenil-β-D-galactósido (P-gal), pois apenas sobrevivem as colónias contendo o plasmídeo com o gene *LacZ* mutado, i.e. não funcional (Gossen *et al.*, 1992; Dollé *et al.*, 1996; Dollé *et al.*, 1999a; Busuttill *et al.*, 2007; Boerrigter *et al.*, 1995). As bactérias também são plaqueadas num meio de cultura com 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal; um substrato para a β-galactosidase que produz um produto azul) para controlo da sensibilidade do ensaio, em que apenas as bactérias contendo plasmídeo com gene *lacZ* funcional produzem um composto de coloração azul (5-bromo-4-cloro-indolo), distinguindo estas colónias das que contêm o *LacZ* mutado, que surgem como colónias brancas (Gossen e Vijg, 1993b; Dollé *et al.*, 1996). O processo é tão eficiente que numa única experiência milhões de cópias de plasmídeos podem ser recuperadas (Boerrigter *et al.*, 1995).

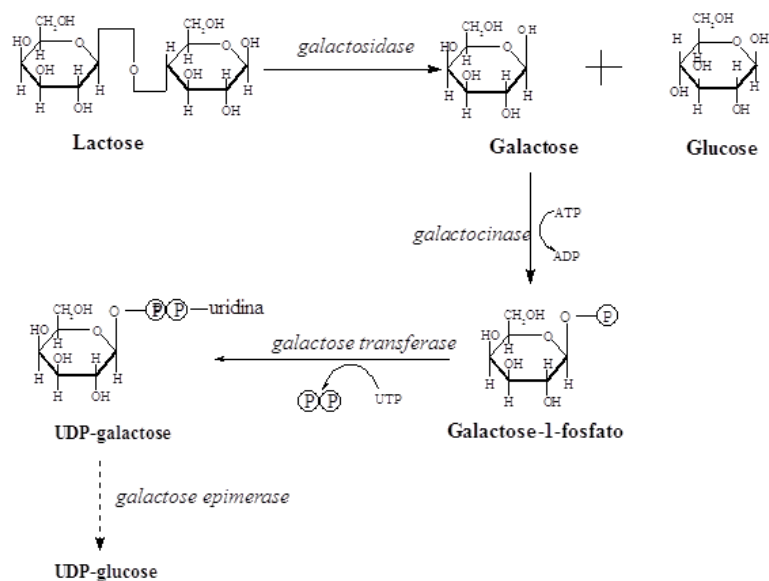


Figura 11 – Metabolismo da lactose em *E. coli* (Dean e Myhr, 1994).

A frequência de mutantes (FM) determina-se como a razão entre o número de unidades formadoras de colónias (UFC) mutantes e não mutantes.

Uma potencial interferência na determinação FM são os falsos mutantes causados por mutação reversa do gene *galE* (i.e. revertentes insensíveis à galactose, *galE+*) podem surgir nas placas de selecção de mutantes (placas com P-gal) e deste modo introduzir erros na determinação da frequência de mutações. Para despistar estes revertentes as colónias de mutantes *lacZ* (colónias brancas) são repicadas em meio não selectivo (meio com X-gal), e apenas as colónias que não formam uma coloração azul após 4 a 6 h são consideradas verdadeiros mutantes (Gossen *et al.*, 1992; Dollé *et al.*, 1996).

Após a selecção das colónias mutantes é possível proceder à caracterização molecular das mutações observadas, com o objectivo de estabelecer o espectro de mutações de determinado agente químico (Louro *et al.*, 2002; Gossen *et al.*, 1995).

3.2.3 Ensaio do Micronúcleo *in vivo* em eritrócitos

O ensaio do micronúcleo *in vivo* em mamíferos é um teste fiável e estabelecido para a análise de danos ao nível do cromossoma, i.e. para a detecção de eventos clastogénicos ou aneugénicos (OECD, 1997). Um micronúcleo é uma estrutura pequena (1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo) que contém DNA nuclear correspondente a fragmentos de cromossomas ou mesmo cromossomas inteiros que não foram incorporados nos núcleos filhos em anafase (Figura 12). Os micronúcleos podem ser formados em qualquer célula de qualquer tecido durante o processo de divisão celular (Lambert *et al.*, 2005). Existem 4 mecanismos através dos quais os micronúcleos se podem formar: perda mitótica de fragmentos de cromossomas acêntricos (aberrações estruturais); consequências mecânicas da quebra ou excisão de cromossomas (aberrações estruturais); perda mitótica de cromossomas inteiros (aberrações numéricas); e apoptose. As aberrações estruturais crêem-se ser resultante de interacções directas ou indirectas dos químicos testados com o DNA, enquanto as aberrações numéricas são habitualmente resultado de interferências com o sistema mitótico que previne a divisão nuclear normal (Krishna e Hayashi, 2000; Lambert *et al.*, 2005).

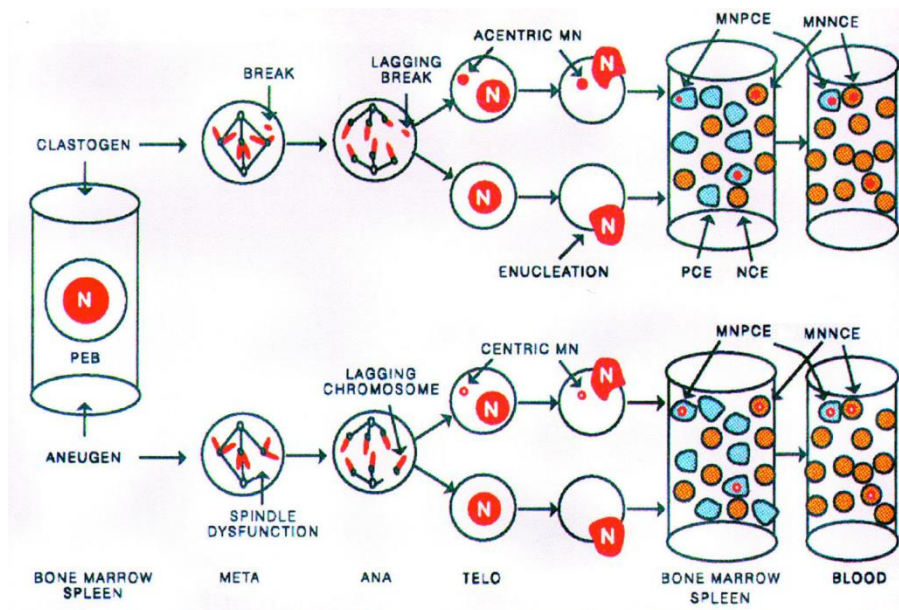


Figura 12 – Mecanismo de formação de micronúcleo em eritrócitos policromatófilos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCEs). N – núcleo; MN – micronúcleo; PEB – pro-eritroblasto [Adaptado de Krishna e Hayashi, (2000)].

Em ratinhos, este ensaio pode ser efectuado na medula óssea após sacrifício, ou em amostras de sangue periférico, permitindo a análise da frequência de micronúcleos em eritrócitos imaturos, i.e., eritrócitos policromatófilos (PCE) ou reticulócitos. Este ensaio permite a detecção de danos ao nível cromossómico em PCE, e eventualmente em eritrócitos normocromáticos (NCEs), i.e., eritrócitos maduros, durante o processo de maturação das células sanguíneas (Figura 12) (Krishna e Hayashi, 2000). Os eritrócitos são particularmente adequados para a análise de micronúcleos porque durante a maturação do eritroblasto para PCE (período de aproximadamente 6 h após a última mitose) o núcleo é expulso. Após este processo, o PCE vai perdendo RNA ao longo do tempo até se tornar um NCE, o que facilita a análise do micronúcleo em PCE após coloração diferencial (Figura 13) (Krishna e Hayashi, 2000; Hayashi *et al.*, 1990). Esta análise é facilitada em espécies, tais como o rato, nas quais o baço não tem a capacidade de remover eritrócitos micronucleados (OECD, 1997). Este facto permite a utilização de sangue periférico para o ensaio do micronúcleo nestas espécies, possibilitando uma amostragem repetida no mesmo animal (Sato *et al.*, 1995), e evita o seu sacrifício, em caso de exposições longas, permitindo uma análise temporal da indução de danos genotóxicos (Heddle *et al.*, 2011; OECD, 1997). As células do sangue são reconhecidas como vantajosas para

análises de genotoxicidade uma vez que o sangue periférico reflecte o potencial estado de saúde global do indivíduo.

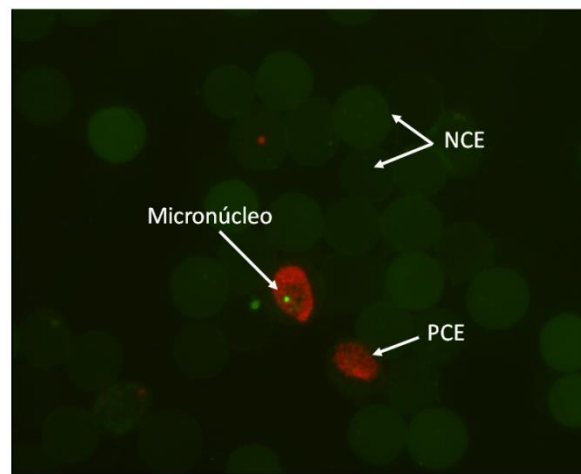


Figura 13 – Foto de esfregaço de sangue periférico de ratinho corado com laranja de acridina, para o ensaio do micronúcleo observado num microscópio de fluorescência numa ampliação de 1000x. Após esta coloração o micronúcleo (contendo DNA) apresenta uma coloração amarelo-esverdeado, e o RNA apresenta uma coloração vermelha. PCE - eritrócitos policromatófilo (reticulócito); NCE – Eritrócito normocromático.

OBJECTIVOS

O objectivo geral deste trabalho é contribuir para a avaliação do risco para a saúde humana decorrente da exposição directa ou indirecta a contaminantes presentes na água e sedimentos do estuário do Sado, através da análise dos potenciais efeitos genotóxicos *in vitro* e *in vivo*. Particularmente, este trabalho teve dois objectivos específicos: i) confirmar a indução de danos oxidativos no DNA pelos extractos dos sedimentos em estudo através da análise da sua potencial reversão pela quercetina na linha celular humana HepG2 e ii) caracterizar a genotoxicidade *in vivo* do extracto de uma das amostras de sedimentos do estuário através do ensaio do cometa e do micronúcleo em sangue periférico, e o ensaio do cometa e de mutagénese em diversos órgãos de ratinho transgénico baseado no plasmídeo *lacZ*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes

Os meios e suplementos para cultura de células, meio DMEM/F-12 com GlutaMAX™, tampão HEPES, soro fetal bovino inativado pelo calor (SFBi), penicilina/estreptomicina e anfotericina B, assim como o Tris-HCl, as esferas magnéticas, a T4 DNA ligase, o tampão fosfato salino (PBS), o DNA *ladder*, o fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e o X-gal são da marca Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O dimetilsulfóxido (DMSO), agarose de baixo ponto de fusão, albumina de soro bovino, Triton X-100, *N*-laurosilsarcosina, quercetina, H₂O₂, HEPES, Trizma Base, vermelho neutro, trifeniltetrazólio, clorofórmio, ampicilina, brometo de etídio (BrEt), kanamicina, dodecil sulfato de sódio (SDS), laranja de acridina e P-gal são da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O Na₂EDTA.2H₂O é da Calbiochem (Darmstadt, Alemanha) e a agarose de ponto de fusão normal da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia). O IPTG é da marca Stratagene (La Jolla, CA, EUA) o tampão NE#2 e a *Hind*III do New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA) e o anticorpo anti-β-galactosidase é da Promega (Fitchburg, WI, EUA). O glicogénio foi da Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanha) e a adenosina trifosfato (ATP) da Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Alemanha). A proteinase K e a RNase A foram da Roche (Basel, Suíça). A bacto-triptona foi adquirida da BD Biosciences (New Jersey, EUA). Todos os outros reagentes mencionados e químicos de laboratório gerais são da Merck (Darmstadt, Alemanha).

A formamido-pirimidina-DNA glicosilase (FPG) e a endonuclease III (ENDO III) foram generosamente cedidas pelo Dr. A.R. Collins da Universidade de Oslo, Noruega. A proteína de fusão lacI/lacZ foi gentilmente fornecida pelo Dr. Harry van Steeg, RIVM, Holanda.

2. Amostragem e análise química dos sedimentos

A amostragem e caracterização química dos sedimentos foram realizadas anteriormente por Carreira *et al.*, (2013). Resumidamente, a amostragem ocorreu durante o Outono de 2010 e a Primavera de 2011. Os sedimentos foram recolhidos, em 4 locais do estuário do Sado, que foi dividido em duas áreas: a área Norte, considerada na generalidade uma zona urbana e industrial (local P), e a área Sul,

considerada na generalidade uma zona agrícola e fluvial (local A e E); e um local de referência (local C) (Figura 1). As amostras de sedimentos foram colhidas com uma draga em locais permanentemente submersos, foram homogeneizadas e transportadas para o laboratório a 4 °C, protegidas da luz. Já no laboratório uma porção das amostras de sedimentos foi preservada a 4 °C para análise e a outra porção foi congelada para estudos futuros. Sub-amostras de cada sedimento foram caracterizadas para contaminantes orgânicos e inorgânicos e parâmetros físico-químicos, e utilizadas para ensaios de genotoxicidade. Os contaminantes metálicos foram determinados por um espectrómetro de massa acoplado a plasma indutivo (ICP-MS) e os compostos orgânicos por técnicas de cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrómetros de massa (GC-MS), a sua análise foi certificada com materiais de referência. Os detalhes do procedimento de análise dos contaminantes estão descritos em Carreira *et al.*, (2013), e a os resultados encontram-se na Tabela 2 já apresentada anteriormente na introdução.

3. Preparação dos extractos de sedimento para ensaios *in vitro* e *in vivo*

A extracção dos contaminantes foi adaptada de Šrut *et al.*, (2011). As amostras de sedimentos foram secas a 40 °C durante uma semana, após a qual foram moídas e pesadas 15 g de cada amostra. Todo o material utilizado foi descontaminado previamente com uma solução de ácido nítrico:água MiliQ (1:1). A extracção foi efectuada com 25 ml de uma mistura de diclorometano:metanol (2:1) sob agitação mecânica durante 30 min. Deixou-se o sedimento sedimentar, retirou-se 15 ml de sobrenadante e evaporou-se o solvente numa placa quente a 45 °C. Os extractos secos contendo os contaminantes foram ressuspensos individualmente em 1,5 ml de DMSO; os extractos em DMSO foram filtrados e armazenados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A proporção final de sedimento:extracto foi 10 g de sedimento seco por ml de DMSO. A concentração do extracto usado em ensaios celulares foi então expresso em mg de sedimento equivalente por ml de meio de cultura (mg SEQ/ml).

Para os ensaios *in vivo*, a extracção foi efectuada nas mesmas proporções mas apenas para a amostra P, a partir de 1800 g de sedimento bruto, recuperando-se os contaminantes em 180 ml de DMSO.

4. Ensaios *in vitro*

4.1. Cultura de células HepG2

A linha celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 foi obtida através da *American Type Culture Collection* (ATCC, No. HB-8065). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM/F-12, suplementado com tampão HEPES (25 mM), 15 % de SFBi, 1,5 % de penicilina/estreptomicina e 1 % de fungizona (0,25 mg/ml), em atmosfera húmida com 5 % de CO₂, a 37 °C. Todas as soluções de tratamento foram preparadas em meio de cultura DMEM/F-12 e 2 % de SFBi.

4.2. Ensaio de Citotoxicidade: Ensaio do Vermelho Neutro

As células HepG2 foram cultivadas numa placa de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço a 37 °C e 5 % de CO₂, 24 h antes de cada tratamento.

Numa primeira abordagem experimental, as células foram expostas a várias concentrações de quercetina durante 49 h desde 0,1 a 100 µM. Numa segunda abordagem as células foram expostas a concentrações de quercetina deste 1 a 200 µM durante 1 h, e numa terceira abordagem foi efectuada uma exposição a H₂O₂, 100 µM, durante 30 min seguida de uma exposição a várias concentrações de quercetina desde 1 µM a 200 µM durante 1 h. Um controlo negativo e de solvente (0,2 % DMSO) foram incluídos em todas as experiências.

O ensaio do vermelho foi efectuado com base no método descrito por Repetto *et al.*, (2008) com algumas modificações, e os passos principais encontram-se apresentados na Figura 14. No final do tratamento renovou-se o meio de cultura e adicionou-se 10 µl de solução de VN (0,5 mg/ml) a cada cultura e incubou-se a 37 °C durante 3 h. Após remoção da solução de VN, lavou-se as células 2 vezes com PBS a 37 °C, adicionou-se solução Stop (50:1:49 de etanol absoluto: ácido acético: água) e agitou-se durante 20 min. A quantidade de VN na solução foi medida espectrofotometricamente a 540 nm usando um espectrofotómetro Multiskan Ascent da Thermo Labsystems (Massachusetts, EUA).

A percentagem de viabilidade celular relativa de células tratadas foi calculada assumindo que o valor médio de absorvância do controlo negativo corresponde a 100 % de viabilidade celular, pela fórmula seguinte:

$$\text{Viabilidade celular relativa (\%)} = \frac{\text{Média da Abs}_{540}[\text{células tratadas}]}{\text{Média da Abs}_{540}[\text{controlo negativo}]} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Os resultados foram expressos como o valor médio de percentagem de viabilidade celular (\pm EP) de três experiências independentes por condição de tratamento.

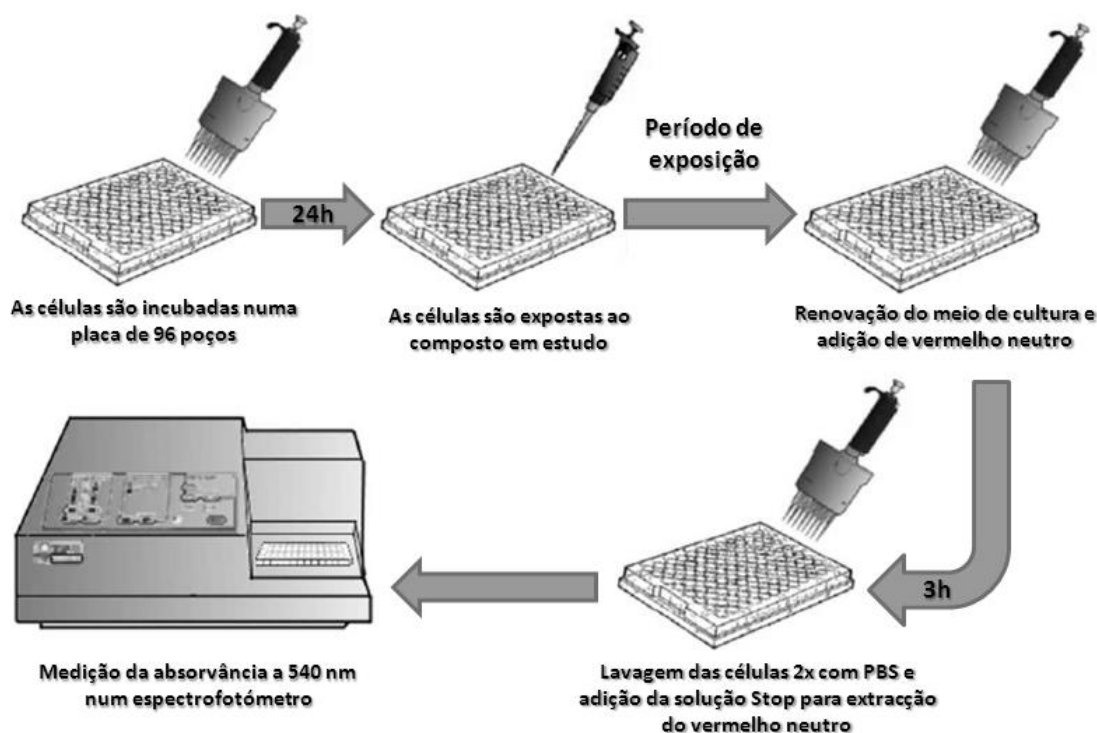


Figura 14 – Esquema dos passos principais do ensaio do vermelho neutro em células [Adaptado de Pinto, 2011].

4.3. Ensaio de Genotoxicidade: Ensaio do Cometa

4.3.1. Tratamento *in vitro* da linha celular HepG2 e alterações ao procedimento geral do ensaio do cometa

Antes do tratamento as células HepG2 foram distribuídas para uma placa de 24 poços a uma densidade celular de 5×10^4 células/poço, e incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ durante 24 h. Cada tratamento foi efectuado em duplicado, de forma a contabilizar a potencial variabilidade entre culturas.

As células foram pré-expostas a quercetina a diferentes concentrações (5 µM, 10 µM e 25 µM) durante 47,5 h e depois foram co-expostas a quercetina às mesmas concentrações e a H₂O₂ a 100 µM durante 30 min de forma a determinar a concentração óptima para utilizar em ensaios com os extractos dos sedimentos.

Para os ensaios com os extractos dos sedimentos, as células foram pré-expostas a quercetina 10 μ M durante 1 hora e depois tratadas simultaneamente, durante 48 horas, com quercetina e os extractos de sedimento nas concentrações que já tinham demonstrado indução de danos oxidativos [entre 50 a 200 mg SEQ/ml dependendo do extracto (Pinto *et al.*, 2014a)]. O controlo positivo, H₂O₂ a 100 μ M durante 30 min, foi garantido em todas as experiências, assim como o controlo do solvente, 2 % DMSO. No final do tratamento as células foram lavadas com PBS, desagregadas e a suspensão celular foi centrifugada durante 10 min a 1200 rpm, a 4 °C. Foi depois adicionada à suspensão celular 80 μ l de agarose de baixo ponto de fusão (1 %), colocaram-se duas gotas desta suspensão em 2 lâminas diferentes e cobriram-se com lamelas (20 x 20 mm). Procedeu-se ao ensaio do cometa em que o tratamento enzimático foi apenas com FPG. Foram analisados 100 nucleóides por tratamento (50 por gel, 2 géis por tratamento). Os resultados foram expressos como o valor médio de percentagem de DNA na cauda (\pm EP) de três experiências independentes por condição de tratamento.

4.3.2. Ensaio do Cometa - Procedimento geral

O ensaio do cometa foi efectuado com base no método descrito por Collins, (2004) com algumas modificações, e os passos principais encontram-se apresentados na Figura 15. A partir da suspensão celular adicionou-se agarose de baixo ponto de fusão (1 %) e colocaram-se duas gotas desta suspensão em 2 lâminas diferentes e cobriram-se com lamelas (20 x 20 mm). Todas as lâminas usadas foram previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1 %). Após solidificação dos microgéis, procedeu-se à lise celular (DMSO 10 % v/v; Triton X-100 1 % v/v; NaCl 2,5 M; Na₂EDTA.2H₂O 100 mM; Tris-HCl 10 mM; *N*-laurosilsarcosina 1 % m/v; pH 10) durante no mínimo 1 hora a 4 °C. No final da lise as lâminas foram lavadas com tampão F (HEPES 40 mM; KCl 100 mM; 0,2 mg/ml de albumina de soro bovino; pH 8), 3 vezes seguidas durante 5 min cada, a 4 °C. Aplicou-se 50 μ l de solução enzimática (FPG ou ENDO III em tampão F) ou apenas tampão F por lâmina, e colocou-se de seguida a incubar durante 30 min para a FPG e 45 min para a ENDO III, a 37 °C. Antes da electroforese as lâminas foram incubadas em tampão alcalino de electroforese frio (NaOH 300 mM; Na₂EDTA.2H₂O 1 mM; pH \approx 13) durante 40 min para a desnaturação do DNA. Ao fim deste tempo iniciou-se a electroforese a 25 V, 300 mA durante 30 min no

frio. No final da corrida as lâminas foram lavadas em tampão de neutralização (Trizma base 0,4 M; HCl 4 M; pH 7,5) durante 10 min, e depois em água destilada durante mais 10 min, a 4 °C. Após secagem, as lâminas foram coradas com BrEt (0,125 mg/ml), e as lâminas foram analisadas num microscópio de fluorescência Axioplan 2 Imaging equipado com uma câmara de alta resolução (ambos do Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Alemanha). Foram contabilizados 100 nucleóides por tratamento através do software Comet Imager 2.2 (MetaSystems, Altlussheim, Alemanha). Utilizou-se como parâmetro de análise a % de DNA na cauda, que está linearmente relacionada com a frequência de quebras no DNA. A diferença entre nucleóides tratados e não tratados com solução enzimática indica a presença de purinas oxidadas, reveladas como quebras pela enzima FPG (sítios sensíveis à FPG) ou presença de pirimidinas oxidadas, reveladas como quebras pela enzima ENDO III (sítios sensíveis à ENDO III).

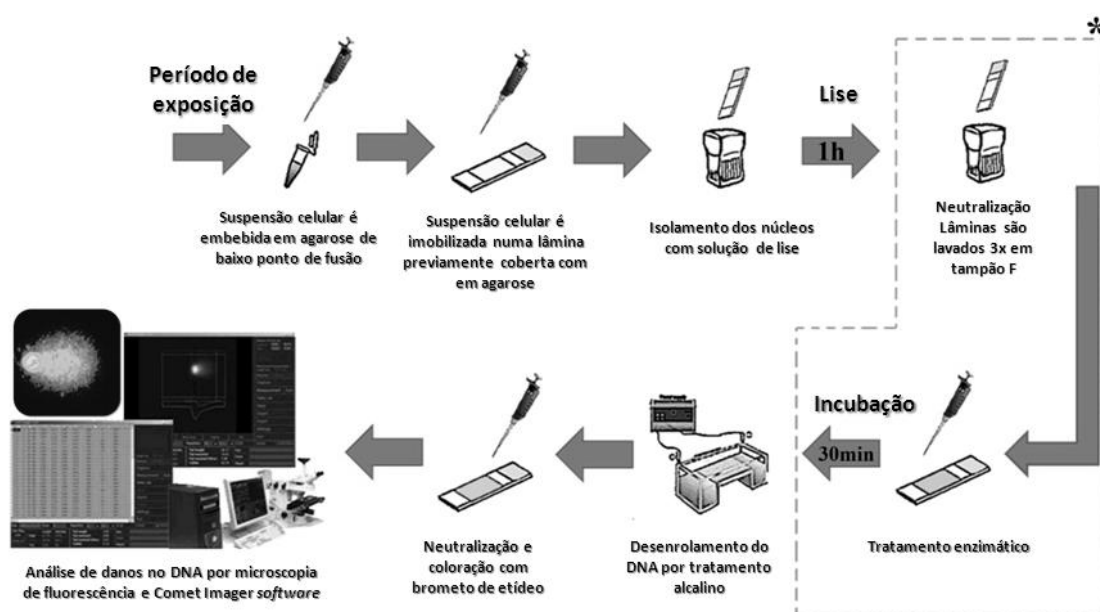


Figura 15 – Esquema dos passos principais do ensaio do Cometa. * - Tratamento enzimático com FPG ou ENDO III para revelar danos oxidativos no DNA [Adaptado de Pinto, 2011].

5. Ensaio *in vivo*

5.1. Ratinhos transgênicos: Manutenção, Tratamento e Sacrifício

Os ratinhos transgênicos C57BL/6 com 20 cópias do plasmídeo pUR288 por genoma haplóide, foram oferecidos pelo Dr. Jan Gossen. A manutenção, reprodução, tratamento e sacrifício dos ratinhos foi feita de acordo com as orientações da União Europeia e decorreram no Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Lisboa. Os

ratinhos foram mantidos a uma temperatura de 21 a 23 °C, com um ciclo de luz/escurecimento de 12 /12 h e a ração e a água foram fornecidas *ad libitum*.

Foram utilizados ao todo 18 ratinhos machos com \approx 19 semanas de vida, divididos aleatoriamente em 3 grupos de 6, sendo cada animal designado com códigos de R1 a R18. O peso médio de cada ratinho era $22,6 \pm 1,6$ g. Os grupos de ratinhos foram expostos por via oral, através da água que bebiam. Enquanto dois grupos foram expostos a duas concentrações diferentes do extracto do sedimento P, um grupo de controlo negativo foi exposto ao solvente do extracto (DMSO). O período de exposição foi 28 dias, sendo a água com extracto renovada 2 vezes por semana.

A selecção das doses e, em particular, da dose mais elevada, para a exposição dos ratinhos baseou-se na DL_{50} oral de chumbo (Pb), que corresponde a 1,2 mg Pb/Kg de peso corporal (pc) (IPCS/ INCHEM) e nos resultados da determinação prévia de Pb nos sedimentos (Carreira *et al.*, 2013). Verificou-se o consumo diário médio de 10 ml de água por ratinho, correspondendo a uma dose final de 73,7 e 147,3 g de SEQ/dia/Kg pc. Estas doses serão adiante referidas como Dose 1 e Dose 2, respectivamente. O grupo controlo foi exposto ao solvente, DMSO, na mesma quantidade que o grupo de ratinhos expostos à dose mais elevada de extracto (0,33 ml de DMSO/dia i.e. a 3,33 % de DMSO/dia).

Antes do início do tratamento (T_0) e no final de cada semana de tratamento até ao sacrifício (T_1 a T_4) os ratinhos foram pesados e foi-lhes retirado sangue periférico para os ensaios do cometa e do micronúcleo. Para a colheita de sangue periférico imobilizou-se o ratinho num cilindro imobilizador, picou-se a cauda deste com uma agulha e retirou-se aproximadamente 3 - 5 μ l de sangue (Figura 16) para as diferentes análises.



Figura 16 – Ilustração da imobilização de um ratinho num cilindro imobilizador.

Decorrido o período de exposição de 28 dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos foram removidos (fígado, baço, rins e testículos). Uma pequena porção de fígado, baço e rim foi retirada para o ensaio do cometa e o

restante foi congelado em azoto líquido e armazenado a -80 °C até serem processados para o ensaio de mutações.

5.2. Ensaio do Cometa em Sangue Periférico de Ratinhos

O ensaio do cometa foi realizado em vários períodos: antes do início do tratamento (T_0) e no final de cada semana de tratamento até ao sacrifício (T_1 a T_4).

O procedimento do ensaio do cometa em sangue periférico de ratinho utilizado foi semelhante ao que foi descrito anteriormente, apenas com algumas diferenças. Retirou-se aproximadamente 3 - 5 μ l de sangue da cauda do ratinho e colocou-se em 10 μ l de solução de *mincing* fria [D-PBS (livre de Ca^{++} e Mg^{++}); EDTA 20 mM; DMSO 10 %; pH \approx 7,5]. Após a adição de agarose de baixo ponto de fusão a 1 %, espalhou-se 40 μ l desta suspensão, em 3 lâminas diferentes, e colocou-se uma lamela (20 x 20 mm) por cima. As lâminas foram incubadas a 4 °C por 5-10 min.

Três lâminas a utilizar como controlo positivo foram colocadas numa solução de 5 ou 10 mM H_2O_2 durante 15 min, e depois em PBS durante 2 min antes da lise.

Procedeu-se em seguida ao ensaio do cometa de acordo com o procedimento descrito no subcapítulo "4.3.2. Ensaio do Cometa - Procedimento geral", incluindo tratamento enzimático efectuado com FPG e ENDO III. Foram contabilizados 100 nucleóides por cada ratinho.

5.3. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico de Ratinho

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico de ratinho foi baseado no método descrito por Hayashi *et al.*, (2000). O procedimento foi efectuado no final de cada semana de tratamento até ao sacrifício (T_1 a T_4). Resumidamente, retirou-se aproximadamente 4 μ l de sangue periférico para uma lâmina previamente corada com laranja de acridina (1 mg/ml) e esta foi coberta com uma lamela. (Figura 17). As lâminas foram armazenadas a 4 °C até à sua observação num microscópio de fluorescência (Axioplan 2 Imaging, Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Alemanha).



Figura 17 – Esquema representativo do ensaio de micronúcleo em sangue periférico de ratinho

Analisaram-se ao todo 2000 reticulócitos por ratinhos (1000 por lâmina, 2 laminas por ratinho) e contabilizou-se o número de reticulócitos micronucleados. Os resultados foram expressos em frequência média de reticulócitos micronucleados por 1000 reticulócitos por grupo de tratamento e a percentagem média de reticulócitos por grupo de tratamento. Para aferir possíveis efeitos de mielotoxicidade, foi registada a proporção de reticulócitos de tipo I, II e III entre os eritrócitos maduros (Figura 18).

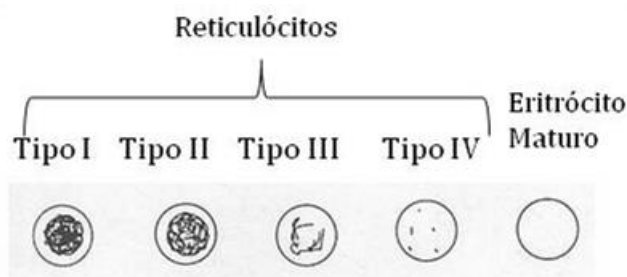


Figura 18 – Distinção entre os vários tipos de reticulócitos de ratinho de acordo com a quantidade de RNA no citoplasma [Adaptado de Asita *et al.*, (1992)].

5.4. Ensaio do Cometa em Órgão de Ratinhos

Após o sacrifício do animal uma pequena porção do órgão pretendido (Fígado, Baço e Rim) foi retirada e colocada em 0,5 -1 ml de solução de *mincing*. Com o auxílio de uma tesoura, trituraram-se os órgãos em pequenos pedaços de forma a libertar células para a solução. A partir da suspensão celular procedeu-se do mesmo modo que o ensaio do cometa anteriormente descrito. Três lâminas foram utilizadas como controlo positivo, mergulhando-as numa solução de H₂O₂ a 10 mM durante 15 min, seguido de 2 min em PBS frio, antes de proceder à lise.

5.5. Extração de DNA genómico de tecidos

O isolamento e purificação do DNA genómico do fígado e do baço após o sacrifício dos ratinhos foi efectuado como descrito por Gossen *et al.*, (1993). Este

procedimento consiste em três partes: lise celular, purificação e precipitação do DNA.

Em primeiro lugar, descongelou-se um fragmento do órgão e colocou-se em 9 ml de tampão de lise (Tris 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM; pH 8) e destruiu-se o tecido mecanicamente através de um homogeneizador (IKA - Werke, Staufen, Alemanha). Foi adicionado proteinase K (0,5 mg/ml), SDS (1 %) e RNase A (120 µg/ml) e as amostras foram incubadas durante a noite a 56 °C, com agitação rotativa.

Após a incubação, o DNA foi extraído conforme descrito em Louro *et al.*, (2002). Adicionou-se 1 volume (10 ml) de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e deixou-se a agitar num agitador horizontal durante 15 min. A suspensão foi centrifugada a 4000 rpm durante 20 min à temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante sem arrastar a interfase, para um novo tubo, e repetiu-se a extracção nas mesmas condições. Adicionou-se 1/5 de volume (2 ml) de acetato de potássio a 8 M e 1 volume de (11 ml) de clorofórmio absoluto, agitou-se no agitador horizontal durante 10 min e centrifugou-se outra vez a 4000 rpm durante 20 min. De seguida, após a remoção do sobrenadante para um tubo novo, o DNA foi precipitado por adição de 2 volumes (20 ml) de etanol absoluto. O DNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol a 70 % gelado, por 2 vezes, e de seguida seco em vácuo (SpeedVac Concentrator, Savant, NY, EUA) durante 10 min, e ressuspenso em 200 - 400 µl tampão Tris-EDTA (TE) (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8). O DNA dissolvido foi armazenado a 4 °C.

A qualidade do DNA genómico foi verificada de forma a poder comprovar a integridade física desde, através de electroforese do DNA em gel de agarose a 1 % em tampão Tris-borato-EDTA 1x, durante aproximadamente 5 h, a 70 V. Para cada amostra utilizou-se 1 µl de DNA genómico e adicionou-se 2 µl de azul bromofenol e 8 µl de água miliQ para diluir a amostra; para todas as corridas foi utilizado um marcador de massa molecular, de tipo DNA *ladder*. A quantificação do DNA foi obtida espectrofotometricamente, através da leitura das absorvâncias a 260 e a 280 nm. A concentração de DNA foi expressa em µg/ml e a pureza da amostra foi dada pela razão A_{260}/A_{280} , onde 1,8 a 2,0 corresponde a uma amostra de DNA com elevada pureza.

5.6. Recuperação do transgene *LacZ* e Determinação da Frequência de Mutantes

A recuperação do transgene de entre o DNA genómico e a determinação da frequência de mutantes (FM) foi realizada como previamente descrito por Dollé *et al.*, (1996). Recorreu-se aos resultados obtidos na quantificação do DNA para se preparar para cada amostra uma solução com 30 µg de DNA genómico num volume final de 58 µl de tampão TE. Adicionou-se 15 µl de tampão de ligação 5x (Tris-HCl 50 mM; EDTA 5 mM; cloreto de magnésio (MgCl₂) 50 mM; glicerol 25 %; pH 6,8) e 4 µl de *Hind*III a 10 U/µl e incubou-se a 37 °C durante a noite com agitação horizontal. No final da incubação do DNA com *Hind*III adicionou-se 60 µl de esferas magnéticas, já previamente preparadas cobertas com anticorpo anti-β-galactosidase e proteína de fusão LacI/LacZ, que se liga especificamente ao plasmídeo. A mistura foi incubada a 37 °C durante 1 h, com agitação horizontal. Precipitaram-se as esferas, já com o DNA plasmídico ligado e recolheu-se 5 µl do sobrenadante, contendo fragmentos de DNA genómico digerido para um posterior controlo da digestão (controlo igual ao utilizado no teste de qualidade do DNA genómico mas sem diluição da amostra). O restante sobrenadante foi desprezado. As esferas foram lavadas por 3 vezes com tampão de ligação 1x (20 % de tampão de ligação 5x e 80 % de água miliQ). Para libertar o DNA plasmídico das esferas adicionou-se 5 µl de solução stock de IPTG (25 mg/ml) e 75 µl de tampão IPTG (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; cloreto de sódio 125 mM). Iniciou-se uma segunda digestão com *Hind*III para garantir a degradação do DNA genómico que ainda pudesse existir, através da adição de 20 µl de tampão NE#2, 100 µl de água miliQ e 2 µl de *Hind*III a 10 U/µl, e incubou-se durante 30 min a 37 °C com rotação e movimento orbital. Inactivou-se a *Hind*III durante 20 min a 65°C em banho-maria e arrefeceu-se até à temperatura ambiente com um *spin* na centrífuga. Para a circularização do plasmídeo preparou-se uma mistura com 8 µl de água miliQ e 2 µl de tampão T4 DNA ligase 5x, retirou-se 1 µl desta mistura e acrescentou-se 1 µl de T4 DNA ligase 10x (U/µl) e 20 µl de ATP a 10 mM. Adicionou-se 3 µl desta mistura à solução contendo o DNA plasmídico e incubou-se durante 60 min à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo precipitaram-se as esferas no magneto e transferiu-se o sobrenadante para um novo *ependorf* com 1,5 µl de glicogénio para precipitar o DNA plasmídico. Agitou-se no vortex e adicionou-se 22 µl de acetato de sódio (3 M a pH 4,9) e 560 µl de etanol absoluto, misturou-se de novo no vortex e incubou-se durante 60

min a -80 °C. Centrifugou-se os tubos a 13200 rpm durante 30 min, lavou-se o pellet com 250 µl de etanol a 70 % gelado, centrifugou-se mais 5 min e removeu-se todo o etanol com uma pipeta. O pellet foi seco em vácuo durante 10 min e ressuspensão em 5 µl de água miliQ.

Para introduzir o DNA transgénico nas células competentes foi utilizada a electroporação. As células electrocompetentes *E.coli* C ($\Delta lacZ/galE^-$) foram descongeladas em gelo. Adicionaram-se 60 µl de células ao DNA plasmídico recuperado do genoma do ratinho e ressuspensão em água. Transferiram-se as células para uma cuvette de electroporação (com largura de 0,1 cm) e utilizou-se um aparelho de electroporação (BioRad, Califórnia, EUA), constituído por um aparelho de Gene Pulser a 25 µF e um campo de 1,8 kV em ligação com Pulser Controller contendo um resistor de 200 Ω. Durante a electroporação registou-se o respectivo tempo que a corrente demorou a passar por cada amostra. Imediatamente após a electroporação adicionou-se 1 ml de meio SOB frio (20 g de Bacto-triptona; 5 g de extracto de levedura; 0,5 g de NaCl; 10 ml de 0,25 M de KCl; água miliQ; pH 7) com 5 mM de MgCl₂, para minimizar os danos da descarga eléctrica nas células. Transferiu-se as células para um tubo marcados com um P contendo 1 ml de meio SOB com MgCl₂ e incubou-se durante 30 min a 37 °C com agitação. Após a incubação, efectuou-se uma diluição de 1:1000 retirando-se 2 µl das células dos tubos P para tubos marcados com X com 2 ml de SOB, para a diluição de 1:400 retirou-se 5 µl de células do tubo P para tubos marcados com X400 com 2 ml de SOB.

Foi preparado meio de cultura não selectivo, para determinar o total de colónias não mutadas adicionando ao meio Top Agar, ampicilina (25 mg/ml), kanamicina (50 mg/ml), 0,5 mg de trifeniltetrazólio e X-gal (50mg/ml) (0,612 g de meio LB com 0,612 g meio antibiótico 2 por cada 100 ml de água miliQ). Cerca de 13 ml deste meio foram adicionados aos tubos X e X400, que foram imediatamente colocados em placas de Petri. Para seleccionar as colónias mutadas, foi preparado meio selectivo Top agar igual ao acima descrito, mas com 0,3 g de P-gal e sem X-gal. Cerca de 13 ml deste meio foram adicionados aos tubos P, que foram imediatamente colocados em placas de Petri. Após a solidificação do meio de cultura, as placas de Petri foram incubadas durante a noite a 37 °C.

A contagem das colónias foi efectuada na manhã seguinte: nas placas X (com X-gal) contaram-se as colónias azuis (plasmídeo com o gene *lacZ* não mutado) e nas placas P (com P-gal) contaram-se as colónias brancas (plasmídeo com o gene *lacZ* mutado) (Figura 19).



Figura 19 – Esquema da condição de selecção das colónias de bactérias *E. coli* para o ensaio de frequência de mutação em ratinhos transgénicos com o plasmídeo *LacZ*. Placas de agar não selectivo (X-gal) e placas de meio selectivo de mutantes (P-gal).

A FM foi calculada com a razão entre o número de colónias mutantes e o número total de colónias (no mínimo 100) multiplicado pelo factor de diluição (equações 2 e 3).

$$FM(1:1000) = \frac{\text{colónias mutantes}}{\text{colónias não mutantes} \times 1000} \quad (\text{equação 2})$$

$$FM(1:400) = \frac{\text{colónias mutantes}}{\text{colónias não mutantes} \times 400} \quad (\text{equação 3})$$

6. Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada através do programa SPSS Statistics 19.0 (IBM Software). Após transformação dos dados através de logaritmização, para se obter normalidade, os resultados do ensaio do cometa foram analisados através do teste *t* de Student, considerando a normalidade dos dados e a homogeneidade de variâncias através dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Os dados de citotoxicidade foram analisados da mesma forma que os dados do ensaio do cometa, não sendo necessária a logaritmização dos dados.

Os resultados do ensaio do micronúcleo foram analisados pelo teste exacto de Fisher.

A comparação da frequência de mutações entre grupos tratados e não tratados foi realizada usando o teste *U* de Mann-Whitney. O valor limite de significância estabelecido para todas as análises foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. Citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*, em células HepG2

1.1. Determinação da concentração de quercetina mais efectiva (exposição longa)

Numa primeira abordagem, após 49h de exposição a várias concentrações de quercetina (0,1 a 100 μM), observou-se uma queda acentuada da viabilidade celular com os tratamentos de 10 μM e 25 μM , de $94,79 \pm 3,61 \%$ para $43,06 \pm 3,01 \%$ (Figura 20). As concentrações de quercetina entre os 25 e os 100 μM induziram uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular em relação ao controlo negativo ($p < 0,001$ para ambos). O controlo do solvente (DMSO a 0,14 %) não induziu citotoxicidade nestas condições experimentais (viabilidade = $103,63 \pm 2,87 \%$).

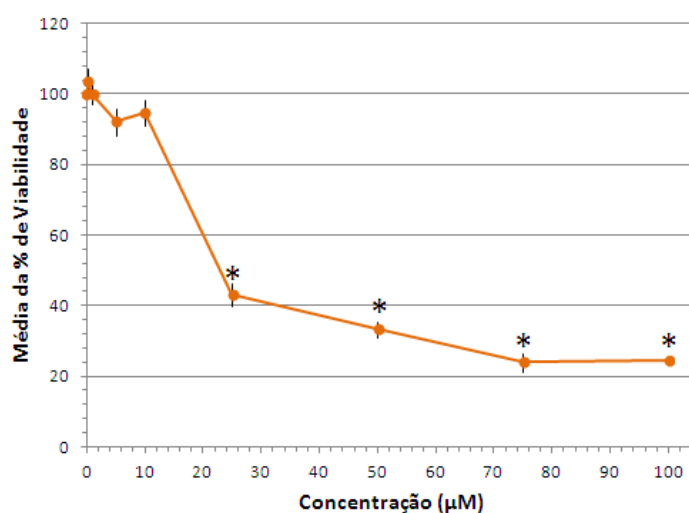


Figura 20 – Resultados do ensaio do vermelho neutro em células HepG2 após uma exposição de 49 h a quercetina em concentrações diferentes (0,1 a 100 μM). Os resultados apresentados são o valor médio da percentagem de viabilidade celular ($\pm\text{EP}$) de 3 experiências independentes. * - Diferenças estatisticamente significativa quando comparado com o controlo negativo.

De seguida, investigou-se qual a concentração de quercetina ideal para produzir um efeito inibitório dos danos oxidativos causados pelos extractos do estuário do Sado, já observados em estudos anteriores através do ensaio do cometa (Pinto *et al.*, 2014a) e apresentados no Anexo A (Figura A1). Num primeiro ensaio, testaram-se 3 concentrações não (ou moderadamente) citotóxicas de quercetina (5, 10 e 25 μM) contra o controlo positivo (H_2O_2 a 100 μM), utilizando uma pré-exposição de 48,5h seguido de uma co-exposição de 30 min (Figura 21). Neste ensaio, aquando uma exposição prévia com quercetina a 5 e 10 μM , observou-se uma redução de aproximadamente 11 % na percentagem de DNA na cauda em células expostas a H_2O_2 ,

com tratamento com FPG. No entanto, após uma exposição à concentração de 25 μM de quercetina, a mesma redução não se verificou. Na ausência de tratamento enzimático, a percentagem de DNA na cauda, em comparação com o controlo positivo, foi reduzida até 8, 10 e 13 %, para as três concentrações de quercetina testadas, respectivamente. A quercetina não induziu genotoxicidade nestas condições experimentais em comparação com o controlo negativo.

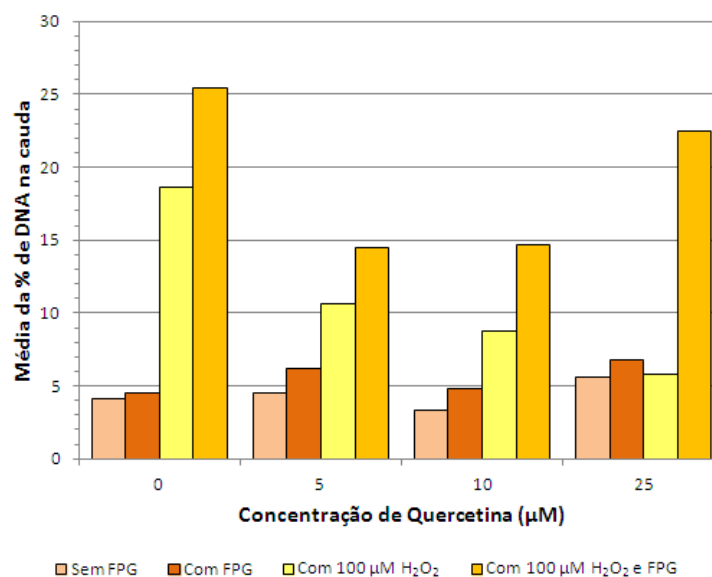


Figura 21 – Resultados do ensaio do cometa em células HepG2 após uma exposição a concentrações diferentes de quercetina, durante 49h. As células foram pré-expostas a diferentes concentrações de quercetina durante 48,5 h e sofreram mais 30 min de co-exposição a H₂O₂ a 100 μM . Os valores apresentados representam o valor médio da percentagem de DNA na cauda de apenas uma experiência.

1.2. Co-exposição a quercetina e aos extractos de sedimentos

Perante a redução da percentagem de DNA na cauda pela pré- e co-exposição a quercetina e H₂O₂ em comparação com o controlo negativo, aplicou-se o mesmo tratamento aos extractos dos sedimentos do estuário do Sado, utilizando a concentração de 10 μM porque foi a concentração que provocou a maior redução dos danos induzidos pelo H₂O₂ no DNA, com e sem FPG. O tratamento com os extractos apenas durante 48h produziu resultados semelhantes aos obtidos por Pinto *et al.*, (2014a) no que diz respeito à indução de quebras no DNA (Figura 22).

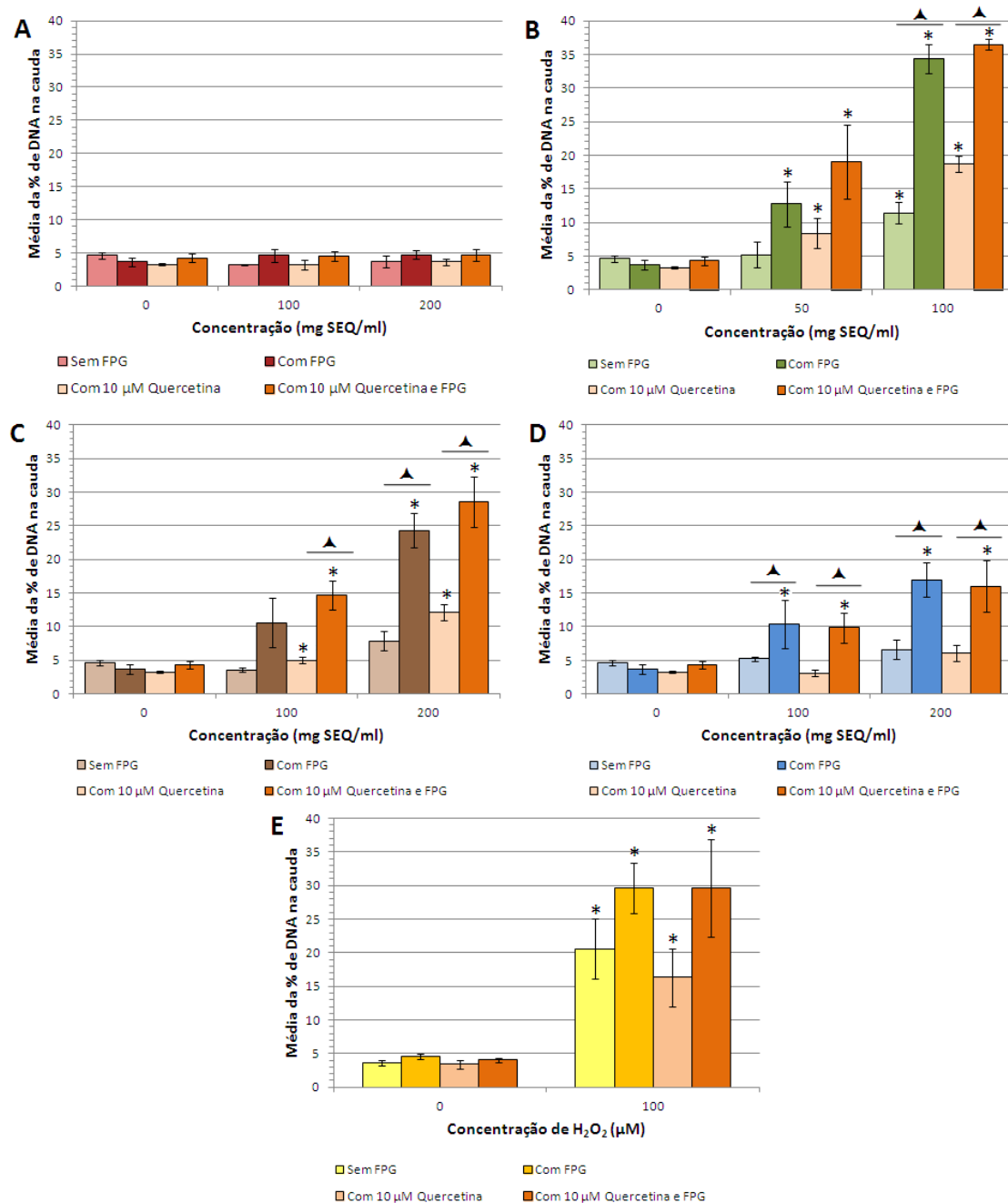


Figura 22 – Resultados do ensaio do cometa em células HepG2 após exposição a quercetina durante 1 h (10 μ M) seguida de co-exposição a quercetina (10 μ M) e diferentes concentrações de amostras de extractos dos vários sedimentos do estuário do Sado durante 48h. A – Amostra C; B – Amostra P; C – Amostra E; D – Amostra A; E – Controlo negativo e positivo das experiências. Os valores apresentados representam o valor médio da percentagem de DNA na cauda (\pm EP) de 3 experiências independentes. A concentração de 0 mg SEQ/ml corresponde a 2 % DMSO para todas as amostras. * - Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controlo do solvente. \blacktriangle - Diferença estatisticamente significativa entre tratamento com e sem FPG, à mesma concentração.

A amostra C não induziu genotoxicidade significativa, com e sem tratamento com FPG, e na presença ou ausência de quercetina, quando comparado com o controlo do solvente (Figura 22A).

Para a amostra P, observou-se um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda com as concentrações de 50 mg SEQ/ml com FPG ($p = 0,016$) e de 100 mg SEQ/ml com e sem FPG ($p < 0,001$ e $p = 0,007$; respectivamente), quando comparado com o controlo do solvente (Figura 22B). Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com e sem FPG para a concentração de 100 mg SEQ/ml de extracto. A co-exposição a quercetina, produziu um padrão semelhante.

A amostra E induziu um aumento significativo na percentagem de DNA na cauda na concentração de 200 mg SEQ/ml, com FPG ($p = 0,001$), quando comparado com o controlo do solvente (Figura 22C). Na presença de quercetina, também se observou um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda.

Após exposição à amostra A, observou-se um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda nas concentrações de 100 e 200 mg SEQ/ml, com FPG ($p = 0,013$ e $0,001$; respectivamente), quando comparado com o controlo do solvente (Figura 22D). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre tratamento com e sem FPG para as concentrações de 100 mg SEQ/ml ($p = 0,030$) e de 200 mg SEQ/ml ($p = 0,019$). A co-exposição a quercetina, produziu um efeito semelhante.

Em cada experiência realizada, expôs-se as células a 30 min de H_2O_2 e quercetina nas mesmas condições que os extractos, para confirmar se havia a redução da percentagem de DNA na cauda (com e sem FPG), como na experiência anterior (Figura 21). O resultado não foi o esperado, pois não se observou uma diminuição da percentagem de DNA na cauda com a exposição à quercetina em comparação com o controlo positivo (Figura 22E). Assim, para verificar o resultado obtido na primeira experiência (Figura 21) repetiu-se mais 2 vezes as mesmas condições experimentais, e os resultados estão apresentados na Figura 23. Após 48,5 h de exposição a quercetina a várias concentrações (5, 10 e 25 μM) seguida de uma co-exposição de 30 min de H_2O_2 com quercetina (às mesmas concentrações) podemos observar que a quercetina causou uma fraca diminuição no nível de danos induzidos no DNA pelo H_2O_2 , e que sozinha não produziu danos no DNA.

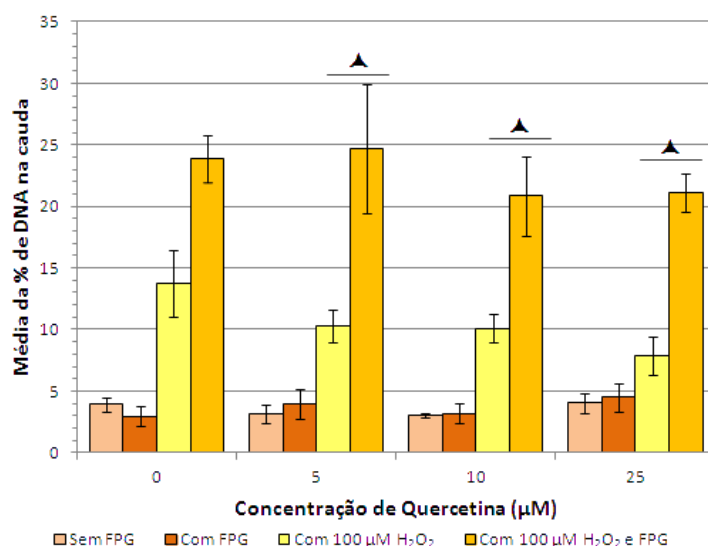


Figura 23 – Resultados do ensaio do cometa em células HepG2 após uma exposição a concentrações diferentes de quercetina, durante 49h (2ª experiência). As células foram pré-expostas a diferentes concentrações de quercetina durante 48,5 h e sofreram mais 30 min de co-exposição a H₂O₂ a 100 µM. Os valores apresentados são o valor médio da percentagem de DNA na cauda (±EP) de 3 experiências independentes. ▲ - Diferença estatisticamente significativa entre tratamento com e sem FPG, à mesma concentração.

1.3. Determinação da concentração de quercetina para uma exposição curta

Face aos resultados descritos anteriormente, numa segunda abordagem, testou-se a citotoxicidade de diferentes concentrações de quercetina (1 a 200 µM) após 1 h de exposição, e testou-se a citotoxicidade de uma exposição a H₂O₂ a 100 µM durante 30 min seguido de uma exposição a quercetina durante 1 h (Figura 24). A exposição das células apenas com quercetina apresentou um aumento significativo da viabilidade celular em relação ao controlo negativo, de 1 a 200 µM ($p = 0,041$ e $0,001$; respectivamente). Após exposição a H₂O₂ e quercetina, não se observou uma diminuição na percentagem da viabilidade celular. O controlo do solvente (0,28 % de DMSO) não induziu citotoxicidade nestas condições experimentais ($102,04 \pm 3,64$ %).

De seguida, realizou-se o ensaio do cometa com uma exposição a quercetina durante 1 h em três concentrações diferentes (100, 150 e 200 µM), após uma exposição a H₂O₂ durante 30 min (Figura 25). Não se observou diferenças significativas para nenhuma das concentrações de quercetina, com ou sem tratamento com FPG, em comparação com a exposição a H₂O₂ durante 30 min seguido de 1 h de meio de tratamento. A exposição a quercetina a diferentes concentrações durante 1 h não induziu genotoxicidade. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento com e sem FPG para a concentração de 100 e 200 µM de quercetina

depois do tratamento com H₂O₂ (p = 0,033; 0,041 e 0,020; respectivamente) e para o H₂O₂ sem quercetina (p = 0,033). Perante os resultados obtidos com o tratamento com a quercetina não se realizaram ensaios de co-exposição com os diversos extractos.

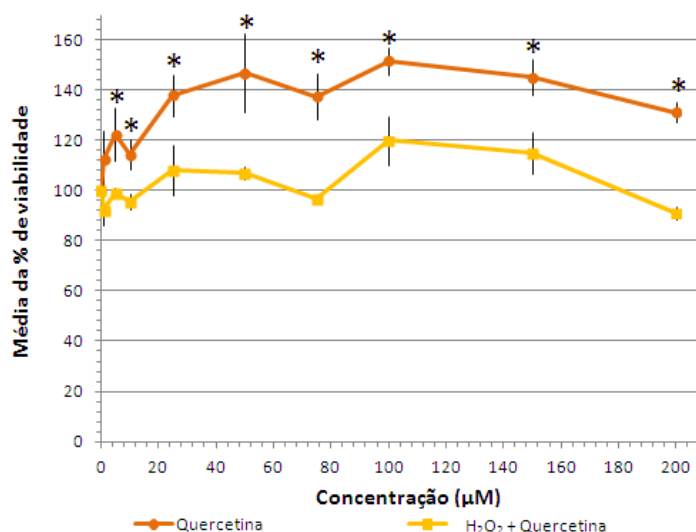


Figura 24 – Resultados do ensaio do vermelho neutro em células HepG2 após uma exposição de ● 1 h de quercetina em concentrações diferentes; e a ■ 30 min de H₂O₂ (100 µM) seguida de uma exposição de 1 h de quercetina as mesmas concentrações. Os resultados apresentados representam o valor médio da percentagem de viabilidade celular (±EP) de 3 experiências independentes. O valor obtido para o controlo positivo de 100 µM de H₂O₂ durante 30 min foi de 98,89 ± 8,68 %. * - Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controlo negativo.

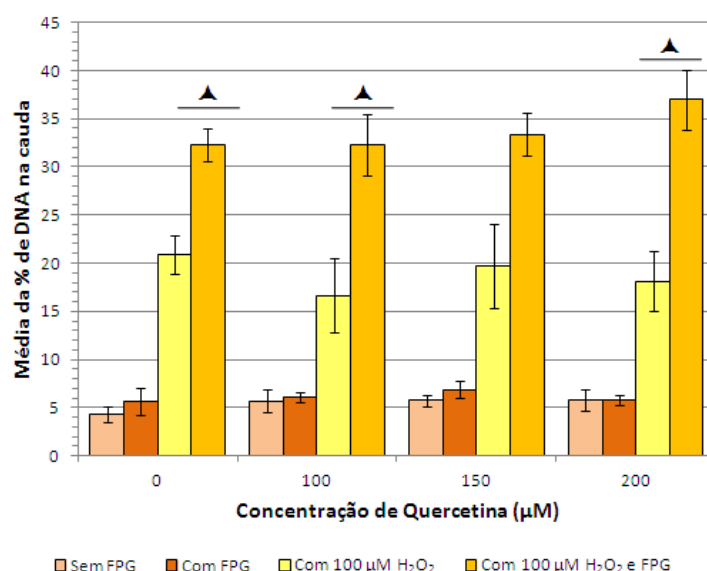


Figura 25 – Resultados do ensaio do cometa em HepG2 após exposição a 30 min de H₂O₂ (100 µM) seguida de 1 h de quercetina a diferentes concentrações. Os valores apresentados representam o valor médio da percentagem de DNA na cauda (±EP) de 3 experiências independentes. O valor obtido para o controlo positivo (H₂O₂, 100 µM, 30 min) foi de 38,28 ± 6,00 e de 59,18 ± 3,16 % sem e com FPG, respectivamente. ▲ - Diferença estatisticamente significativa entre tratamento com e sem FPG, à mesma concentração.

2. Ensaio de genotoxicidade *in vivo*

2.1. Variação do peso e consumo de água ao longo do período de exposição

Ao longo do período de exposição (28 dias), foi observado um aumento do consumo médio diário de água para os 3 grupos de ratinhos (Figura 26). Este aumento foi mais acentuado para o grupo controlo e para o grupo exposto à dose 2. Ao todo, no final da experiência o grupo controlo ingeriu em média $9,9 \pm 1,3$ ml/dia/ratinho, o grupo exposto à dose 1 ingeriu em média $8,8 \pm 1,9$ ml/dia/ratinho, e o grupo exposto à dose 2 ingeriu $10,4 \pm 2,5$ ml/dia/ratinho. Assim, globalmente a média foi de 10 ± 2 ml/dia/ratinho, que foi o valor utilizado para o cálculo das concentrações finais de extracto (Anexo B; Tabela B1).

Na Figura 27 podemos observar a variação do peso médio de um ratinho por grupo de tratamento ao longo das semanas de exposição. Os valores obtidos para as pesagens de cada ratinho ao longo do período de exposição encontram-se apresentados no Anexo B (Tabela B2). Não houve diferenças em relação ao peso entre grupos ao longo do tempo, verificando-se apenas um ligeiro aumento ao longo das semanas, frequente em ratinhos desta idade.

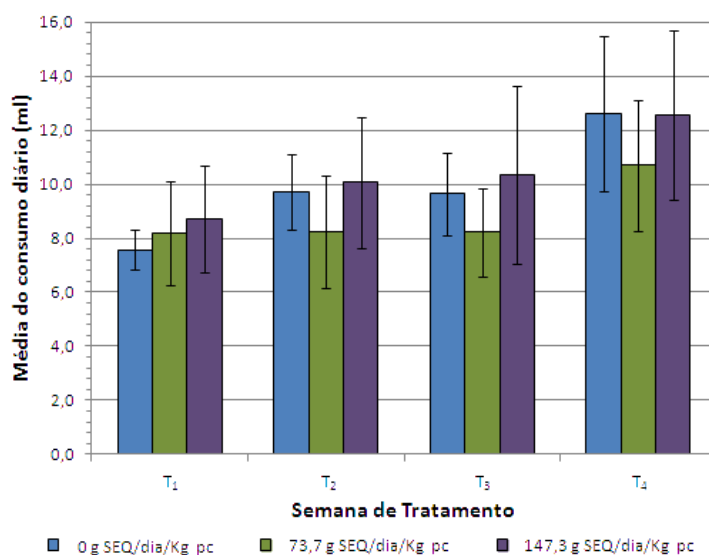


Figura 26 – Consumo médio diário de água de um ratinho por grupo de tratamento, ao longo do tempo de exposição (28 dias). Os valores apresentados são a média do consumo diário de um ratinho (ml/dia) por grupo de tratamento (\pm DP) no final de cada semana até ao sacrifício.

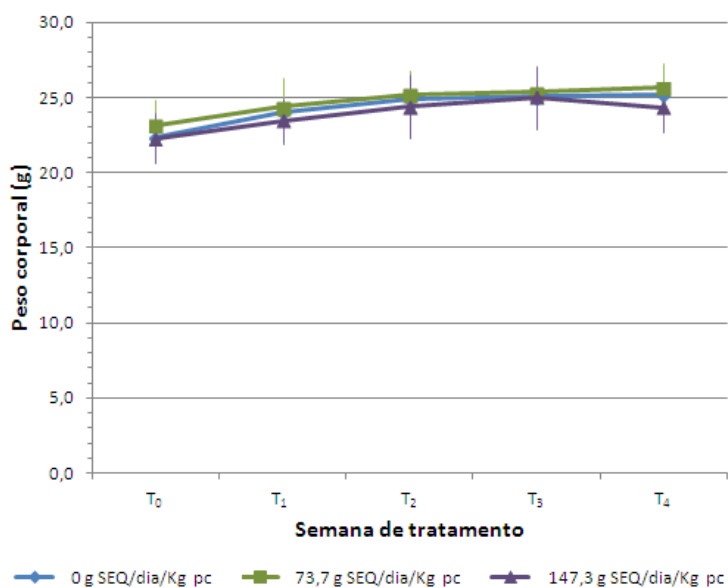


Figura 27 – Peso corporal médio de um ratinho por grupo de tratamento, ao longo do tempo de exposição (28 dias). Os valores apresentados são o valor médio do peso corporal de um ratinho por grupo de tratamento (\pm DP) antes da exposição e no final de cada semana até ao sacrifício.

2.2. Genotoxicidade

2.2.1. Ensaio do Cometa em sangue periférico

No ensaio do cometa em sangue periférico, realizado antes e ao longo do período de exposição ao extracto P (Figura 28), não se observaram diferenças na percentagem de DNA na cauda, com ou sem tratamento enzimático com FPG ou ENDO III, para os dois grupos expostos quando comparados com o grupo controlo em qualquer dos intervalos testado (T₀ a T₄). Os controlos positivos foram assegurados para todos os ensaios através da exposição das lâminas a H₂O₂. Após 5 mM de H₂O₂ os valores médios eram 37,02 \pm 10,42 % sem tratamento enzimático, 51,25 \pm 2,67 % com FPG e 45,33 \pm 8,48 % com ENDO III (T₂ a T₄). O conjunto dos valores experimentais encontra-se apresentado no Anexo B (Tabela B3).

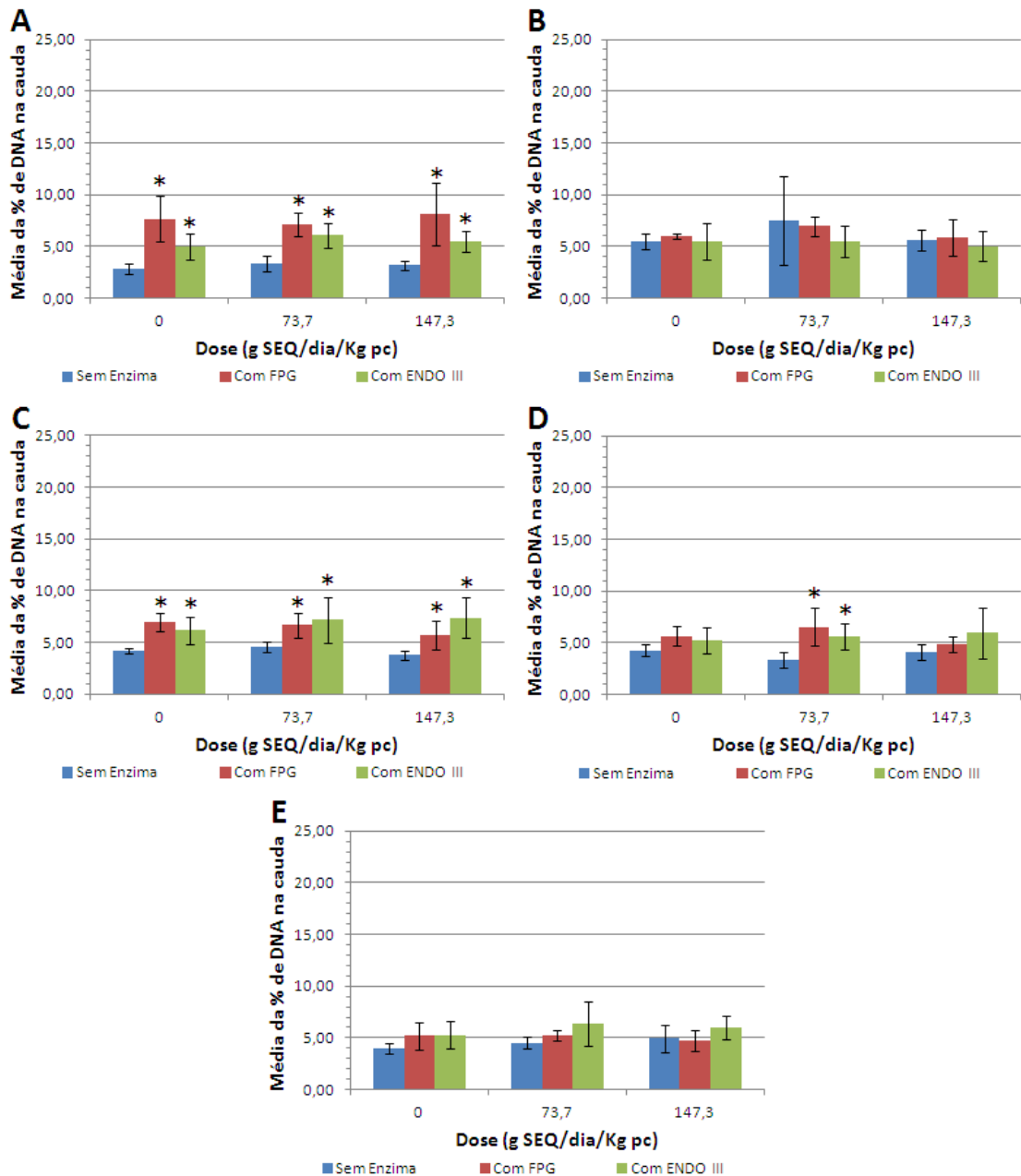


Figura 28 – Resultados do ensaio do cometa em sangue periférico de ratinho, a diferentes intervalos de exposição, para o grupo controlo e os 2 grupos expostos ao extracto de sedimento P do estuário do Sado. A – T₀; antes do início da exposição; B – T₁; final da primeira semana (7^o dia); C – T₂; final da segunda semana (14^o dia); D – T₃; final da terceira semana (21^o dia); E – T₄; fim do tratamento (28^o dia). Os valores apresentados representam o valor médio da % de DNA na cauda (\pm DP) por grupo de tratamento (n = 6). O resultado da média % de DNA na cauda à dose 1 para o tempo de amostragem T₁ possui apenas 4 indivíduos, pois os valores para os indivíduos R9 e R10 não foram determinado. * - Diferença estatisticamente significativa entre os valores de DNA na cauda após tratamento com e sem enzima (FPG ou ENDO III) à mesma dose.

2.2.2. Ensaio do Micronúcleo em sangue periférico de ratinho

Os valores médios de micronúcleo por 1000 reticulócitos no sangue periférico de ratinho obtidos para cada grupo de tratamento, em diferentes intervalos de tempo

durante a exposição, encontram apresentados na Figura 29. Os valores experimentais obtidos encontram-se apresentados no Anexo B (Tabela B4). Para este ensaio, devido ao número reduzido de ratinhos disponíveis, considerou-se como controlo positivo o valor obtido num estudo efectuado anteriormente em que ratinhos tratados com etilnitrosureia (ENU) apresentaram um valor médio de $11,48 \pm 4,06$ micronúcleos por 1000 reticulócitos (Anexo C; Tabela C1).

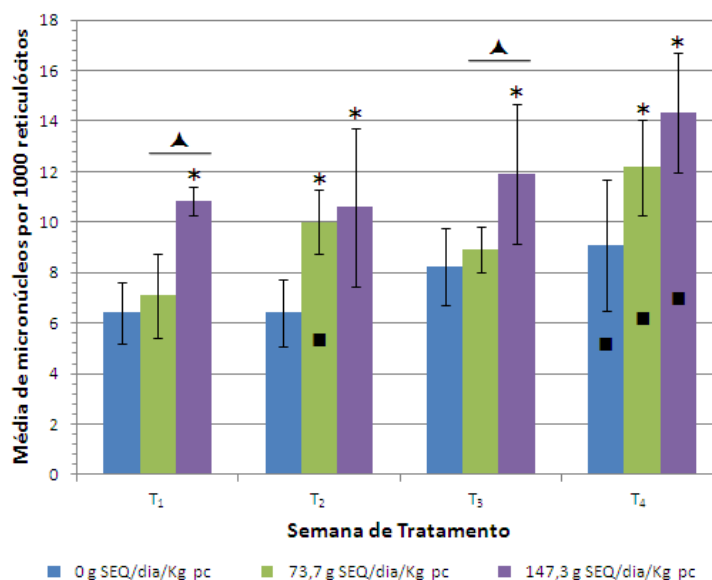


Figura 29 – Resultados do ensaio do Micronúcleo em sangue periférico de ratinho, para grupos de ratinhos expostos a diferentes concentrações do extracto de sedimento P do estuário do Sado, em diferentes tempos de exposição. T₁ – final da primeira semana (7^o dia); T₂ – final da segunda semana (14^o dia); T₃ – final da terceira semana (21^o dia); T₄ – fim do tratamento (28^o dia). Os valores apresentados representam o valor médio de reticulócitos micronucleados por 1000 reticulócitos (\pm DP) por grupo de tratamento (n = 6). * - Diferença estatisticamente significativa entre os valores dos grupos expostos e o grupo controlo, em cada período da exposição analisado. ▲ - Diferença estatisticamente significativa entre os valores dos grupos expostos à dose 1 e à dose 2, na mesma semana. ■ - Diferença estatisticamente significativa entre T₁ e o tempo seguinte, para cada grupo exposto.

Analisando primeiro cada intervalo de exposição testado, ao fim de uma semana de exposição (T₁) observou-se um aumento significativo da média de micronúcleos para o grupo exposto à dose 2 ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controlo e com o grupo exposto à dose 1 ($p < 0,001$ e $p = 0,003$, respectivamente). No final da segunda semana (T₂) observou-se também uma indução significativa de micronúcleos para os grupos expostos em comparação com o grupo controlo ($p = 0,003$ e $p = 0,001$ para a dose 1 e dose 2, respectivamente). Em T₃ a média de micronúcleos era significativamente mais elevada para o grupo exposto à dose 2 em relação ao grupo de controlo, e em relação à dose 1 ($p = 0,005$ e $p = 0,026$; respectivamente). No final da exposição (T₄) observou-se um aumento significativo da

média de micronúcleos, entre o grupo de controlo e as duas doses ($p = 0,023$ e $p < 0,001$; respectivamente).

Quando analisados ao longo do tempo de exposição, comparando com o tempo T_1 , observa-se que:

- i) para o grupo controlo há um aumento significativo da média de micronúcleos ($p = 0,019$) apenas no final do tempo de exposição (T_4);
- ii) para o grupo exposto à dose 1, existe um aumento da média de micronúcleos em T_2 e em T_4 ($p = 0,017$ e $p < 0,001$; respectivamente);
- iii) para o grupo exposto à dose 2, existe um aumento da média de micronúcleos no final do tratamento (T_4) ($p = 0,018$).

Adicionalmente, podemos observar que o grupo exposto à dose 2 já apresenta valores idênticos ao do controlo positivo histórico desde o T_1 .

Como indicador de mielotoxicidade, foram determinadas as proporções de reticulócitos entre o total de eritrócitos. Não se observaram diferenças na percentagem média de reticulócitos em cada grupo de tratamento apresentada ao longo do tempo de exposição, nem entre os grupos de tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 – Média da percentagem de reticulócitos por grupo de tratamento a diferentes tempos de exposição.

Dose (g SEQ/dia/Kg ps)	N	Média da % de Reticulócitos por Eritrócitos (\pm DP)			
		T_1	T_2	T_3	T_4
0	6	7,22 \pm 1,19	6,67 \pm 0,47	6,46 \pm 0,56	6,32 \pm 0,76
73,7	6	7,38 \pm 0,78	7,54 \pm 1,71	7,53 \pm 0,98	7,66 \pm 0,9
147,3	6	8,48 \pm 1,03	8,38 \pm 1,64	7,83 \pm 1,26	7,11 \pm 0,57

DP – Desvio Padrão

Quando comparamos os presentes resultados com resultados histórico obtidos para o controlo negativo, a percentagem de reticulócitos mantém-se nos mesmos valores (Anexo C; Tabela C1). Por sua vez, é estatisticamente diferente do resultado histórico obtido para o controlo positivo de $1,95 \pm 1,01$ % ($p < 0,001$).

2.2.3. Ensaio do cometa em órgãos de ratinho

Os resultados do ensaio do cometa em órgãos de ratinho estão apresentados na Figura 30, onde podemos observar o valor médio da percentagem de DNA na cauda (\pm DP) para cada grupo de exposição, com tratamentos enzimáticos diferentes. Os valores experimentais obtidos para cada ratinho e para cada órgão encontram-se

apresentados no Anexo B (Tabelas B5, B6 e B7). Relativamente aos resultados obtidos para o fígado (Figura 30A), não se observaram diferenças nos danos no DNA nos grupos expostos, em comparação com o grupo controlo, com ou sem tratamentos enzimáticos.

Quanto aos resultados obtidos para o baço (Figura 30B), também não se observaram diferenças na percentagem de DNA na cauda para os grupos expostos em comparação com o grupo controlo, com ou sem tratamentos enzimáticos.

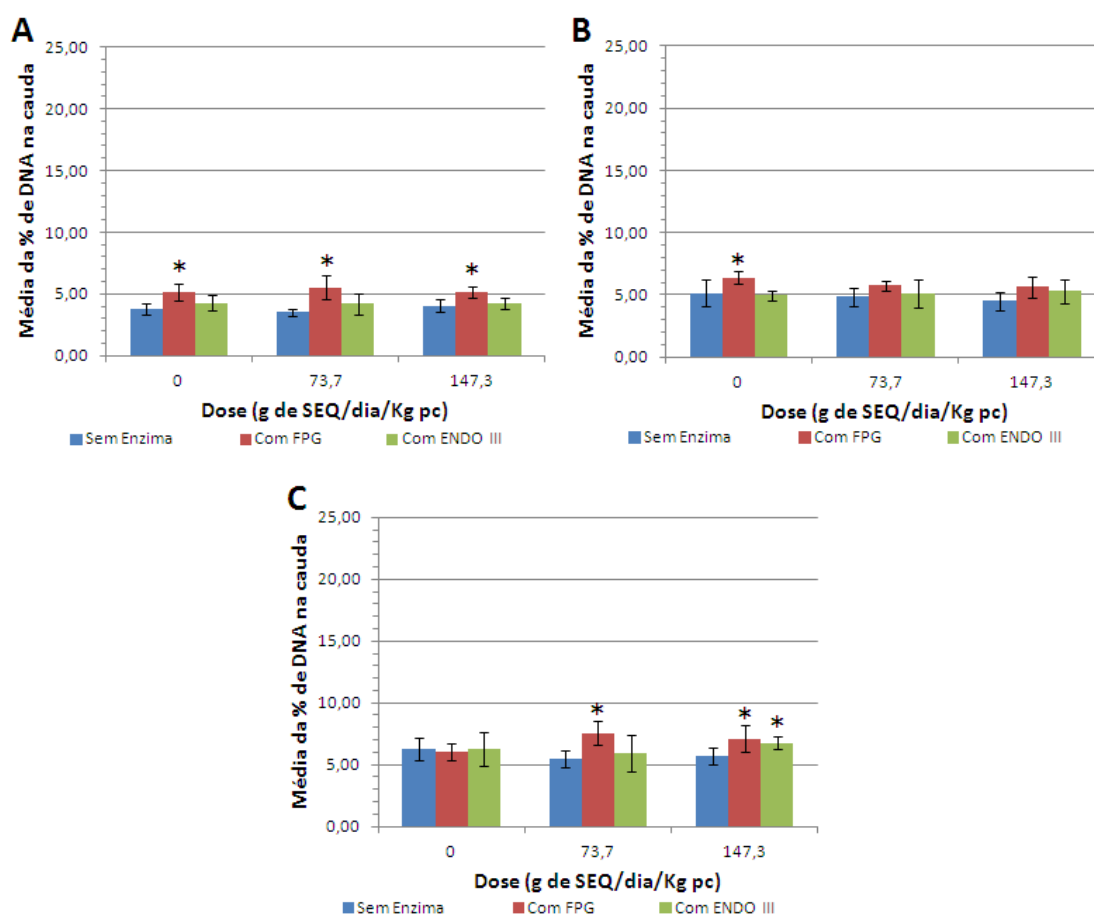


Figura 30 – Resultados do ensaio do cometa em órgãos de ratinho, após exposição de 28 dias a diferentes concentrações do extracto de sedimento P do estuário do Sado. A – Fígado, B – Baço, e C – Rim. Os valores apresentados representam o valor médio da % de DNA na cauda (\pm DP) por grupo de tratamento ($n = 6$). * - Diferença estatisticamente significativa entre os valores de DNA na cauda após tratamento com e sem enzima (FPG ou ENDO III) à mesma dose.

No que diz respeito aos resultados obtidos para o rim (Figura 30C), observou-se um ligeiro aumento de danos no DNA apenas no grupo exposto à dose 1, com o tratamento com FPG ($p = 0,012$), quando comparado com o controlo. Quando existentes, as diferenças devidas à exposição ao sedimento são a níveis muito reduzidos. Os controlos positivos da experiência efectuados para o fígado e para o baço, por exposição das lâminas a 10 mM de H_2O_2 , tiveram resultados diferentes

apesar de terem sido executados no mesmo ensaio. O fígado apresentou valores médios de $6,6 \pm 0,22$ % sem utilização de enzima, $9,57 \pm 1,19$ % com FPG e $7,53 \pm 0,91$ % com ENDO III. O baço apresentou valores médios de $36,1 \pm 6,57$ % sem utilização de enzima, $37,32 \pm 7,06$ % com FPG e $45,85 \pm 1,72$ % e com ENDO III. Não foi efectuado controlo positivo da experiência para células do rim. Um grupo de ratinhos exposto a ENU (controlo positivo) realizado anteriormente apresentaram para o ensaio do cometa em células do fígado danos no DNA estatisticamente diferentes do grupo de controlo negativo (ANEXO C; Tabela C2). Contudo o mesmo não se verificou para as células do baço.

3. Determinação da Frequência de Mutantes em tecidos de órgãos de ratinhos

3.1. Extração de DNA genómico de tecidos

Após a extração do DNA genómico dos fragmentos de fígado e de baço mediu-se a concentração e a pureza para cada amostra, esta última com base na razão entre as absorvâncias a 260 e a 280 nm, que podemos observar na Tabela 4. As amostras de fígado apresentam uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,873 e 1,706 sendo consideradas amostras de elevada pureza. As amostras de DNA do baço por sua vez apresentam uma razão entre 1,728 e 1,461 sendo consideradas amostras de pureza inferior podendo conter ainda alguma percentagem de proteínas. Podemos observar que a concentração de DNA extraído do fígado foi muito superior as concentrações de DNA extraídas do baço.

Em termos de qualidade do DNA genómico extraído podemos observar através da Figura 31 que tanto para as amostras de fígado (Figura 31A) como para o baço (Figura 31B) não existe fragmentação de DNA, tendo sido obtido DNA de elevado peso molecular. No caso do DNA do baço, este revelou-se difícil de dissolver, e a elevada viscosidade da amostra levou a um efeito de retardamento na migração electroforética, visível na Figura 31.

Tabela 4 – Quantificação do DNA genómico extraído dos órgãos dos ratinhos (Fígado e Baço)

Dose (g SEQ/dia/Kg ps)	Ratinho	Fígado		Baço		Poço do Gel
		Razão A_{260}/A_{280}	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Razão A_{260}/A_{280}	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	
0	R1	1,827	2417,7	1,695	499,4	2
	R2	1,768	1234,3	1,614	774,5	3
	R3	1,73	1494,6	1,609	817	4
	R4	1,795	1623,4	1,565	787,6	5
	R5	1,757	1891,2	1,705	248,6	6
	R6	1,806	1536	1,628	738,3	7
73,7	R7	1,706	1521,2	1,676	337,8	8
	R8	1,792	1757,9	1,642	945,9	9
	R9	1,873	4410,4	1,753	260,2	10
	R10	1,792	1172,8	1,676	638,8	11
	R11	1,815	1019,7	1,7	367,7	12
	R12	1,837	1283,7	1,461	1052,6	13
147,3	R13	1,751	1661,4	1,643	474,3	14
	R14	1,774	1352,8	1,787	276,5	15
	R15	1,794	462,7	1,662	522,5	16
	R16	1,754	993,4	1,543	1585,9	17
	R17	1,801	2109,7	1,675	496,2	18
	R18	1,828	2696	1,728	558,7	19

A razão A_{260}/A_{280} é um indicativo da pureza da amostra ($A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ amostra pura; $< 1,8$ contaminação com proteína ou fenol; $\approx 1,5$ mistura de 50 % proteína e 50 % DNA).

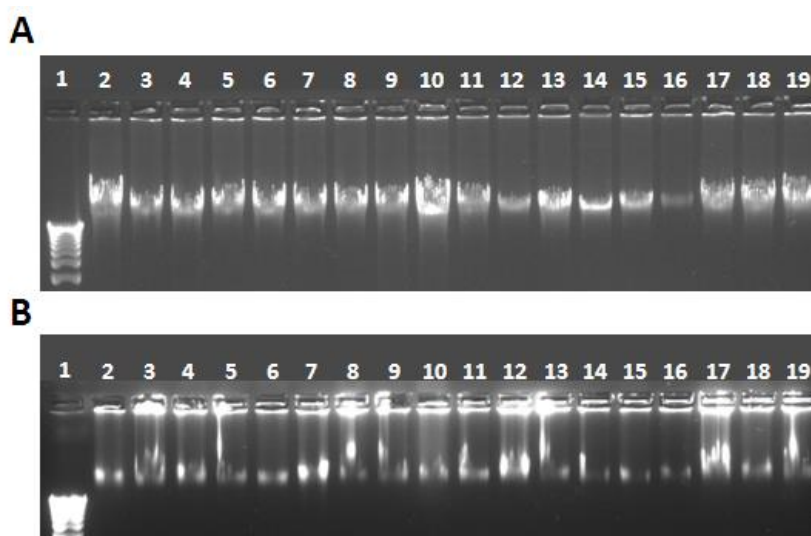


Figura 31 – Controlo da extracção de DNA genómico do A) fígado e B) baço em gel de agarose a 1 %. O poço 1 corresponde ao DNA *ladder*, 1 Kbp. As amostras colocadas em cada poço encontram-se descritas na Tabela 4.

3.2. Análise de mutações no transgene *lacZ*

A primeira experiência para determinação da FM foi realizada utilizando apenas amostras de fígado dos ratinhos do grupo de controlo negativo, R1 e R2, assim como a

amostra N2, já utilizada numa experiência anterior onde tinha resultado numa FM de 8×10^{-5} (Ratinho exposto a solução salina por via intravenosa, controlo).

Durante o procedimento de recuperação do transgene de entre o DNA genómico, no método de determinação da FM, foi realizado o controle da hidrólise com a enzima *HindIII*, através de electroforese em gel de agarose (Figura 32).

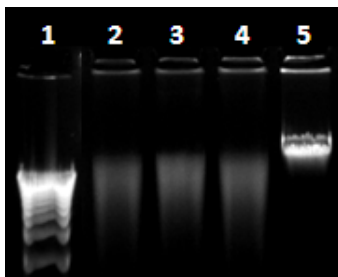


Figura 32 – Controlo da hidrólise do DNA por electroforese em gel de agarose a 1 % (1ª experiência). 1) DNA *ladder* 1 Kbp; 2) Amostra de DNA genómico digerido de fígado de N2; 3) Amostra de DNA genómico digerido de fígado de R1; 4) Amostra de DNA genómico digerido de fígado de R2; 5) DNA genómico não digerido de fígado de R10.

Verificou-se a efectiva fragmentação do DNA genómico após a digestão com *HindIII* nas amostras R1, R2 e N2 quando comparada com a banda única na amostra do DNA genómico que não sofreu digestão (Figura 32; poço 5), demonstrando que a reacção ocorreu com sucesso.

Um outro controlo realizado para o procedimento, consistiu no registo do tempo de electroporação de cada amostra (Tabela 5). O valor do tempo de electroporação entre 4,5 e 4,6, semelhante ao de amostras de água pura, indicou a eficaz transformação celular.

Tabela 5 – Resultados do tempo de Electroporação: tempo que levou a corrente a passar pelas células (1ª experiência).

Ratinho	N2	R1	R2
Tempo de Electroporação	4,6	4,5	4,5

Nesta experiência, as 3 amostras de DNA apresentaram uma FM muito elevada (Tabela 6), muito superior ao esperado, considerando os valores históricos obtidos anteriormente, inferiores a 10×10^{-5} (Louro *et al.*, 2010).

Tabela 6 – Frequência de mutantes (FM) no gene *lacZ* do fígado de ratinhos transgênicos C57BL/6 do grupo controlo (R1 e R2) e de fígado de ratinhos de uma experiência anteriormente realizada (N2).

Diluição de 1:1000				
Ratinho	Total UFC	UFC Mutantes	FM ($\times 10^{-5}$)	Média FM \pm DP ($\times 10^{-5}$)
N2	100000	17	17,00*	-
R1	136000	35	25,74	20,62 \pm 7,23
R2	129000	20	15,50	

*Resultados para o ratinho N2 de um grupo controlo de outra experiência já anteriormente realizada, onde tinha sido observada uma FM = 8×10^{-5} . UFC – Unidades formadoras de colónias; DP – Desvio padrão.

Foi colocada a hipótese de que este valor elevado poderia ser causado por uma actividade inespecífica da enzima *HindIII*, efeito descrito na literatura como “*star activity*”, que produzisse um excesso de mutantes. Para evitar tal artefacto, foi adquirida nova enzima, de um lote distinto e foi repetida a experiência, desta vez para um maior número de amostras.

Assim, a segunda experiência para determinação da FM no fígado dos ratinhos foi realizada utilizando todas as amostras do grupo de controlo e do grupo com a dose mais elevada de extracto P (Dose 2). À semelhança do controlo efectuado anteriormente, foi verificada a fragmentação do DNA genómico após a digestão com *HindIII* (Figura 33) em todas as amostras, por comparação com a amostra do DNA genómico que não sofreu digestão (Figura 33; poço 14).

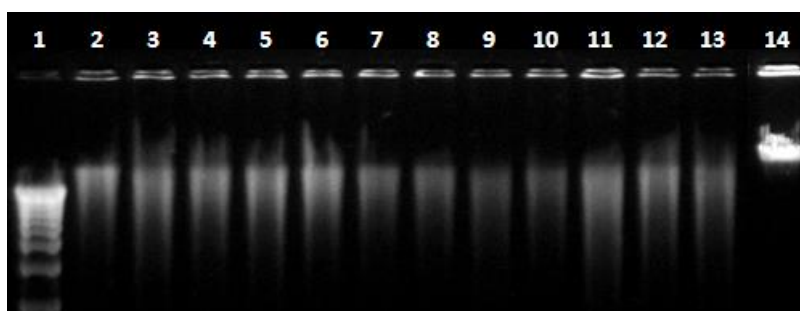


Figura 33 – Controlo da hidrólise do DNA por electroforese em gel de agarose a 1 % (2ª experiência). 1) DNA ladder, 1Kbp; Amostras de DNA genómico digerido de fígado do ratinho: 2) R1; 3) R2; 4) R3; 5) R4; 6) R5; 7) R6; 8) R13; 9) R14; 10) R15; 11) R16; 12) R17; 13) R18; 14) Amostra de DNA genómico não digerido de fígado do ratinho R16.

O controlo realizado através do tempo de electroporação de cada amostra apresenta-se na Tabela 7. Enquanto um valor de 4,5 a 4,6 é o normal, um valor inferior foi obtido para R17 possivelmente devido à presença de iões ou sais em solução que alteram o percurso da corrente eléctrica na solução contendo bactérias e DNA, diminuindo a eficiência da transformação, que se reflectiu nas colónias obtidas.

Tabela 7 – Resultados do tempo de electroporação: tempo que levou a corrente a passar pelas células (2ª experiência).

	Dose (g SEQ/dia/Kg ps)												
	0						147,3						
	Ratinho	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R13	R14	R15	R16	R17	R18
Tempo de Electroporação	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,5	4,5	4,5	4,5	4,6	4,5	3,0	4,5

Os resultados da FM de nesta segunda experiência (valores não apresentados) foram semelhantes aos controlos negativos da primeira experiência, sendo mais elevados que os controlos históricos neste mesmo órgão (Anexo C; Tabela C3), sugerindo que o ensaio ainda não se encontra a funcionar em condições óptimas.

DISCUSSÃO

O estuário do rio Sado é afectado por diversas fontes de poluição, como a indústria pesada e descargas urbanas, actividades agrícolas, de minério e tráfego marítimo. Além disso, o estuário é utilizado para actividades piscatórias abundantes, que são responsáveis por capturar espécies para consumo de elevado valor económico. A contaminação da água e dos sedimentos do estuário pode representar um problema para a saúde pública, para além da preocupação ecológica, uma vez que as espécies estuarinas aí capturadas para consumo podem acumular os contaminantes nas suas partes edíveis, entrando assim na cadeia alimentar humana. Assim, o objectivo principal deste trabalho é contribuir para avaliação do risco para a saúde humana, através da análise dos danos oxidativos causados pelos extractos dos sedimentos do estuário do Sado numa linha celular humana, e a análise dos efeitos genotóxicos destes extractos *in vivo*, utilizando ratinhos transgénicos.

1. Ensaio *in vitro* em células HepG2, e potencial antioxidante da quercetina

A quercetina tem sido testada extensivamente em condições experimentais *in vitro* e *in vivo* de modo a investigar o seu potencial mutagénico e genotóxico (Barcelos *et al.*, 2011b; Alía *et al.*, 2006a; Duthie *et al.*, 1997; Aherne e O'Brien, 1999). A capacidade da quercetina ser citotóxica ou agir como um agente pro-oxidante ou como antioxidante depende da sua concentração (Barcelos *et al.*, 2011b) e do tempo de exposição. Neste contexto, um dos objectivos deste trabalho era o de confirmar que a formação de lesões oxidativas no DNA era um mecanismo envolvido na indução de quebras de DNA pelos diferentes extractos de sedimentos previamente testados. Assim, a hipótese a testar era a de que a quercetina, através da acção antioxidante, tinha capacidade para reduzir os danos genotóxicos (particularmente danos oxidativos no DNA detetados pela enzima FPG acoplada ao ensaio do cometa), causados por 48 h de exposição a extractos do estuário do Sado, numa linha celular humana, a linha HepG2 (Pinto *et al.*, 2014a). Para isso, era necessário em primeiro lugar determinar a concentração de quercetina que não produzisse efeitos citotóxicos e que reduzisse os efeitos genotóxicos de um controlo positivo (H₂O₂) nestas condições, através do ensaio do Cometa. Neste estudo, após uma exposição de 49 h, a quercetina demonstrou

citotoxicidade a partir de uma concentração de 25 μM em células HepG2 (Figura 20). Estes resultados encontram-se em concordância com observações anteriores de outros estudos que também demonstram a capacidade citotóxica da quercetina em HepG2. Ramos *et al.*, (2008) observou que com uma exposição de 24 h e de 72 h, várias concentrações de quercetina provocavam uma redução significativa da viabilidade celular das células HepG2: às 24 h (95,1 %) com uma concentração de 100 μM (concentração mais alta testada) e às 72h a partir de 25 μM (90,5 %). Ramos *et al.*, (2008) também mostrou inibição da proliferação celular dependente da concentração, nomeadamente, uma inibição de 30 e 45 % após exposição de 24h a 25 e 50 μM de quercetina, respectivamente, e uma inibição de 40 e 86 % após 72 h de exposição a 12,5 e 25 μM de quercetina, respectivamente. No entanto, Aherne e O'Brien, (1999) mostraram que a quercetina entre 3 a 200 μM , utilizados durante uma exposição de 24 h, não demonstra efeitos de citotoxicidade em HepG2.

Relativamente à genotoxicidade, estudos anteriores já demonstraram que o H_2O_2 tem a capacidade de induzir quebras na cadeia de DNA dependentes da dose e do tempo de exposição, em células HepG2. Para além disso, também se observou que este composto tem a capacidade de induzir danos oxidativos no DNA, revelados pela presença de sítios sensíveis à FPG e à ENDO III, indicando a presença de purinas e pirimidinas oxidadas, respectivamente (Pinto *et al.*, 2014a; Vicente, 2012; Arranz *et al.*, 2007). Foi sugerido que o H_2O_2 tem um efeito genotóxico devido à criação de radicais hidroxilo ($\text{OH}\bullet$), através da reacção de Fenton, radicais esses que forma aductos com a molécula de DNA (Arranz *et al.*, 2007).

Numa primeira abordagem, face ao danos no DNA causado pelo H_2O_2 (Figura 21), as três concentrações de quercetina testadas (5, 10 e 25 μM) induziram uma redução dos danos no DNA, induzidos pelo H_2O_2 , de 8, 10 e 13 %, respectivamente. Quando aplicado o tratamento enzimático com FPG apenas se observou uma redução nos danos induzidos pelo H_2O_2 nas concentrações de 5 e 10 μM de quercetina (ambas de 11 %). Adicionalmente, os resultados mostram que a quercetina não induziu danos ao nível do DNA, i.e. quebras ou danos oxidativos, nas condições experimentais utilizadas (Figura 21). Face a este resultados, optou-se por utilizar a quercetina na concentração de 10 μM para investigar o seu efeito na redução das lesões oxidativas eventualmente induzidas pela exposição a extractos de sedimentos do Estuário do

Sado, dado que se observou uma redução dos danos ao nível do DNA, tanto com como sem tratamento enzimático.

A exposição de 48 h às duas concentrações testadas dos extractos de sedimentos, induziu padrões de danos no DNA, em células HepG2, semelhantes aos obtidos anteriormente (Pinto *et al.*, 2014a). Todos os extractos, com excepção da amostra C, induziram um aumento dose-dependente da percentagem de DNA na cauda, mais acentuado aquando o tratamento dos nucleóides com FPG. Isto é, tal como foi observado em estudos recentes, os extractos de sedimentos dos diferentes locais em análise, induziram genotoxicidade relacionada com tipo de contaminantes presentes nas amostras, e que reflectem as pressões antropogénicas subjacentes a cada área em estudo (Pinto *et al.*, 2014a; Carreira *et al.*, 2013). Apesar dos sedimentos das duas áreas (área norte industrial e sul rural) conterem metais e contaminantes orgânicos, a maior diferença entre as duas encontra-se na presença de contaminantes orgânicos na área industrial, principalmente os HAPs, com um total de HAPs (tHAP) do sedimento do local P \approx 13 vezes superior ao do sedimento do local E (Tabela 2). É importante realçar que alguns HAPs, especialmente os que possuem 5 e 6 anéis, são genotóxicos e pro-mutagénicos conhecidos, tal como o B[a]P que se encontra quase 21 vezes mais concentrado na amostra do local P do que do local E. Este contaminantes orgânicos, juntamente com a presença de metais, poderão estar, de facto, na origem das quebras e danos oxidativos no DNA observados para a amostra P (Pinto *et al.*, 2014a). Por outro lado, para as amostras A e E, a maioria dos danos na cadeia de DNA são o resultados de danos oxidativos, revelados pela enzima FPG (Figura 22C e 22D). Assim, sugeriu-se que estes efeitos poderiam ser devidos aos efeitos potenciais dos metais na produção de ROS (Pinto *et al.*, 2014a), dado que estudos anteriores já sugeriram que este poderá ser um mecanismo de acção genotóxico comum aos metais (Beyersmann e Hartwig, 2008). Contudo os danos diferenciais observados resultantes da exposição aos diferentes extractos não podem ser apenas explicados devido às concentrações de contaminantes presentes, uma vez que as concentrações de metais nos extractos E e A são semelhantes às do extracto P, o que leva a sugerir que estes efeitos poderão ser devidos a interacções entre contaminantes de uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos nos sedimentos (Pinto *et al.*, 2014a). As baixas concentrações de uma mistura de xenobióticos indutores de ROS é

possivelmente responsável pelos danos oxidativos no DNA (principalmente bases oxidadas) em vez das outras formas de lesões que são detectadas através do ensaio do cometa sem tratamento com FPG, como quebras de cadeia simples ou dupla. Sugeriu-se então que os extractos dos sedimentos A e E poderiam provocar danos primários no DNA reparáveis, ao contrário da instabilidade cromossómica que é permanente (Pinto *et al.*, 2014a). Para além disso, de acordo com os resultados actuais, após a avaliação das amêijoas colhidas na área sul do estuário do Sado (de onde os sedimentos foram colhidos), foi reportado uma elevada actividade de catalase e peroxidação lipídica, confirmando assim o aumento da produção de ROS *in vivo* (Carreira *et al.*, 2013).

Neste contexto, e considerando o efeito antioxidante descrito para a quercetina, seria esperado uma redução dos níveis de danos no DNA, em particular os danos revelados pela enzima FPG, induzidos pelos diferentes extractos de sedimentos. No entanto, quando as células foram expostas à quercetina, não se observou qualquer diminuição nos danos ao nível do DNA induzidos por cada um dos extractos testados, com ou sem tratamento enzimático com FPG (Figura 22). A diminuição dos danos induzidos pelo H₂O₂ observada anteriormente (Figura 21) não se verificou nos ensaios com os extractos (Figura 22), i.e. não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as células tratadas com apenas H₂O₂ e aquelas com uma pré-exposição a quercetina e co-exposição com H₂O₂. Sem este controlo, e face os resultados semelhantes para a exposição aos extractos com ou sem quercetina, não é possível confirmar algum efeito antimutagénico por parte da quercetina. Assim, para verificar os resultados obtidos na primeira experiência (Figura 21) reproduziu-se as mesmas condições experimentais em triplicado. Contudo não houve diminuição dos danos no DNA provocados pela H₂O₂ a qualquer das concentrações de quercetina testadas (Figura 23), como apurado nos ensaios com os extractos. Existe uma lacuna no conhecimento quanto à utilização da quercetina e H₂O₂ em testes de genotoxicidade por mais de 24 h de exposição. Contudo em condições semelhantes, com a excepção do tempo de exposição, já foi possível observar o potencial da quercetina para reduzir os danos oxidativos, tanto como agente antioxidante através de *scavenging* de radicais livres como as ROS, assim como quelante de iões metálicos e modelador de respostas antioxidantes celulares (Barcelos *et al.*, 2011a; Barcelos *et al.*, 2011b; Noroozi *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2008; Aherne e O'Brien, 2000a).

Assim, sugere-se que a estabilidade da quercetina durante as 48 h de exposição, em meio de cultura, poderá estar comprometida. De facto, outros estudos já demonstraram a estabilidade da quercetina, a uma concentração de 5 μM , em urina humana à temperatura ambiente, e em urina humana, plasma humano, acetonitrilo e água a 4 °C, -20 °C e -80 °C (Moon *et al.*, 2008). Contudo, a quercetina foi apenas estável por curtos períodos à temperatura ambiente em plasma humano, acetonitrilo e água. A primeira constante de degradação foi de 0,03/h em plasma humano, 0,006/h em acetonitrilo e 0,03/h em água, o que representa uma semi-vida à temperatura ambiente de 23,1 h. Esta instabilidade da quercetina em condições básicas é provavelmente devido à instabilidade do anel central na estrutura da quercetina, e resultante fragmentação do anel (Moon *et al.*, 2008). À temperatura ambiente, a estabilidade da quercetina em água é reduzida, de forma que 50 % a 20 % da quercetina é degradada nas primeiras 25 h a um pH de 7 e 2,7, respectivamente (Quercegen Pharma LLC, 2010).

Vários estudos utilizaram diferentes protocolos de tratamento para tentar identificar o mecanismo pelo qual a quercetina actua. Barcelos *et al.*, (2011a) observou efeitos protectores para o DNA (tanto no ensaio do cometa, como através da detecção de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) por HPLC), em células HepG2 expostas a quercetina (1 e 5 μM) e metais (HgCl_2 e MeHg) em simultâneo, e com uma pré-exposição, durante 24h. Contudo nenhuma reversão de danos genotóxicos foi observada para o protocolo de pós-exposição a quercetina, nas mesmas condições, daí a escolha das condições experimentais descritas anteriormente para a exposição aos extractos. Contudo, face aos resultados, e ao possível período curto de estabilidade da quercetina, reduziu-se, posteriormente, o tempo de tratamento com quercetina. Nos resultados de citotoxicidade em células HepG2 após uma exposição de 1 h a várias concentrações de quercetina (1 a 200 μM), observou-se um aumento significativo da viabilidade celular a todas as concentrações testadas (Figura 24). Aquando as mesmas condições experimentais, mas com uma exposição prévia de 30 min a H_2O_2 , também não se observou citotoxicidade. No entanto, as concentrações de quercetina determinadas (100, 150 e 200 μM) para utilizar em ensaios de genotoxicidade também não revelaram diminuição nos danos induzidos pelo H_2O_2 , após uma exposição de 30 min, seguido de 1 h exposição a quercetina, em comparação com os danos induzidos

pelo H₂O₂ com tempo de recuperação de 1 h em apenas em meio de cultura (Figura 25). Barcelos *et al.*, (2011b) revelou que uma exposição de 2 h de quercetina (0,1; 1,0 e 5,0 µg/ml de quercetina extraída da planta *Dimorphandra mollis*, que corresponde a 0,30; 2,96 e 14,78 µM) reduz os danos no DNA nas células HepG2 tratadas com aflatoxina B1 (AFB1) ou metanosulfonato de metilo (MMS) durante 2 h, tanto para um pré-tratamento, em simultâneo ou um pós-tratamento, excepto o MMS para durante o pós-tratamento. Com estes resultados Barcelos *et al.*, (2011b) sugeriu que, nestas condições testadas, a quercetina actuaria tanto como uma agente desmutagénico (i.e. actuando directamente no agente mutagénico, ou nos seus percursores, e inactivando-os), ou como agentes bioantimutagenico, i.e. actuando no processo de mutagénese ou na reparação dos danos no DNA. Contudo, não foi possível observar estes efeitos, nas condições experimentais que testámos.

Aherne e O'Brien, (2000a), para avaliar as quebras no DNA no início (0 h) e no fim (48 h) para cada experiência de reparação com o ensaio do cometa, observou, nos controlos negativos, que ao longo do período de 48 h houve um aumento ligeiro nos danos no DNA em células HepG2. Isto poderá ser devido ao desenvolvimento de um ambiente hiperóxido como sugerido por Collins *et al.*, (1997), que também observou um pequeno mas consistente aumento nos danos no DNA em células não tratadas ao longo das experiências de reparação. Collins e Horvathova, (2001) descobriram que linfócitos não tratados acumulavam quantidades substanciais de DNA danificado durante a incubação, presumidamente como resultado de exposição a oxigénio atmosférico. Este mesmo aumento também foi observado em linfócitos não tratados ao fim de 24 h, e em linfócitos após aplicação de um suplemento de carotenóides para reparação das quebras induzidas pelo H₂O₂, que poderá ser confundida com esta adição de danos dependentes do oxigénio, i.e. poderá ser simplesmente um efeito antioxidante, representando uma supressão dos danos adicionais induzidos pelo oxigénio atmosférico, do que uma reparação do DNA (Torbergsen e Collins, 2000). Aherne e O'Brien, (1999) observaram que os flavonóides não conseguiam reverter os danos no DNA induzidos por H₂O₂ para valores de controlo. Isto pode estar relacionado com um tempo de pré-incubação demasiado longo ou com o metabolismo dos flavonóides em formas menos eficazes (Duthie *et al.*, 1997).

Não obstante, observou-se novamente que células HepG2 expostas aos extractos obtidos de sedimentos de áreas com diferentes pressões antropogénicas, i.e. diferentes perfis de contaminação, induzem efeitos distintos ao nível do DNA. Para além disso, ensaios preliminares de citotoxicidade (resultados não apresentados) mostram que estes extractos poderão ter efeitos adversos na linha celular HepG2 após uma exposição de apenas 3 h, que por sua vez também poderão ser distintos entre amostras. De facto, foi observado uma redução da viabilidade celular após exposição aos extractos P, E e A, o que poderá indicar que os efeitos genotóxicos destas amostras também terão de ser estudados para uma exposição curta. Esta observação reforça o potencial risco da exposição a sedimentos de uma área industrial e, portando, de misturas que contêm pro-mutagénicos, como HAPs de peso molecular elevado, e de uma área rural/fluvial, particularmente uma mistura enriquecida em contaminantes metálicos, mesmo que presentes nos sedimentos a concentrações consideradas de baixo a moderado risco, ao contrastar com directrizes padronizadas inferidas a partir da análise convencional de organismos (Costa *et al.*, 2012; Carreira *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2014a). Destes dados, duas conclusões podem ser extraídas: i) independentemente dos perfis de contaminação dos sedimentos estuarinos, esta mistura complexa de poluentes, compatíveis com impactos urbanos, industriais ou rurais, é genotóxica para uma linha hepatocelular humana, o que pode implicar um potencial risco para a saúde humana; e ii) ensaios com extractos de sedimentos podem constituir uma linha de evidência com peso suficiente para avaliação de risco ecológico com potenciais implicações para a saúde humana (Pinto *et al.*, 2014a; Pinto *et al.*, 2014b).

2. Ensaios *in vivo*

Dados anteriores de cito- e genotoxicidade *in vitro*, numa linha celular humana, após exposição a extractos de sedimentos do estuário do Sado (Pinto *et al.*, 2014a), levaram-nos a questionar se esse mesmo potencial se confirmará num organismo vivo em que toda a complexidade de sistemas e órgãos está funcional. Adicionalmente, estudos anteriores e recentes de genotoxicidade, histopatologia e biomarcadores bioquímicos *in vivo* em bivalves (amêijoas expostas aos sedimentos P e E) e também em peixes (linguados, expostos aos sedimentos P, A e E) capturados nos locais de

pesca do estuário (Carreira *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2013), também demonstraram efeitos adversos após exposição a sedimentos estuarinos contaminados do Estuário do Sado. Perante estes resultados, conjuntamente com o conhecimento de que estas espécies estuarinas são consumidas frequentemente pelas populações locais, surge a importância de estudar os potenciais efeitos genotóxicos e mutagénicos *in vivo* em mamíferos, após a exposição ao sedimento P (que demonstrou ser o mais genotóxico *in vitro* (Pinto *et al.*, 2014a), afim de poder inferir sobre as possíveis implicações destes efeitos para a saúde humana.

Relativamente às condições experimentais utilizadas, observou-se que o consumo de água com extracto ou com DMSO foi aumentando ao longo das semanas de tratamento, chegando no final a uma média de 10 ml/dia/ratinho ao contrário do valor de 6 ml/dia/ratinho estimado inicialmente. Como consequência, as doses administradas foram superiores em relação aos valores calculados inicialmente. Assim, as doses final de extracto foram determinadas como correspondendo a 73,7 e 147,3 g de SEQ/dia/Kg pc (dose 1 e dose 2, respectivamente); o grupo controlo foi exposto a 0,33 ml de DMSO/dia. Não se observaram diferenças entre o peso corporal médio de cada grupo, nem entre grupos ao longo do tempo de exposição indiciando que não ocorreu uma toxicidade geral associada ao tratamento.

Quanto à caracterização da genotoxicidade *in vivo*, nomeadamente a análise de danos ao nível cromossómico, a frequência de micronúcleos por 1000 reticulócitos do sangue periférico sofreu um aumento significativo no grupo de ratinhos exposto à dose mais elevada de extracto, em relação ao grupo controlo. Este aumento foi observado logo no final da 1ª semana de exposição, e manteve-se ao longo de todo o período de exposição (Figura 29). Observou-se também uma indução significativa de micronúcleos para o grupo exposto à dose mais baixa, em comparação com o grupo controlo, mas apenas ao fim de 14 e 28 dias. Adicionalmente, observou-se uma diferença significativa na frequência de micronúcleos no final da exposição em comparação com a primeira semana para todos os grupos em estudo (incluindo o grupo controlo), sugerindo um ligeiro aumento ao longo do tempo. Ainda assim, os valores obtidos para o controlo negativo em T₄ ainda se situam dentro do intervalo de valores normais, anteriormente descrito para o mesmo ratinho (Louro e Silva, 2011; Louro *et al.*, 2010). Efectivamente, o aumento de micronúcleos ao longo do tempo foi

mais pronunciado para os dois grupos de ratinhos expostos ao sedimento. Por outro lado, a proporção de reticulócitos relativamente a eritrócitos não apresentou diferenças entre os grupos controlo e tratados, nem ao longo do tempo, indicando que não houve indução de mielotoxicidade devido à ingestão do extracto (Tabela 3).

Os resultados positivos do ensaio do micronúcleo indicam que os contaminantes existentes no extracto atingiram a medula óssea e induziram danos permanentes nos cromossomas, isto é, quebras ou perda de cromossomas, no processo de mitose dos eritroblastos de ratinho (Hayashi *et al.*, 2000).

No entanto, relativamente à análise de danos ao nível do DNA pelo ensaio do cometa em células do sangue periférico, não se observou uma indução significativa de quebras ou danos oxidativos (revelados pela FPG e ENDO III) nos grupos expostos ao extracto, em cada um dos intervalos de tempo testado (T_0 a T_4) em comparação com o grupo controlo, e ao longo do tempo de exposição (Figura 28). Adicionalmente, no final do período de exposição (28 dias), não se observaram danos no DNA das células do fígado, baço e rim dos animais expostos, em comparação com os do grupo controlo, através do ensaio do cometa com ou sem tratamentos enzimáticos (Figura 30). Este resultado negativo indica que, nas condições experimentais utilizadas, o extracto não induziu quebras de cadeia dupla ou simples no DNA ou locais lábeis às bases observados através do ensaio do cometa *in vivo* nos tecidos avaliados.

Estudos anteriores descreveram também uma indução da frequência de micronúcleos, dependente da dose, em células HepG2 expostas a este mesmo extracto de sedimento, o que mostra o potencial para induzir instabilidade cromossómica (Pinto *et al.*, 2014a). Aqui, foi possível observar também uma indução de danos ao nível cromossómico mas num organismo completo. A genotoxicidade ao nível cromossómico, ao contrário das quebras simples ou duplas na cadeia de DNA, reflecte-se em alterações mais estáveis ao longo do ciclo celular, que são transmitidas às células filhas. Em amostras de sedimentos provenientes do estuário do Sado, semelhantes à amostra P aqui testada, Costa *et al.*, (2008) observou também um aumento da percentagem de ENA e da percentagem de quebras na cadeia de DNA com o ensaio do cometa, no sangue periférico de linguados, após uma exposição ao sedimento de 28 dias.

Apesar da genotoxicidade dos contaminantes no sedimento do estuário do Sado já ter sido observada em outros estudos *in vitro* ou *in vivo*, esta pode variar consoante as concentrações usadas, as vias e o tempo de exposição. Neste estudo a amostra de sedimento P utilizada tinha sido anteriormente caracterizada em relação a metais e MO (por exemplo, HAPs). Por essa razão podemos apenas construir hipóteses de quais os contaminantes que podem induzir os efeitos genotóxicos observados ou até mesmo possíveis interações entre eles próprios pois o efeito de uma mistura complexa de contaminantes pode ser influenciado por interações de tipo antagonístico ou sinérgico. Os HAPs e os seus metabolitos indutores de ROS podem entrar na circulação sanguínea e afectar células de sangue e órgãos hematopoéticos, por exemplo, ao induzir directamente quebras na cadeia de DNA e a formação de aductos no DNA. Por esta razão, a investigação em sangue periférico e medula óssea é de grande relevância. Além disso, é provável que o sangue seja rapidamente afectado pela acção directa dos contaminantes uma vez que é o principal transportador dos xenobióticos. Efeitos genotóxicos ao nível dos cromossomas já foram observados após a exposição a metais e metalóides, como por exemplo o arsénio (presente na amostra de sedimento testado), que podem actuar como agentes aneugénicos a doses baixas mas também clastogénicos a doses altas, potenciando assim a formação de micronúcleos e outras anomalias nucleares (Rossman, 2003; Beyersmann e Hartwig, 2008). Celik *et al.*, (2005) mostraram uma redução do número de PCEs no sangue periférico de ratinhos tratados com acetato de chumbo e um aumento da frequência de reticulócitos micronucleados. A indução de micronúcleos pelo chumbo pode ser devida à sua capacidade de interferir com o mecanismo de divisão celular, conduzindo à formação de células com um número anormal de cromossomas (Johnson, 1998). Bonacker *et al.*, (2005) sugere que a maioria dos micronúcleos induzidos por iões de chumbo estão associados a processos que envolvem ROS. Os mesmos mecanismos parecem também contribuir para a indução de micronúcleos pelo próprio chumbo (Fracasso *et al.*, 2002), também presente na amostra de sedimento testada, com valores superiores ao TEL.

Os iões metálicos como o Cd, o As, o Pb e o Cu são fortes indutores de ENA, bem conhecidos e há muito estabelecidos para testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* (Ayllon e Garcia-Vazquez, 2000; Çavaş *et al.*, 2005; Gebel, 2001; Palus *et al.*, 2003).

Porém, os mecanismos de genotoxicidade para a formação de ENA como resultado de uma exposição a metais ainda não são completamente compreendidos e podem variar com diferentes metais. A possibilidade de existência de interações entre os contaminantes orgânicos e metálicos que contribuam para anomalias cromossômicas não está esclarecida, mas descobertas recentes sugerem que indução de micronúcleos mediados por B[a]P em medula óssea de ratinhos pode ser aumentada através da exposição simultânea a As mas não a Cd (Lewińska *et al.*, 2007).

Também já foram relatados em estudos anteriores, interações antagonistas entre HAPs e metais, como o resultado da inibição do citocromo P450 por metais (CYP1A - mediador de activação de HAP) (Vakharia *et al.*, 2001; Spink *et al.*, 2002). Uma vez que os HAPs têm baixa solubilidade na água, as células promovem a sua detoxificação através da activação destes compostos convertendo-os num composto mais solúvel e altamente reactivo, HAP-quinonas e altamente genotóxico HAP diol-epóxidos, com produção de ROS (Lemaire e Livingstone, 1997). Apesar do fígado nos vertebrados ser o órgão principal onde os xenobióticos são metabolizados, os ROS e outras substâncias mutagénicas podem ser distribuídas através do sangue periférico e afectar as células do sangue e os tecidos hematopoiéticos. Em contraste, a inibição da actividade da CYP1A pode reduzir a mutagenicidade através da redução da libertação dos compostos genotóxicos para a corrente sanguínea. Efeitos clastogénicos ao nível do cromossoma têm sido também relacionados com a formação de ROS (Soto-Reyes *et al.*, 2005).

Também deve ser considerado que existe evidência que muitos dos metais que foram detectados na amostra de sedimento são genotóxicos conhecidos, apesar do mecanismo de indução de mutagenicidade dos metais não ser ainda muito bem compreendido. Ao contrário dos HAPs activados que podem reagir com o DNA directamente, o efeito dos metais é mais indirecto, através por exemplo de um metabolismo oxidativo desequilibrado e inibição da reparação do DNA. Este aspecto foi demonstrado para o As, Cd, Co, Cr, Ni e Pb (Hartwig, 1995) e para a espécie orgânica ou inorgânica de Hg (Crespo-López *et al.*, 2009).

Relativamente ao ensaio do cometa, este mostrou-se anteriormente exequível em múltiplos órgãos de ratinhos tratados com diferentes químicos e aparenta ser um método simples e eficiente para detecção de danos no DNA das células com ou sem

capacidade de divisão celular (Kushwaha *et al.*, 2010). O tempo de desnaturação do DNA e de electroforese são específicos e deve ser padronizado em cada laboratório de forma a obter, valores de parâmetros, como a percentagem de DNA na cauda, que devem cair dentro do intervalo de valores controlo históricos, que devem ser apresentados (EFSA, 2012). No caso presente, verificou-se que o controlo positivo do ensaios do cometa no fígado não causou o aumento de percentagem de DNA na cauda esperado embora esse controlo tenha funcionado adequadamente para as células do baço. Por esta razão será necessário mais experiências para averiguar se os parâmetros utilizados no ensaio do cometa para estes tecidos é o mais correcto.

Anteriormente já tinham sido descritas por outros autores discordâncias no resultado do ensaio do micronúcleo e do cometa (Valentin-Severin *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2001). O ensaio do cometa é referido como sensível e específico, e daí não ser expectável que uma ausência de resultados positivos no ensaio do cometa possa reflectir uma sensibilidade menor em comparação com o ensaio do micronúcleo (Hartmann *et al.*, 2001). As diferenças no resultado do ensaio do micronúcleo e do cometa podem reflectir a diferença entre o tipo de lesões no DNA que cada um detecta e entre o grau de exposição e sensibilidade dos vários órgãos analisados. Enquanto o ensaio do cometa detecta lesões primárias no DNA que podem ser reparadas, o ensaio do micronúcleo detecta lesões irreparáveis no DNA após a sua fixação em mutações cromossómicas ou efeitos aneugénicos, que se manifestam como perda total ou parcial de cromossomas. Por outro lado, compostos que induzem a formação de ligações cruzadas (“crosslinks”) DNA-DNA ou DNA-proteínas, que retardam a migração do DNA, poderão não ser facilmente detectados através do ensaio do cometa tal como foi realizado. Nesses casos, a diminuição da migração do DNA devido a ligações cruzadas DNA-proteínas podem ser detectada através da modificação do protocolo do ensaio do cometa, de acordo com o descrito por Vasquez e Tice, (1997). Alternativamente, se os contaminantes atuarem predominantemente por um mecanismo de aneugénese (embora existam poucos agentes químicos nessas condições) e não de clastogénese, os resultados negativos do ensaio do cometa seriam expectáveis, uma vez que o ensaio não detecta aneuploidia, ao contrário do ensaio do micronúcleo (Hartmann *et al.*, 2001).

Uma outra razão para uma maior proporção de resultados positivos no ensaio do micronúcleo quando comparado com o ensaio do cometa pode ser a influência da citotoxicidade nos resultados (Hartmann *et al.*, 2001). Mesmo em concentrações elevadas de citotoxicidade, os compostos testados por Hartmann *et al.*, (2001) não resultaram em efeitos positivos, isto é, um aumento da migração do DNA. O facto de não haver resultados positivos no ensaio do cometa pode ser devido às células afectadas poderem ter entrado em apoptose e por essa razão não são detectadas no ensaio do cometa, provocando resultados falsamente negativos. No geral, o tipo e a capacidade de reparação das células alvo utilizadas, a fase do ciclo celular, a natureza do estudo genotóxico e a duração entre a exposição e a análise, vão contribuir para as diferenças na sensibilidade entre o ensaio do micronúcleo e do cometa (Valentin-Severin *et al.*, 2003). É claro que não existe nenhum teste que seja capaz de detectar todos os agentes genotóxicos relevantes sozinho, pelo que a abordagem usual é a realização de vários testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a genotoxicidade (Sasaki *et al.*, 2000). Contudo o micronúcleo e outras anomalias nucleares são biomarcadores de eventos genotóxicos e manifestações de instabilidade cromossómica que são normalmente relacionadas com cancro (Bonassi *et al.*, 2011). Bonassi *et al.*, (2011) demonstrou que a frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico é preditivo de risco de cancro, o que sugere que a formação de micronúcleo é associada a eventos iniciais de carcinogénese.

A complexidade da mistura de contaminantes no sedimento e o efeito das interacções dos xenobióticos precisam ainda de muita investigação, principalmente quando as substâncias tóxicas não estão presentes em grandes quantidades de forma a obter diferenças óbvias de efeitos adversos para os organismos.

Para avaliar a mutagenicidade do extracto P, recorreu-se ao ensaio de mutações em ratinhos transgénicos contendo o gene *lacZ*. Os ensaios com ratinhos transgénicos permitem determinar a frequência de mutações após a exposição a doses de agentes químicos, físicos ou biológicos, em vários órgãos dos animais expostos a esses agentes. Assim, procurou analisar-se a FM no fígado de ratinhos transgénicos expostos a duas doses do extracto P por comparação com um grupo controlo negativo exposto apenas ao solvente. Nos primeiros ensaios para a determinação da FM, utilizou-se apenas ratinhos do grupo controlo. Os resultados da FM no grupo de

ratinhos de controlo indicavam valores muito elevados, comparativamente aos resultados já obtidos no laboratório para o mesmo ensaio (Louro *et al.*, 2002; Louro *et al.*, 2008; Louro *et al.*, 2010). Também os valores descritos na literatura, para o gene *lacZ* no fígado, reportam um nível de FM muito inferior aos aqui observados, i.e. de $6,82 \pm 0,15$ para o grupo controlo (DMSO por injeção) (Dollé *et al.*, 1996). No entanto, os controlos do procedimento de determinação de FM, i.e., o controlo da hidrólise do DNA genómico com a *HindIII*, assim como o tempo de electroporação não indiciavam problemas experimentais nestes aspectos.

Anteriormente, Lourenço (1997) também observou FM altas para o grupo controlo (DMSO) de $32,8 \pm 8,3$ e após caracterização dos mutantes obtidos, a amplificação do gene *lacZ* revelou a existência de deleções nos plasmídeos mutados. A origem destes mutantes excessivos pode ser explicada por Dollé *et al.*, (1999b), que refere que a maior fonte de artefactos no modelo de plasmídeo *lacZ* consiste num *background* estável de mutantes provocados por uma actividade inespecífica da enzima *HindIII* (*star activity*), que ocorre com uma frequência de $1,1 \times 10^{-5}$. Não obstante, os mutantes originados por *star activity* da *HindIII* podem ser reconhecidos através do comprimento característico dos fragmentos da restrição, o que foi verificado em Lourenço (1997). Segundo Dollé *et al.*, (1999b) em amostras de ratinhos jovens não tratados com uma média total de FM de 4 a 7×10^{-5} , a constante de base causada pela *star activity* da *HindIII* pode abranger até 25 % dos mutantes recuperados. Se em estudos futuros houver a confirmação de um *background* estável (isto é, $0,7$ a $1,5 \times 10^{-5}$) de mutantes da *star activity* da *HindIII* em outros tecidos o valor de *background* de $1,1 \times 10^{-5}$ podia ser subtraído da FM (Dollé *et al.*, 1999b).

Outra possibilidade para justificar a elevada FM seria as células hospedeiras terem-se tornado insensíveis à galactose (por reversão da mutação pontual no gene *galE*), fenómeno que normalmente ocorre com uma frequência de 2×10^{-6} e portanto representa uma pequena contribuição para a frequência de *background*. As colónias insensíveis à galactose são facilmente reconhecidas com base na actividade da β -galactosidase (Dollé *et al.*, 1999b), através da repicagem das colónias e crescimento em meio não selectivo.

Considerando a hipótese de que o valor elevado de FM poderia ser causado por uma actividade inespecífica da enzima *HindIII*, na tentativa de evitar tal artefacto, foi

adquirida nova enzima, de um lote distinto e foi repetida a experiência. Numa segunda experiência, utilizou-se um maior número de amostras, i.e. todas as amostras do grupo controlo e da dose mais elevada. Nestas condições, os controlos da digestão da *HindIII* e do tempo de electroporação foram mais uma vez realizados e indicavam que o procedimento funcionava adequadamente em relação a estes dois aspectos.

Durante as duas experiências realizadas, verificou-se que o número total de colónias, em meio X-gal, de alguns ratinhos ficou abaixo do limite de sensibilidade do ensaio. A descarga eléctrica aplicada na electroporação pode implicar por vezes a morte celular, conduzindo a poucas colónias viáveis. No entanto, segundo Lourenço (1997) apenas cerca de 20,4% da totalidade das células electroporadas não sobreviviam. Dower *et al.*, (1988) refere que cerca de 80 % das células competentes são eficazmente transformadas com o DNA (embora tenha utilizado um sistema diferente), e que a eficiência de transformação é influenciada pela densidade celular. As células competentes utilizadas no ensaio foram preparadas antecipadamente e armazenadas em alíquotas a -80 °C. Lourenço (1997) verificou um decaimento da competência das células ao longo do tempo de armazenamento (25 dias) em azoto líquido, comparou também o armazenamento em azoto líquido com o -70 °C, que não apresentou diferenças ao fim de 18 dias. A morte celular de uma percentagem de células devido à descarga eléctrica e o decaimento da competência das células devido ao armazenamento (armazenadas há 1 mês), poderiam estar na origem do baixo número total de colónias, em meio X-gal. No entanto, as bactérias competentes utilizadas para todas as amostras provinham do mesmo tubo, e em muitas amostras geraram adequado número de colónias, pelo que esta possibilidade foi eliminada. Quanto aos valores de FM do grupo controlo, nesta segunda experiência observaram-se de novo valores muito elevados, sendo até mais elevados que os controlos históricos obtidos para este mesmo órgão, sugerindo que o ensaio ainda não se encontra a funcionar em condições óptimas.

Ainda assim, pode concluir-se que não existia nenhum aumento da FM nos ratinhos expostos ao extracto do sedimento. Face a estes resultados, existe a necessidade de confirmar os resultados com novos ensaios, procurando otimizar novamente as condições experimentais do ensaio antes de se repetir a experiência. Embora sejam necessárias mais experiências para que o procedimento de recuperação

do transgene ocorra adequadamente, os resultados até aqui obtidos sugerem que a exposição oral dos ratinhos aos extractos poderá não ter efeitos mutagénicos no fígado dos ratinhos, nas condições analisadas. Adicionalmente, verificou-se uma ligeira diminuição da FM após a exposição, em comparação com os controlos, poderá também sugerir que existam efeitos citotóxicos que levem à remoção das células contendo DNA danificado, mecanismo este que deverá ser averiguado no futuro, caso estes resultados se confirmem.

Estudos anteriores demonstraram que o B[a]P administrado através da água de consumo a ratinhos transgénicos *LacZ* (Muta™Mouse) apresentaram mutações tanto no fígado como no colon. Os resultados indicaram que estes órgãos conseguem metabolizar o B[a]P em produtos genotóxicos, embora não se possa excluir algum transporte dos metabolitos activados pelo fígado para estes órgãos (Kosinska *et al.*, 1999). Por outro lado, desde que a tumorigénese é vista como envolvida na acumulação de mutações em múltiplos genes e anomalias cromossómicas, o tempo de vida curto das células alvo de mutagénese pode impossibilitar tal acumulação (Kosinska *et al.*, 1999).

Para avaliar o risco de exposição a contaminantes de sedimentos na saúde humana, vários ensaios precisam de ser efectuados pois a informação apenas de um não revela todo o potencial tóxico de uma amostra de sedimentos (Chen e White, 2004; Aouadene *et al.*, 2008). É de salientar que todas as amostras de sedimento colhidas foram de locais de pesca frequentemente utilizados pela comunidade pesqueira. As espécies aquáticas são consumidas pela população e são uma fonte de alimento importante nesta área [Machado *et al.*, (submetido)]. Adicionalmente estas espécies capturadas são distribuídas localmente e a nível nacional, aumentando assim o potencial de exposição a contaminantes do estuário do Sado. Estes contaminantes também estão presentes na água do estuário, que também é utilizada para actividades agrícolas, fornecendo uma outra via de exposição humana através do contacto directo e consumo de produtos agrícolas regados com água potencialmente contaminada (Castanheira *et al.*, 2013). Estudos anteriores também revelaram a disponibilidade e capacidade de bioacumulação dos contaminantes nas partes edíveis de espécies aquáticas locais, não excluindo assim a exposição humana através da cadeia alimentar (Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011a; Rodrigo *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2013).

Globalmente, os resultados obtidos neste estudo reflectem o potencial efeito adverso para a saúde humana associado aos contaminantes encontrados no sedimento do estuário, contribuindo para a avaliação do risco.

CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo corroborou a genotoxicidade dos extractos *in vitro*, e as lesões observadas não foram revertidas pela quercetina, nas condições testadas. *In vivo*, verificou-se a indução de micronúcleos, embora o ensaio do cometa não revelasse resultados positivos. Aparentemente, não se verificou mutagenicidade *in vivo*, embora sejam necessários mais estudos para concluir a análise de mutações.

Embora este estudo tenha produzido evidências de efeitos genotóxicos dos extractos dos sedimentos do estuário do Sado analisados, sugere-se a necessidade de mais investigação para melhor esclarecer o seu impacto na saúde humana, havendo vários aspectos do trabalho a aprofundar, nomeadamente:

- Obter a caracterização química dos extractos, pois a análise existente corresponde ao sedimento total;
- Realizar mais estudos do potencial antioxidante da quercetina *in vitro* modificando o tempo de exposição das células aos extractos, como sugerido pelos estudos preliminares de curto termo (3 h de exposição; resultados não apresentados);
- Complementar os ensaios de genotoxicidade *in vitro* com ensaios para determinação de ROS para comprovar os danos oxidativos
- Concluir a análise de mutações;
- Repetir os ensaios em ratinhos utilizando doses mais elevadas ou os outros extractos também e considerar a utilização de outra via de exposição (*gavage*) para permitir maior controlo da dose administrada e evitar desperdícios de extracto.

A consolidação global dos dados do projecto vai permitir uma melhor compreensão do potencial toxicológico de sedimentos contaminados do Estuário do Sado, assim como, avaliar a associação entre o risco ambiental e de saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aherne, S. A., e O'brien, N. M. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr Cancer*, 34, 160-6 (1999).
- Aherne, S. A., e O'brien, N. M. Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H₂O₂-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells. *Nutr Cancer*, 38, 106-15 (2000a).
- Aherne, S. A., e O'brien, N. M. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med*, 29, 507-14 (2000b).
- Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., e Goya, L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr*, 45, 19-28 (2006a).
- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A. B., Bravo, L., e Goya, L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol*, 212, 110-8 (2006b).
- Aouadene, A., Di Giorgio, C., Sarrazin, L., Moreau, X., De Jong, L., Garcia, F., Thiery, A., Botta, A., e De Méo, M. Evaluation of the genotoxicity of river sediments from industrialized and unaffected areas using a battery of short-term bioassays. *Environ Mol Mutagen*, 49, 283-99 (2008).
- Arranz, N., Haza, A. I., García, A., Delgado, E., Rafter, J., e Morales, P. Effects of organosulfurs, isothiocyanates and vitamin C towards hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in human hepatoma cells. *Chem Biol Interact*, 169, 63-71 (2007).
- Arredondo, F., Echeverry, C., Abin-Carriquiry, J. A., Blasina, F., Antúnez, K., Jones, D. P., Go, Y. M., Liang, Y. L., e Dajas, F. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med*, 49, 738-47 (2010).
- Asita, A. O., Hayashi, M., Kodama, Y., Matsuoka, A., Suzuki, T., e Sofuni, T. Micronucleated reticulocyte induction by ethylating agents in mice. *Mutat Res*, 271, 29-37 (1992).
- ATCC. American Type Culture Collection – HepG2 em: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx> _acedido a 18 de Maio de 2013.
- Ayllon, F., e Garcia-Vazquez, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res*, 467, 177-86 (2000).
- Azqueta, A., e Collins, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*, 87, 949-68 (2013).

- Barcelos, G. R. M., Angeli, J. P. F., Serpeloni, J. M., Grotto, D., Rocha, B. A., Bastos, J. K., Knasmuller, S., e Barbosa, F. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726, 109-115 (2011a).
- Barcelos, G. R. M., Grotto, D., Angeli, J. P. F., Serpeloni, J. M., Rocha, B. A., Bastos, J. K., e Barbosa, F. Evaluation of Antigenotoxic Effects of Plant Flavonoids Quercetin and Rutin on HepG2 Cells. *Phytotherapy Research*, 25, 1381-1388 (2011b).
- Beyersmann, D., e Hartwig, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol*, 82, 493-512 (2008).
- Boerrigter, M. E., Dollé, M. E., Martus, H. J., Gossen, J. A., e Vijg, J. Plasmid-based transgenic mouse model for studying in vivo mutations. *Nature*, 377, 657-9 (1995).
- Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P. S., Hollert, H., e Braunbeck, T. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res*, 700, 11-7 (2010).
- Bonacker, D., Stoiber, T., Böhm, K. J., Prots, I., Wang, M., Unger, E., Thier, R., Bolt, H. M., e Degen, G. H. Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule function. *Environ Mol Mutagen*, 45, 346-53 (2005).
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., e Fenech, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26, 93-100 (2011).
- Boots, A. W., Haenen, G. R., e Bast, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585, 325-37 (2008).
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56, 317-33 (1998).
- Busuttil, R., Bahar, R., e Vijg, J. Genome dynamics and transcriptional deregulation in aging. *Neuroscience*, 145, 1341-7 (2007).
- Caeiro, S., Costa, M. H., Delvals, A., Repolho, T., Gonçalves, M., Mosca, A., Coimbra, A. P., Ramos, T. B., e Painho, M. Ecological risk assessment of sediment management areas: application to Sado Estuary, Portugal. *Ecotoxicology*, 18, 1165-75 (2009).
- Caeiro, S., Costa, M. H., Ramos, T. B., Fernandes, F., Silveira, N., Coimbra, A., Medeiros, G., e Painho, M. Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. *Ecological Indicators*, 5, 151-169 (2005).
- Carreira, S. Qualidade de bivalves estuarinos explorados para consumo. Potencial risco para a espécie *Ruditapes decussatus*: um estudo de caso. Mestrado em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 61 pp (2011).

- Carreira, S., Costa, P. M., Martins, M., Lobo, J., Costa, M. H., e Caeiro, S. Ecotoxicological heterogeneity in transitional coastal habitats assessed through the integration of biomarkers and sediment-contamination profiles: a case study using a commercial clam. *Arch Environ Contam Toxicol*, 64, 97-109 (2013).
- Castanheira, I., Gueifão, S., Saraiva, M., Martinho, A. P., Vaz-Fernandes, P., e Caeiro S. Local farming quality and food composition: The case of Carrasqueira Village, Portugal, 10th International Food Data Conference, Granada, Spain. (Poster) 12-14 Setembro 2013.
- Çavaş, T., Garanko, N. N., e Arkhipchuk, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem Toxicol*, 43, 569-74 (2005).
- Celik, A., Ogenler, O., e Cömelekoglu, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. *Mutagenesis*, 20, 411-5 (2005).
- Chapman, P. M., e Wang, F. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ Toxicol Chem*, 20, 3-22 (2001).
- Chapman, P. M., Wang, F., e Caeiro, S. S. Assessing and managing sediment contamination in transitional waters. *Environ Int*, 55, 71-91 (2013).
- Chen, G., e White, P. A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat Res*, 567, 151-225 (2004).
- Collins, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26, 249-61 (2004).
- Collins, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*, 681, 24-32 (2009).
- Collins, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 794-800 (2014).
- Collins, A. R., e Azqueta, A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutat Res*, 736, 122-9 (2012).
- Collins, A. R., Duthie, S. J., Fillion, L., Gedik, C. M., Vaughan, N., e Wood, S. G. Oxidative DNA damage in human cells: The influence of antioxidants and DNA repair. *Biochemical Society Transactions*, 25, 326-331 (1997).
- Collins, A. R., e Horvathova, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochemical Society Transactions*, 29, 337-341 (2001).
- Costa, P. M., Caeiro, S., Diniz, M. S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Delvalls, T. A., e Costa, M. H. Biochemical endpoints on juvenile *Solea senegalensis* exposed to estuarine sediments: the effect of contaminant mixtures on metallothionein e CYP1A induction. *Ecotoxicology*, 18, 988-1000 (2009a).
- Costa, P. M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Delvalls, T., e Costa, M. H. Estuarine ecological risk based on hepatic

- histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Mar Pollut Bull*, 62, 55-65 (2011a).
- Costa, P. M., Caeiro, S., Vale, C., Delvalls, T., e Costa, M. H. Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? A case study with a benthic fish. *Environ Pollut*, 161, 107-20 (2012).
- Costa, P. M., Carreira, S., Costa, M. H., e Caeiro, S. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat Toxicol*, 126, 442-54 (2013).
- Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Delvalls, T. A., e Costa, M. H. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. *Aquat Toxicol*, 92, 202-12 (2009b).
- Costa, P. M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Delvalls, T. A., e Costa, M. H. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): effects of metallic and organic contaminants. *Mutat Res*, 654, 29-37 (2008).
- Costa, P. M., Neuparth, T. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Delvalls, T. A., e Costa, M. H. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: laboratory versus in situ studies. *Environ Res*, 111, 25-36 (2011b).
- Crespo-López, M. E., Macêdo, G. L., Pereira, S. I., Arrifano, G. P., Picanço-Diniz, D. L., Do Nascimento, J. L., e Herculano, A. M. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacol Res*, 60, 212-20 (2009).
- Davis, J. M., Murphy, E. A., McClellan, J. L., Carmichael, M. D., e Gangemi, J. D. Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295, R505-9 (2008).
- Dean, S. W., e Myhr, B. Measurement of gene mutation in vivo using Muta Mouse and positive selection for lacZ- phage. *Mutagenesis*, 9, 183-5 (1994).
- Dehn, P. F., Allen-Mocherie, S., Karek, J., e Thenappan, A. Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels. *Toxicol In Vitro*, 19, 261-73 (2005).
- Dollé, M. E., Martus, H. J., Gossen, J. A., Boerrigter, M. E., e Vijg, J. Evaluation of a plasmid-based transgenic mouse model for detecting in vivo mutations. *Mutagenesis*, 11, 111-8 (1996).
- Dollé, M. E., Martus, H. J., Novak, M., Van Orsouw, N. J., e Vijg, J. Characterization of color mutants in lacZ plasmid-based transgenic mice, as detected by positive selection. *Mutagenesis*, 14, 287-93 (1999a).

- Dollé, M. E., Snyder, W. K., Van Orsouw, N. J., e Vijg, J. Background mutations and polymorphisms in lacZ-plasmid transgenic mice. *Environ Mol Mutagen*, 34, 112-20 (1999b).
- Dower, W. J., Miller, J. F., e Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16, 6127-45 (1988).
- Dusinska, M., e Collins, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23, 191-205 (2008).
- Duthie, S. J., Collins, A. R., Duthie, G. G., e Dodson, V. L. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 393, 223-231 (1997).
- EFSA – European Food Safety Authority. Minimum Criteria for the acceptance of *in vivo* alkaline Comet Assay Reports. *EFSA Journal* 2012, 10(11), 2977. (12 pp.) (2012). Disponível online em: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Fang, Y. Z., Yang, S., e Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-9 (2002).
- Ferguson, L. R., Philpott, M., e Karunasinghe, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198, 147-159 (2004).
- Fracasso, M. E., Perbellini, L., Soldà, S., Talamini, G., e Franceschetti, P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat Res*, 515, 159-69 (2002).
- Gebel, T. W. Genotoxicity of arsenical compounds. *Int J Hyg Environ Health*, 203, 249-62 (2001).
- Gonçalves, C., Martins, M., Costa, M. H., Caeiro, S., e Costa, P. M. Ecological risk assessment of impacted estuarine areas: integrating histological and biochemical endpoints in wild Senegalese sole. *Ecotoxicol Environ Saf*, 95, 202-11 (2013).
- Gordon, M. Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat Prod Rep*, 13, 265-73 (1996).
- Gossen, J., e Vijg, J. Transgenic mice as model systems for studying gene mutations *in vivo*. *Trends Genet*, 9, 27-31 (1993a).
- Gossen, J. A., De Leeuw, W. J., Molijn, A. C., e Vijg, J. Plasmid rescue from transgenic mouse DNA using LacI repressor protein conjugated to magnetic beads. *Biotechniques*, 14, 624-9 (1993).
- Gossen, J. A., De Leeuw, W. J., Tan, C. H., Zwarthoff, E. C., Berends, F., Lohman, P. H., Knook, D. L., e Vijg, J. Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7971-5 (1989).
- Gossen, J. A., Martus, H. J., Wei, J. Y., e Vijg, J. Spontaneous and X-ray-induced deletion mutations in a LacZ plasmid-based transgenic mouse model. *Mutat Res*, 331, 89-97 (1995).

- Gossen, J. A., Molijn, A. C., Douglas, G. R., e Vijg, J. Application of galactose-sensitive *E. coli* strains as selective hosts for LacZ- plasmids. *Nucleic Acids Res*, 20, 3254 (1992).
- Gossen, J. A., e Vijg, J. A selective system for lacZ- phage using a galactose-sensitive *E. coli* host. *Biotechniques*, 14, 326, 330 (1993b).
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., e Pelzer, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco*, 56, 683-7 (2001).
- Gupta, C., Vikram, A., Tripathi, D. N., Ramarao, P., e Jena, G. B. Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. *Phytother Res*, 24, 119-28 (2010).
- Halliwell, B. Flavonoids: a re-run of the carotenoids story? *Novartis Found Symp*, 282, 93-101; discussion 101-4, 212-8 (2007).
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., e Cross, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*, 119, 598-620 (1992).
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R. R., e Workshop, T. I. C. A. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18, 45-51 (2003).
- Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H., Fjällman, A., Frieauff, W., e Suter, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 39, 843-58 (2001).
- Hartwig, A. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*, 8, 3-11 (1995).
- Hayashi, M., Macgregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., e Sutou, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 234-252 (2000).
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., e Ishidate, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*, 245, 245-9 (1990).
- Heddle, J. A., Fenech, M., Hayashi, M., e Macgregor, J. T. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 26, 3-10 (2011).
- Higley, E., Grund, S., Jones, P. D., Schulze, T., Seiler, T. B., Lübcke-Von Varel, U., Brack, W., Wölz, J., Zielke, H., Giesy, J. P., Hollert, H., e Hecker, M. Endocrine disrupting, mutagenic, and teratogenic effects of upper Danube River sediments using effect-directed analysis. *Environ Toxicol Chem*, 31, 1053-62 (2012).
- Hreljac, I., e Filipic, M. Organophosphorus pesticides enhance the genotoxicity of benzo(a)pyrene by modulating its metabolism. *Mutat Res*, 671, 84-92 (2009).

- IARC. A Review of Human Carcinogens - Chemical Agents and Related Occupations. IARC Monographs, 100F (2012).
- IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Supp.7 (1987).
- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-109 em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> acedido a 14 de Julho de 2013.
- IARC. Occupational exposures in insecticide application and some pesticides. IARC Monographs, 53, 5-586 (1991).
- IARC. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 92, 35-121 (2010).
- Inoue, H., Nojima, H., e Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-8 (1990).
- IPCS/ INCHEM – International Programme on Chemical Safety/ Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations em: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/organlea.htm#SubSectionTitle:7.2.2> Relevant animal data. Acedido a 8 de Abril de 2013.
- Johnson, F. M. The genetic effects of environmental lead. *Mutat Res*, 410, 123-40 (1998).
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., e Wosniok, W. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ Pollut*, 132, 279-87 (2004).
- Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J., e Majer, B. J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198, 315-28 (2004).
- Kohler, S. W., Provost, G. S., Fieck, A., Kretz, P. L., Bullock, W. O., Sorge, J. A., Putman, D. L., e Short, J. M. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the lacI gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7958-62 (1991).
- Kosinska, W., Von Pressentin, M. D. M., e Guttenplan, J. B. Mutagenesis induced by benzo a pyrene in lacZ mouse mammary and oral tissues: comparisons with mutagenesis in other organs and relationships to previous carcinogenicity assays. *Carcinogenesis*, 20, 1103-1106 (1999).
- Krishna, G., e Hayashi, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*, 455, 155-66 (2000).
- Kushwaha, S., Tripathi, D., Vikram, A., Ramarao, P., e Jena, G. Evaluation of multi-organ DNA damage by comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in

- mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58, 145-154 (2010).
- Lambert, I. B., Singer, T. M., Boucher, S. E., e Douglas, G. R. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res*, 590, 1-280 (2005).
- Lee, Y. Y., Kim, H. G., Jung, H. I., Shin, Y. H., Hong, S. M., Park, E. H., Sa, J. H., e Lim, C. J. Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Mol Cells*, 14, 305-11 (2002).
- Lemaire, P., e Livingstone, D. R. Aromatic hydrocarbon quinone-mediated reactive oxygen species production on hepatic microsomes of the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 117, 131-9 (1997).
- Lewis, S. E. A consideration of the advantages and potential difficulties of the use of transgenic mice for the study of germinal mutations. *Mutat Res*, 307, 509-15 (1994).
- Lewińska, D., Arkusz, J., Stańczyk, M., Palus, J., Dziubałtowska, E., e Stepnik, M. Comparison of the effects of arsenic and cadmium on benzo(a)pyrene-induced micronuclei in mouse bone-marrow. *Mutat Res*, 632, 37-43 (2007).
- Long, E. R., e Macdonald, D. D. Recommended uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment*, 4, 1019-1039 (1998).
- Lourenço, M. H. D. Avaliação de efeitos genotóxicos em ratinhos transgênicos contendo o gene *lacZ*. Licenciatura em Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 207pp (1997).
- Louro, H., Faustino, I., Dias, A., Boavida, M. G., e Silva, M. J. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency does not affect ethylnitrosourea mutagenicity in liver and testis of *lacZ* transgenic mice. *Environ Mol Mutagen*, 51, 322-9 (2010).
- Louro, H., Pinheiro, I., Costa, P., Sousa, C., Dias, A., Boavida, M. G., e Silva, M. J. Mutagenic effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency in transgenic mice. *Mutat Res*, 640, 82-8 (2008).
- Louro, H., Silva, M. J., e Boavida, M. G. Mutagenic activity of cisplatin in the *lacZ* plasmid-based transgenic mouse model. *Environ Mol Mutagen*, 40, 283-91 (2002).
- Louro, H. e Silva, M.J. Cost/Benefit of Mutation Induction under PARP1 Deficiency: From Genomic Instability to Therapy. In: *Advances in Genetics Research*. Volume 4, Ed. Kevin V. Urbano, Nova Science Publishers, Inc., NY 2011.
- Ludewig, G., Lehmann, L., Esch, H., e Robertson, L. W. Metabolic Activation of PCBs to Carcinogens in Vivo - A Review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 25, 241-6 (2008).
- Macdonald, D. D., Carr, R. S., Calder, F. D., Long, E. R., e Ingersoll, C. G. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology*, 5, 253-78 (1996).

- Macgregor, J. T., Collins, J. M., Sugiyama, Y., Tyson, C. A., Dean, J., Smith, L., Andersen, M., Curren, R. D., Houston, J. B., Kadlubar, F. F., Kedderis, G. L., Krishnan, K., Li, A. P., Parchment, R. E., Thummel, K., Tomaszewski, J. E., Ulrich, R., Vickers, A. E., e Wrighton, S. A. In vitro human tissue models in risk assessment: report of a consensus-building workshop. *Toxicol Sci*, 59, 17-36 (2001).
- Machado, A., Vaz-Fernandes, P., Paixão, E., Caeiro, S., e Matias Dias, C. An epidemiological approach to characterize the human exposure pathways in a contaminated estuarine environment. Submetido ao *Journal of Toxicology and Environmental Safety*.
- Maier, A., Schumann, B. L., Chang, X., Talaska, G., e Puga, A. Arsenic co-exposure potentiates benzo[a]pyrene genotoxicity. *Mutat Res*, 517, 101-11 (2002).
- Marabini, L., Calò, R., e Fucile, S. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicol In Vitro*, 25, 1045-52 (2011).
- Medina-Díaz, I. M., e Elizondo, G. Transcriptional induction of CYP3A4 by o,p'-DDT in HepG2 cells. *Toxicol Lett*, 157, 41-7 (2005).
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., e Kassie, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198, 329-340 (2004).
- Miller, K. P., e Ramos, K. S. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev*, 33, 1-35 (2001).
- Moon, Y. J., Wang, L., Dicenzo, R., e Morris, M. E. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos*, 29, 205-17 (2008).
- Musonda, C. A., e Chipman, J. K. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappa B DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 19, 1583-1589 (1998).
- Najafzadeh, M., Reynolds, P. D., Baumgartner, A., e Anderson, D. Flavonoids inhibit the genotoxicity of hydrogen peroxide (H₂O₂) and of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) in lymphocytes from patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Mutagenesis*, 24, 405-11 (2009).
- Noroozi, M., Angerson, W. J., e Lean, M. E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr*, 67, 1210-8 (1998).
- OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing (1997)
- Ohe, T., Watanabe, T., e Wakabayashi, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res*, 567, 109-49 (2004).
- OMS. Organização Mundial de Saúde. Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (second edition). Environmental Health Criteria 140, World Health Organization, Geneva (1993).
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A. T., e Nilsson, R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res*, 540, 19-28 (2003).

- Pinto, M. Characterization of cytotoxicity and genotoxicity of sediments from a potentially contaminated estuary. Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 61pp (2011).
- Pinto, M., Costa, P. M., Louro, H., Costa, M. H., Lavinha, J., Caeiro, S., e Silva, M. J. Determining oxidative and non-oxidative genotoxic effects driven by estuarine sediment contaminants on a human hepatoma cell line. *Sci Total Environ*, 478C, 25-35 (2014a).
- Pinto, M., Costa, P. M., Louro, H., Costa, M. H., Lavinha, J., Caeiro, S., e Silva, M. J. Human hepatoma cells exposed to estuarine sediment contaminant extracts permitted the differentiation between cytotoxic and pro-mutagenic fractions. *Environ Pollut*, 185, 141-8 (2014b).
- Pérez-Maldonado, I. N., Herrera, C., Batres, L. E., González-Amaro, R., Díaz-Barriga, F., e Yáñez, L. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environ Res*, 98, 177-84 (2005).
- Quercegen Pharma LLC. Gras notice for high-purity quercetin. Food Additive Safety (HFS-200), Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) Disponível online em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn341-1.pdf (2010).
- Ramos, A. A., Lima, C. F., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M., e Pereira-Wilson, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters*, 177, 66-73 (2008).
- Repetto, G., Del Peso, A., e Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, 3, 1125-31 (2008).
- Rodrigo, A. P., Costa, P. M., Costa, M. H., e Caeiro, S. Integration of sediment contamination with multi-biomarker responses in a novel potential bioindicator (*Sepia officinalis*) for risk assessment in impacted estuaries. *Ecotoxicology*, 22, 1538-54 (2013).
- Rossmann, T. G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 37-65 (2003).
- Rüther, U., e Müller-Hill, B. Easy identification of cDNA clones. *EMBO J*, 2, 1791-4 (1983).
- Sanchez, M., Torres, J. V., Tormos, C., Iradi, A., Muñiz, P., Espinosa, O., Salvador, A., Rodriguez-Delgado, J., Fandos, M., e Sáez, G. T. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett*, 233, 28-35 (2006).
- Sasaki, Y. F., Sekihashi, K., Izumiyama, F., Nishidate, E., Saga, A., Ishida, K., e Tsuda, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit Rev Toxicol*, 30, 629-799 (2000).

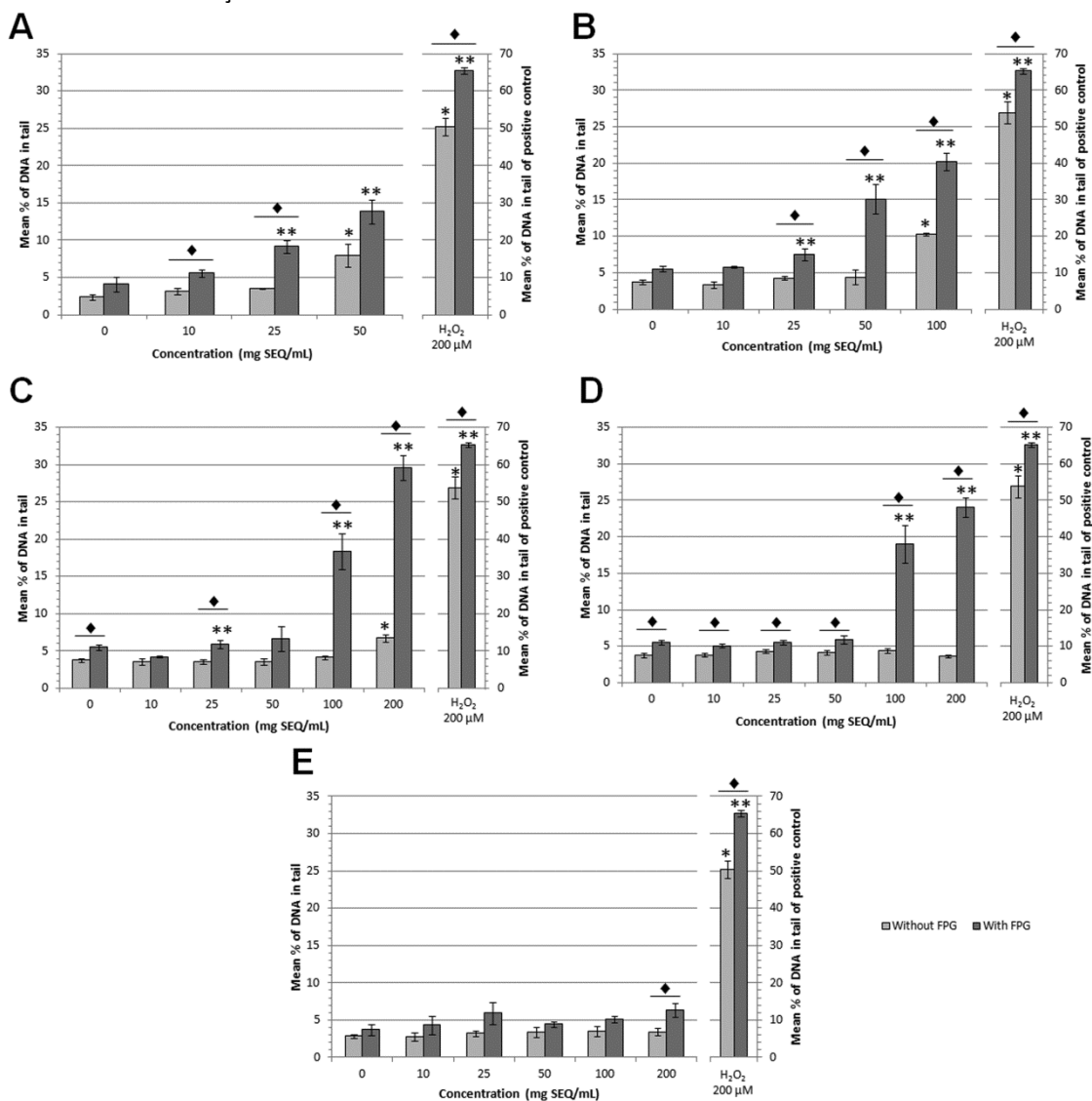
- Sato, S., Taketomi, M., Nakajima, M., Kitazawa, M., Shimada, H., Itoh, S., Igarashi, M., Higashikuni, N., Sutou, S., Sasaki, Y. F. Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS.MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenesis Study Group. *Mutat Res*, 338, 51-7 (1995).
- Sheu, J. R., Hsiao, G., Chou, P. H., Shen, M. Y., e Chou, D. S. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *J Agric Food Chem*, 52, 4414-8 (2004).
- Soto-Reyes, E., Del Razo, L. M., Valverde, M., e Rojas, E. Role of the alkali labile sites, reactive oxygen species and antioxidants in DNA damage induced by methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic. *Biometals*, 18, 493-506 (2005).
- Spink, D. C., Katz, B. H., Hussain, M. M., Spink, B. C., Wu, S. J., Liu, N., Pause, R., e Kaminsky, L. S. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in T-47D human breast cancer cells by benzo[a]pyrene is diminished by arsenite. *Drug Metab Dispos*, 30, 262-9 (2002).
- Srinivasan, A., Lehmler, H. J., Robertson, L. W., e Ludewig, G. Production of DNA strand breaks in vitro and reactive oxygen species in vitro and in HL-60 cells by PCB metabolites. *Toxicol Sci*, 60, 92-102 (2001).
- Staal, Y. C., Hebels, D. G., Van Herwijnen, M. H., Gottschalk, R. W., Van Schooten, F. J., e Van Delft, J. H. Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis*, 28, 2632-40 (2007).
- Tarantini, A., Maître, A., Lefèbvre, E., Marques, M., Rajhi, A., e Douki, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology*, 279, 36-44 (2011).
- Thomas, K. V., Balaam, J., Barnard, N., Dyer, R., Jones, C., Lavender, J., e Mchugh, M. Characterisation of potentially genotoxic compounds in sediments collected from United Kingdom estuaries. *Chemosphere*, 49, 247-58 (2002).
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., e Sasaki, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-21 (2000).
- Torbergson, A. C., e Collins, A. R. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *European Journal of Nutrition*, 39, 80-85 (2000).
- Uhl, M., Helma, C., e Knasmüller, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res*, 441, 215-24 (1999).

- Vakharia, D. D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q. Y., e Kaminsky, L. S. Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug Metab Dispos*, 29, 999-1006 (2001).
- Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J. C., Le Bon, A. M., e Chagnon, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res*, 536, 79-90 (2003).
- Vasquez, M., e Tice, R. Detecting genotoxic activity against high molecular weight DNA using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Environ. Mol. Mutagen*, 29, 53 (1997).
- Vicente, A. M. Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade e desregulação endócrina. Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 75pp (2012).
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. *Recombinat DNA*, 2nd Ed, Scientific American Books, W.H.Freeman and Company, N.Y (1992).
- Woo, S., Kim, S., Yum, S., Yim, U. H., e Lee, T. K. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Pollut Bull*, 52, 1768-75 (2006).
- Wu, X. J., Lu, W. Q., e Mersch-Sundermann, V. Benzo(a)pyrene induced micronucleus formation was modulated by persistent organic pollutants (POPs) in metabolically competent human HepG2 cells. *Toxicol Lett*, 144, 143-50 (2003).
- Xue, W., e Warshawsky, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 206, 73-93 (2005).
- Yang, F., Zhang, Q., Guo, H., e Zhang, S. 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. *Toxicol In Vitro*, 24, 2003-11 (2010).
- Šrut, M., Traven, L., Štambuk, A., Kralj, S., Žaja, R., Mićović, V., e Klobučar, G. I. Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. *Toxicol In Vitro*, 25, 308-14 (2011).

ANEXOS

ANEXO A – Resultados da percentagem de DNA na cauda obtidos em estudos recentes

Figura A1 - Resultados do ensaio do Cometa em células HepG2 obtidos após 48 h de exposição a diferentes concentrações de extractos de sedimento do estuário do Sado.



Resultados de 3 experiências independentes obtidos de Pinto *et al.*, (2014a). As barras claras representam o valor médio da percentagem de DNA na cauda (\pm EP) sem tratamento com FPG, e as barras escuras representam o valor médio da percentagem de DNA na cauda (\pm EP) com tratamento com FPG. A - Amostra F; B - Amostra P; C - Amostra E; D - Amostra A; E - Amostra C. A concentração 0 mg SEQ/ml corresponde a 0,5 % DMSO para amostra F, 2 % DMSO para todas as outras. *indica diferenças estatisticamente significativa em comparação com o controlo de solvente (sem FPG). **indica diferenças estatisticamente significativa em comparação com o controlo de solvente (com FPG). ◆ Representa diferenças estatisticamente significativas entre tratamento com e sem FPG à mesma concentração.

ANEXO B – Dados experimentais dos ensaios *in vivo* efectuados neste trabalho.

Tabela B1 - Média do Consumo diário (\pm DP) de um ratinho, por grupos e ao longo do período de exposição.

Dose (g SEQ/dia/Kg pc)	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	Total
0	7,6 \pm 0,7	9,7 \pm 1,4	9,6 \pm 1,5	12,6 \pm 2,9	9,9 \pm 1,3
73,7	8,2 \pm 1,9	8,2 \pm 2,1	8,2 \pm 1,6	10,7 \pm 2,4	8,8 \pm 1,9
147,3	8,7 \pm 2	10,1 \pm 2,4	10,4 \pm 3,3	12,5 \pm 3,1	10,4 \pm 2,5
Média do consumo diário (ml)					10 \pm 2

Tabela B2 - Valores de peso de cada ratinho no início e ao longo do período de exposição.

Ratinho	Peso (g)					
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	
Grupo Controlo	R1	22	22,5	23,2	23	23,8
	R2	22,2	25	25,8	25,7	26,2
	R3	19,9	20,6	22,5	22,9	22,5
	R4	23,4	24,6	26	25	25,6
	R5	22,5	26	26	27,3	26,5
	R6	24,4	25,4	25,8	26,4	26,3
Média \pm DP	22,4 \pm 1,5	24,0 \pm 2,1	24,9 \pm 1,6	25,1 \pm 1,8	25,2 \pm 1,6	
Grupo exposto à dose 1	R7	22,1	24,5	24,1	25	24,4
	R8	24,1	24,5	25,4	25,8	26,5
	R9	25,6	26	26,6	26,3	27,4
	R10	22,9	26	26,9	27	27,2
	R11	23,6	20,8	25,4	25,6	25,1
	R12	20,8	24,4	22,7	22,4	23,3
Média \pm DP	23,2 \pm 1,7	24,4 \pm 1,9	25,2 \pm 1,6	25,4 \pm 1,6	25,7 \pm 1,6	
Grupo exposto à dose 2	R13	22,4	24,2	25	26,4	25,6
	R14	23,6	24,3	24,5	25,6	24,1
	R15	19,6	20,5	20,5	21	21,6
	R16	21,9	24	24,5	25	24,4
	R17	21,8	24,3	25	25,1	23,9
	R18	24,4	23,5	26,8	27	26,5
Média \pm DP	22,3 \pm 1,7	23,5 \pm 1,5	24,4 \pm 2,1	25,0 \pm 2,1	24,4 \pm 1,7	

DP - Desvio Padrão; T₀ - antes do início da exposição; T₁ - final da primeira semana (7^o dia); T₂ - final da segunda semana (14^o dia); T₃ - final da terceira semana (21^o dia); T₄ - fim do tratamento (28^o dia).

Tabela B3 - Valores experimentais obtidos para o número de micronúcleos e percentagem de reticulócitos para cada grupo a cada período da exposição.

		Tempo de exposição analisado									
		T ₀		T ₁		T ₂		T ₃		T ₄	
	Ratinho	Nº MN	% Ret	Nº MN	% Ret	Nº MN	% Ret	Nº MN	% Ret	Nº MN	% Ret
Grupo controlo	R1	6,0	3,2	14,0	7,2	14,0	6,5	18,0	7,0	14,0	6,3
	R2	6,0	5,3	10,0	5,9	10,0	7,0	23,0	6,7	9,0	6,9
	R3	6,0	6,3	17,0	8,2	9,0	5,9	18,0	6,2	31,0	6,1
	R4	7,0	6,1	11,0	7,8	15,0	7,2	8,0	5,8	16,0	5,8
	R5	8,0	7,7	14,0	8,6	17,0	7,0	19,0	7,2	23,0	7,5
	R6	1,0	2,3	11,0	5,7	12,0	6,6	13,0	6,0	16,0	5,4
Média ± DP		5,8 ± 2,4	5,1 ± 2,0	12,8 ± 2,6	7,2 ± 1,2	12,8 ± 3,1	6,7 ± 0,5	16,5 ± 5,2	6,5 ± 0,6	18,2 ± 7,7	6,3 ± 0,8
Grupo exposto à dose 1	R7	3,0	4,9	12,0	5,9	21,0	7,6	21,0	8,4	31,0	7,4
	R8	4,0	7,9	13,0	7,5	22,0	7,0	14,0	6,4	22,0	8,2
	R9	6,0	7,3	13,0	7,7	19,0	4,9	14,0	8,1	17,0	7,3
	R10	12,0	6,5	15,0	8,1	20,0	9,2	19,0	6,3	18,0	7,4
	R11	6,0	5,6	19,0	7,5	17,0	7,0	23,0	7,7	28,0	6,6
	R12	9,0	7,6	13,0	7,8	21,0	9,7	16,0	8,4	30,0	9,2
Média ± DP		6,7 ± 3,3	6,6 ± 1,2	14,2 ± 2,6	7,4 ± 0,8	20,0 ± 1,8	7,5 ± 1,7	17,8 ± 3,8	7,5 ± 1,0	24,3 ± 6,1	7,7 ± 0,9
Grupo exposto à dose 2	R13	8,0	8,5	14,0	8,2	15,0	6,0	21,0	10,0	26,0	7,3
	R14	6,0	7,0	22,0	7,9	22,0	8,2	25,0	7,3	23,0	7,9
	R15	8,0	5,8	25,0	10,6	24,0	9,8	22,0	7,5	23,0	6,9
	R16	9,0	8,0	18,0	8,2	14,0	7,3	30,0	8,0	18,0	6,2
	R17	9,0	5,8	32,0	8,1	24,0	8,6	17,0	6,2	26,0	7,2
	R18	9,0	6,1	19,0	7,9	28,0	10,5	28,0	8,2	56,0	7,3
Média ± DP		8,2 ± 1,2	6,8 ± 1,2	21,7 ± 6,3	8,5 ± 1,0	21,2 ± 5,5	8,4 ± 1,6	23,8 ± 4,8	7,8 ± 1,3	28,7 ± 13,7	7,1 ± 0,6

DP - Desvio Padrão; T₀ - antes do início da exposição; T₁ - final da primeira semana (7º dia); T₂ - final da segunda semana (14º dia); T₃ - final da terceira semana (21º dia); T₄ - fim do tratamento (28º dia).

Tabela B4 - Valores experimentais obtidos para a percentagem de DNA na cauda e tamanho da cauda, no ensaio do Cometa em sangue periférico de ratinho, para cada grupo e ao longo do período de exposição.

		Tempo de exposição analisado												
		T ₁			T ₂			T ₃			T ₄			
		Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III
Grupo Controlo	% DNA na cauda	R1	5,24	6,16	5,91	4,04	8,55	5,09	3,91	5,74	4,15	4,16	4,79	3,93
		R2	4,62	6,12	5,56	4,05	6,29	5,41	3,39	5,08	4,62	4,70	6,31	6,54
		R3	5,72	6,24	3,02	3,80	6,40	6,50	4,80	5,87	4,67	4,20	6,91	3,63
		R4	6,35	5,99	4,25	4,13	6,51	8,09	4,25	5,83	6,16	3,56	3,37	5,78
		R5	4,78	5,91	5,81	4,30	6,63	4,51	4,82	4,35	4,22	4,14	5,48	6,64
		R6	6,15	5,61	8,27	4,63	7,32	7,26	4,53	7,11	7,29	3,24	4,25	5,18
		Média ± DP	5,48 ± 0,72	6,00 ± 0,23	5,47 ± 1,77	4,16 ± 0,28	6,95 ± 0,86	6,14 ± 1,38	4,28 ± 0,56	5,66 ± 0,92	5,19 ± 1,26	4,00 ± 0,52	5,18 ± 1,31	5,28 ± 1,28
Grupo Controlo	Média do tamanho da cauda (µm)	R1	4,95	6,25	5,32	4,66	9,46	7,41	4,76	5,28	5,28	3,83	5,02	4,16
		R2	5,28	10,83	5,66	5,12	7,72	6,57	5,37	4,82	5,75	4,68	6,17	7,52
		R3	5,29	6,12	3,72	3,68	6,51	7,09	4,72	6,13	5,62	4,16	6,89	4,36
		R4	8,70	5,69	7,21	4,29	6,14	7,89	6,94	6,55	10,20	3,64	3,60	6,71
		R5	4,68	5,54	6,21	3,64	6,69	5,25	4,51	5,28	7,49	4,29	5,42	6,85
		R6	6,91	5,64	9,23	5,12	7,53	6,90	3,94	8,36	13,71	3,60	4,30	5,00
		Média ± DP	5,97 ± 1,55	6,68 ± 2,06	6,23 ± 1,87	4,42 ± 0,66	7,34 ± 1,20	6,85 ± 0,91	5,04 ± 1,04	6,07 ± 1,29	8,01 ± 3,34	4,03 ± 0,42	5,23 ± 1,20	5,76 ± 1,43
Grupo exposto à dose 1	% DNA na cauda	R7	11,34	6,08	4,87	4,37	6,78	6,25	2,72	4,76	4,29	4,43	4,40	3,23
		R8	14,39	5,67	4,93	5,14	8,35	5,92	3,38	3,71	7,29	4,85	5,53	7,47
		R9	4,32	7,81	53,47*	4,06	6,85	6,36	4,15	7,44	4,09	4,10	4,93	8,84
		R10	3,76	8,02	45,11*	4,07	4,86	9,70	4,17	7,29	6,36	3,80	5,47	8,10
		R11	5,59	6,60	4,21	5,01	5,84	4,73	2,32	8,01	6,18	4,66	5,16	4,75
		R12	5,65	7,46	7,63	4,79	7,42	9,96	3,52	8,14	5,33	5,42	5,84	5,96
		Média ± DP	7,51 ± 4,32	6,94 ± 0,96	5,41 ± 1,52	4,57 ± 0,47	6,68 ± 1,22	7,15 ± 2,15	3,38 ± 0,75	6,56 ± 1,86	5,59 ± 1,25	4,54 ± 0,57	5,22 ± 0,51	6,39 ± 2,14
Grupo exposto à dose 1	Média do tamanho da cauda (µm)	R7	12,17	6,32	5,27	4,08	7,70	6,12	2,96	5,11	7,73	4,02	4,38	3,03
		R8	16,24	6,63	6,74	5,66	9,32	6,73	3,86	4,36	14,95	4,45	4,60	7,45
		R9	3,77	7,86	29,96*	3,77	7,12	6,02	4,80	9,03	3,80	3,98	5,01	8,94
		R10	3,71	7,13	31,36*	4,23	5,25	10,09	7,35	8,61	7,16	4,05	6,79	8,86
		R11	4,65	6,49	4,17	4,46	4,97	4,73	2,71	12,85	7,12	4,32	4,44	4,27
		R12	4,30	6,17	7,07	5,17	7,44	10,88	3,78	12,08	8,36	4,76	6,29	5,66
		Média ± DP	7,47 ± 5,38	6,77 ± 0,63	5,82 ± 1,35	4,56 ± 0,71	6,97 ± 1,63	7,43 ± 2,47	4,24 ± 1,69	8,67 ± 3,48	8,19 ± 3,67	4,26 ± 0,31	5,25 ± 1,03	6,37 ± 2,45

(continua na próxima página)

Tabela B4 – (Continuação)

		Tempo de exposição analisado												
		T ₁			T ₂			T ₃			T ₄			
		Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III
Grupo exposto à dose 2	% DNA na cauda	R13	4,31	5,82	3,50	3,62	3,74	8,71	3,98	5,29	5,77	6,72	3,92	6,79
		R14	5,33	7,43	4,28	3,69	5,60	10,45	3,83	4,59	9,98	6,42	4,16	5,79
		R15	4,94	4,21	6,68	4,02	5,75	7,03	3,87	5,99	6,71	3,85	5,79	4,93
		R16	6,60	3,34	6,13	3,21	4,51	7,24	5,23	4,88	6,25	3,95	5,55	5,86
		R17	5,28	6,74	3,50	3,72	7,13	5,12	2,98	4,75	2,68	4,10	3,59	4,93
		R18	6,96	7,66	6,02	4,53	7,36	5,72	4,72	3,68	4,31	4,58	5,61	7,86
	Média ± DP	5,57 ± 1,01	5,87 ± 1,76	5,02 ± 1,42	3,80 ± 0,45	5,68 ± 1,42	7,38 ± 1,96	4,10 ± 0,78	4,86 ± 0,77	5,95 ± 2,46	4,84 ± 1,29	4,77 ± 0,98	6,03 ± 1,13	
	Média do tamanho da cauda (µm)	R13	4,54	6,08	4,18	3,50	3,84	8,58	5,67	5,51	8,22	7,18	4,49	6,58
		R14	4,92	7,06	4,86	3,84	6,29	10,69	7,37	5,96	18,95	7,00	4,36	5,58
		R15	3,92	3,19	6,67	3,55	6,24	6,62	4,00	5,59	7,53	3,62	5,52	5,33
R16		7,43	3,51	8,39	2,88	5,28	7,79	8,12	5,14	6,84	4,31	5,56	6,34	
R17		6,33	6,28	3,29	3,59	7,84	5,89	3,34	4,44	4,67	3,88	3,70	5,43	
R18		6,73	7,56	6,75	4,28	7,86	7,49	7,04	5,43	6,26	4,97	5,76	8,19	
Média ± DP	5,65 ± 1,38	5,61 ± 1,83	5,69 ± 1,90	3,61 ± 0,46	6,22 ± 1,54	7,84 ± 1,68	5,92 ± 1,93	5,34 ± 0,52	8,74 ± 5,15	5,16 ± 1,56	4,90 ± 0,83	6,24 ± 1,08		

DP - Desvio Padrão; T₀ - antes do início da exposição; T₁ - final da primeira semana (7º dia); T₂ - final da segunda semana (14º dia); T₃ - final da terceira semana (21º dia); T₄ - fim do tratamento (28º dia). *valores excluídos

Tabela B5 - Valores experimentais obtidos para a percentagem de DNA na cauda e tamanho da cauda, no ensaio do Cometa no rim de ratinho, para cada grupo.

		Grupo Controlo				Grupo exposto à dose 1				Grupo exposto à dose 2			
		Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III
Média da % DNA na cauda	R1	5,67	4,86	7,85		R7	5,64	6,51	8,65	R13	4,81	6,38	7,01
	R2	6,50	5,59	7,29		R8	5,56	6,69	5,10	R14	5,52	7,66	7,10
	R3	5,99	6,76	7,28		R9	6,13	8,72	6,11	R15	6,52	8,46	6,64
	R4	6,43	6,52	5,77		R10	4,14	7,57	4,41	R16	5,74	7,93	6,92
	R5	7,76	6,35	4,79		R11	5,92	7,21	5,51	R17	5,32	5,78	5,72
	R6	5,22	6,29	4,80		R12	5,56	8,65	5,89	R18	6,56	6,28	7,12
	Média ± DP	6,26 ± 0,88	6,06 ± 0,71	6,30 ± 1,35		Média ± DP	5,49 ± 0,70	7,56 ± 0,95	5,94 ± 1,45	Média ± DP	5,74 ± 0,69	7,08 ± 1,08	6,75 ± 0,53
Média do tamanho da cauda (µm)	R1	5,47	7,82	7,52		R7	6,13	8,24	9,22	R13	5,73	7,93	8,38
	R2	5,95	6,68	7,65		R8	6,27	7,50	6,21	R14	7,16	8,54	8,37
	R3	5,88	6,86	7,87		R9	6,65	9,52	7,98	R15	6,80	9,81	7,65
	R4	6,91	7,37	6,93		R10	4,09	9,08	4,86	R16	5,76	9,12	7,28
	R5	9,45	7,04	6,25		R11	6,86	8,26	6,38	R17	5,90	6,35	6,29
	R6	5,06	6,82	5,44		R12	6,35	9,69	7,53	R18	7,36	6,66	8,34
	Média ± DP	6,45 ± 1,59	7,10 ± 0,42	6,94 ± 0,94		Média ± DP	6,60 ± 1,00	8,72 ± 0,85	7,03 ± 1,53	Média ± DP	6,45 ± 0,74	8,07 ± 1,37	7,72 ± 0,83

DP - Desvio padrão.

Tabela B6 - Valores experimentais obtidos para a percentagem de DNA na cauda e tamanho da cauda, no ensaio do Cometa no baço de ratinho, para cada grupo.

	Grupo Controlo				Grupo exposto à dose 1				Grupo exposto à dose 2			
	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III
Média da % DNA na cauda	R1	4,69	5,86	4,57	R7	5,69	5,88	5,74	R13	4,22	4,55	6,93
	R2	4,33	6,66	5,31	R8	4,42	5,40	4,41	R14	4,51	7,25	4,42
	R3	7,39	6,78	4,58	R9	4,91	5,28	6,74	R15	6,00	5,38	6,00
	R4	4,26	5,55	5,04	R10	3,82	5,82	4,88	R16	4,43	5,61	4,63
	R5	5,07	6,40	4,68	R11	4,18	6,56	3,21	R17	3,85	5,05	5,06
	R6	5,01	7,13	5,65	R12	5,95	5,51	5,58	R18	3,95	5,87	4,57
	Média ± DP	5,13 ± 1,16	6,40 ± 0,59	4,97 ± 0,44	Média ± DP	4,83 ± 0,85	5,74 ± 0,46	5,09 ± 1,22	Média ± DP	4,49 ± 0,78	5,62 ± 0,92	5,27 ± 0,99
Média do tamanho da cauda (µm)	R1	6,47	7,19	5,78	R7	6,80	5,72	7,55	R13	4,78	5,13	7,38
	R2	4,51	6,84	6,97	R8	4,93	6,11	5,50	R14	5,62	9,75	5,30
	R3	8,84	7,78	5,17	R9	5,76	5,61	7,71	R15	7,76	5,34	6,51
	R4	4,32	6,36	5,37	R10	3,92	5,62	5,20	R16	4,99	5,93	4,62
	R5	5,50	6,95	4,84	R11	4,27	6,18	3,64	R17	3,99	4,95	5,35
	R6	4,76	6,49	5,37	R12	5,91	5,64	5,18	R18	3,96	5,98	4,72
	Média ± DP	5,73 ± 1,71	6,93 ± 0,51	5,58 ± 0,74	Média ± DP	5,27 ± 1,09	5,81 ± 0,26	5,79 ± 1,56	Média ± DP	5,18 ± 1,41	6,18 ± 1,80	5,65 ± 1,08

DP - Desvio padrão.

Tabela B7 - Valores experimentais obtidos para a percentagem de DNA na cauda e tamanho da cauda, no ensaio do Cometa no fígado de ratinho, para cada grupo.

	Grupo Controlo				Grupo exposto à dose 1				Grupo exposto à dose 2			
	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III	Ratinho	Sem enzima	Com FPG	Com ENDO III
Média da % DNA na cauda	R1	4,47	5,30	4,03	R7	3,20	4,62	5,62	R13	3,10	4,96	4,63
	R2	2,83	5,10	4,18	R8	3,66	4,90	4,32	R14	4,46	5,42	4,05
	R3	4,02	4,16	3,86	R9	3,17	5,89	3,81	R15	4,28	4,59	4,51
	R4	3,98	6,45	3,45	R10	3,68	5,63	3,22	R16	4,01	4,54	3,57
	R5	3,74	4,59	4,68	R11	3,42	4,62	3,39	R17	4,65	5,80	4,75
	R6	3,65	5,39	5,40	R12	3,91	7,34	4,83	R18	3,83	5,36	3,76
	Média ± DP	3,78 ± 0,55	5,17 ± 0,78	4,27 ± 0,69	Média ± DP	3,51 ± 0,29	5,50 ± 1,05	4,20 ± 0,92	Média ± DP	4,06 ± 0,55	5,11 ± 0,50	4,21 ± 0,49
Média do tamanho da cauda (µm)	R1	5,92	7,00	4,31	R7	2,99	4,90	7,93	R13	3,30	5,91	5,42
	R2	2,67	5,31	5,46	R8	3,04	6,12	4,63	R14	5,66	6,74	4,28
	R3	5,23	4,55	4,40	R9	3,01	6,23	3,63	R15	4,39	5,32	5,06
	R4	4,38	7,10	3,85	R10	3,39	6,38	3,58	R16	4,96	5,09	3,66
	R5	3,83	5,54	5,36	R11	3,45	4,86	3,46	R17	4,73	6,31	5,35
	R6	3,88	6,06	5,51	R12	4,22	9,25	5,84	R18	4,16	6,12	3,77
	Média ± DP	4,32 ± 1,14	5,93 ± 1,00	4,82 ± 0,71	Média ± DP	3,35 ± 0,47	6,29 ± 1,60	4,85 ± 1,76	Média ± DP	4,53 ± 0,80	5,92 ± 0,62	4,59 ± 0,79

DP - Desvio padrão.

ANEXO C – Dados experimentais de ensaios *in vivo* anteriores.

Tabela C1 – Resultados anteriores do ensaio do micronúcleo em sangue periférico de ratinho.

Dose (mg/Kg pc)	N	MNRET/1000 RET Média ± DP	RET (%) Média ± DP
0	5	6,10 ± 1,98	7,54 ± 1,91
ENU 120 mg/Kg pc	5	11,48* ± 4,06	1,95 ± 1,01

MNRET – Reticulócitos micronucleados; RET – reticulócitos; DP – Desvio Padrão; pc – peso corporal; *aumento estatisticamente significativo em comparação com o controlo negativo ($p < 0,001$). ENU foi administrado via injeção intravenosas.

Tabela C2 – Resultados do ensaio do cometa em órgãos de ratinho anterior. Grupo de controlo negativo, e positivo da experiência.

	Dose	Média da % de DNA na cauda (±DP)
Fígado	0	3,44 ± 0,53
	ENU 120 mg/Kg pc	20,8* ± 4,35
	H ₂ O ₂ 10 mM	18,74 ± 12,44
	H ₂ O ₂ 100 mM	16,4 ± 6,32
Baço	0	3,85 ± 0,42
	ENU 120 mg/Kg pc	4 ± 0,48
	H ₂ O ₂ 10 mM	23,31
	H ₂ O ₂ 100 mM	15,86

Os valores apresentados em ENU 120 mg/kg pc representam o valor médio da % de DNA na cauda (±DP) de 5 ratinhos, tratados com 120 mg/kg pc de ENU, por uma única injeção intraperitoneal (IP) e analisados ao fim de 28 dias de exposição. Lâminas com células de ratinhos não tratados foram mergulhadas em H₂O₂. *aumento estatisticamente significativo em comparação com o controlo negativo ($p=0,009$).

Tabela C3 – Resultados anteriores da frequência de mutantes (FM) *lacZ* no fígado de ratinhos transgênicos C57BL/6 do grupo de controlo e do grupo expostos à dose de ENU 120 mg/Kg pc.

Diluição de 1:1000				
Dose (mg/Kg pc)	Total UFC	UFC Mutantes	FM (x10 ⁻⁵)	Média FM ± DP (x10 ⁻⁵)
0	801000	68	8,5	11,9 ± 2,3
	108000	79	13,8	
	680000	87	12,8	
	571000	61	10,7	
ENU 120 mg/Kg pc	432000	216	50	51,0* ± 9,4
	230000	36	39,1	
	385000	180	46,8	
	162000	89	54,9	
	378000	243	64,3	

Via de administração por injeção intravenosa; ENU dissolvido em DMSO e depois diluído em PBS.

UCF – Unidades formadoras de colónias; DP – Desvio padrão; pc – peso corporal;

* Aumento significativo comparado com o controlo negativo ($p < 0,050$).