

Ana Cecília de Abreu Silva



Biomarcadores de Contaminação Ambiental

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Ana Cecília de Abreu Silva

Biomarcadores de Contaminação Ambiental

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Biomarcadores de Contaminação Ambiental

Declaro que o presente trabalho foi realizado na íntegra por mim e que todo o material bibliográfico consultado se encontra devidamente referenciado.

A aluna:

Ana Cecília de Abreu Silva

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho.

Porto, 2016

RESUMO

A presença de um xenobiótico no ambiente representa sempre um risco para os organismos vivos e para o meio onde estes habitam. Um dos métodos para avaliar a exposição aos xenobióticos e o seu potencial impacto sobre os seres vivos baseia-se na utilização dos chamados biomarcadores. Estes podem fornecer indicações da exposição, efeito e suscetibilidade individual a compostos químicos ambientais e são ferramentas muito úteis para avaliar e controlar o risco de danos a longo prazo associados à exposição a xenobióticos, tais como metais pesados, hidrocarbonetos halogenados, pesticidas, fármacos, entre outros. Este trabalho pretendeu realizar uma revisão bibliográfica atual sobre a importância dos biomarcadores na monitorização ambiental, focando-se nos seguintes aspetos: definição e áreas de aplicabilidade, vantagens e limitações, e tipos de biomarcadores: de danificação oxidativa, de neurotoxicidade, de biotransformação, de desregulação endócrina, histopatológicos e de genotoxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: biomarcador ambiental; poluente; xenobiótico; biomarcador de exposição; biomarcador de efeito; biomarcador de suscetibilidade.

ABSTRACT

The presence of xenobiotic compounds in the environment always poses a risk to its inhabitants and to their habitat. One of the methods used to evaluate the exposure to these compounds and their potential impact on living organisms is through the use of biomarkers. They are able to provide information about the nature of the exposure, effects and individual susceptibility to environmental chemical compounds and are also very useful tools to evaluate and control the long-term damage caused by exposure to xenobiotics, such as heavy metals, halogenated hydrocarbons, pesticides, drugs, among others. This work aimed to perform an up-to-date literature review on the importance of biomarkers in environmental monitoring focused on the following issues: definition and areas of applicability, advantages and limitations, and types of biomarkers: of oxidative damage, neurotoxicity, biotransformation, endocrine disruption, of histological damage, and genotoxicity.

KEYWORDS: environmental biomarker; pollutant; xenobiotic; biomarker of exposure; biomarker of effect; biomarker of susceptibility.

DEDICATÓRIAS

Dedico este projeto de conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas aos meus dois falecidos avôs que apesar de não me poderem apoiar neste fase final do curso, todo o seu esforço e amor fizeram de mim a ‘menina’ que sou hoje.

A ti *pappy* por seres o meu herói de contos de fadas e cowboys. Sem ti não seria a pessoa que sou. Fizeste de mim uma menina feliz, sonhadora e lutadora.

A ti José Julião por teres iniciado esta jornada no mundo das ciências farmacêuticas, aos valores que me transmitiste e a todo o amor que deste a esta princesinha.

AGRADECIMENTOS

Neste percurso de cinco anos é inevitável que muitas pessoas tenham cruzado a minha vida, pessoas essas a quem devo os meus sinceros agradecimentos:

Agradeço a todos os professores da Universidade Fernando Pessoa que se juntaram comigo nesta caminhada até ao último ano do curso. Cada um de vós contribuiu para a minha educação académica e para o meu futuro no ramo das Ciências Farmacêuticas, independentemente da disciplina que lecionam. Realço a Professora Doutora Márcia Carvalho que desde a disciplina de Toxicologia e Análises Toxicológicas I até ao término deste projeto de conclusão de curso me acompanhou de forma excecional e exemplar. A sua ajuda foi incansável e por isso lhe agradeço todos os momentos dedicados a esta minha dissertação.

À instituição Universidade Fernando Pessoa, por me ter acolhido nesta fase de progressão da minha carreira profissional.

Agradeço também aos meus pais pois sem eles não teria ingressado neste curso e agradeço toda a ajuda que me deram nestes cinco anos de curso que passaram por diferentes cidades e faculdades.

A todos vocês um obrigada especial e carinhoso!

“Quando o Homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja ele animal ou vegetal, ninguém precisará de o ensinar a amar o seu semelhante.”

Albert Schweitzer (Nobel da Paz, 1952)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS	xiv
I. INTRODUÇÃO AOS BIOMARCADORES AMBIENTAIS	1
II. CONCEITOS E ÁREAS DE APLICABILIDADE	4
<i>II.1 Definição de biomarcador</i>	4
<i>II.2 Biomarcadores de exposição</i>	5
<i>II.3 Biomarcadores de efeito</i>	7
<i>II.4 Biomarcadores de suscetibilidade</i>	8
III. ANÁLISE QUÍMICA VERSUS ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA	10
<i>III.1 Definição de teste ecotoxicológico</i>	10
<i>III.2 Exemplos de organismos utilizados em testes ecotoxicológicos</i>	12
<i>III.3 Vantagens do uso de biomarcadores de contaminação ambiental</i>	13
<i>III.4 Limitações do uso de biomarcadores de contaminação ambiental</i>	14
IV. BIOMARCADORES DE DANIFICAÇÃO OXIDATIVA	15
<i>IV.1 Biomarcadores de peroxidação lipídica</i>	16
<i>IV.2 Biomarcadores de oxidação proteica</i>	16
<i>IV.3 Sistemas antioxidantes usados como biomarcadores de danificação oxidativa</i>	17
<i>IV.4 Metalotioneínas como biomarcadores de danificação oxidativa</i>	18
<i>IV.5 Aplicação de biomarcadores de danificação oxidativa em testes ecotoxicológicos</i>	19
V. BIOMARCADORES DE NEUROTOXICIDADE	20
<i>V.1 Inibição da acetilcolinesterase</i>	20
<i>V.2 Aplicação de biomarcadores de neurotoxicidade em testes ecotoxicológicos</i>	22
VI. BIOMARCADORES DE BIOTRANSFORMAÇÃO	23
<i>VI.1 Alterações nas enzimas metabólicas de Fase I</i>	24
<i>VI.2 Alterações nas enzimas metabólicas de Fase II</i>	26
<i>VI.3 Aplicação de biomarcadores de biotransformação em testes ecotoxicológicos</i>	27
VII. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS	29
<i>VII.1 Alterações histopatológicas como biomarcadores</i>	30
<i>VII.2 Alterações histopatológicas nas brânquias</i>	30

<i>VII.3 Alterações histopatológicas no fígado</i>	31
<i>VII.4 Aplicação de biomarcadores histológicos em testes ecotoxicológicos</i>	31
VIII. BIOMARCADORES DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA	33
<i>VIII.1 As hormonas sexuais como desreguladores endócrinos</i>	34
<i>VIII.2 Ação dos desreguladores endócrinos no meio ambiente</i>	36
<i>VIII.3 A vitelogenina como biomarcador de exposição estrogénica</i>	37
IX. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	39
<i>IX.1 Ensaio de genotoxicidade</i>	39
<i>IX.1.1 Teste de Ames</i>	40
<i>IX.1.2 Teste do micronúcleo</i>	41
<i>IX.1.3 Ensaio do cometa</i>	42
<i>IX.2 Aplicação de biomarcadores de genotoxicidade em testes ecotoxicológicos</i>	43
X. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Biomarcadores de dose interna das substâncias químicas para as quais o principal mecanismo de interação ocorre a nível molecular (adaptado de Amorim, 2013). **6**
- Figura 2.** Diagrama esquemático dos indicadores biológicos, ilustrando uma resposta progressiva do organismo à exposição a um agente químico e os fatores de suscetibilidade que podem influenciar as etapas desta progressão (adaptado de Amorim, 2013). **8**
- Figura 3.** Diferentes abordagens biológicas para a medição da toxicidade de compostos químicos e os seus efeitos no compartimento aquático (adaptado de Connon et al., 2012). **11**
- Figura 4.** Colónia de *Vibrio fischeri* (adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). **12**
- Figura 5.** *Daphnia magna* (pulga-da-água) (adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). **13**
- Figura 6.** *Pseudokirchneriella subcapita* em amostra de água doce (adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). **13**
- Figura 7.** Interligação das funções dos agentes oxidantes enzimáticos (adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). **18**
- Figura 8.** Etapas envolvidas na síntese e libertação de acetilcolina (ACh). Após o estímulo, há libertação de ACh na fenda sináptica, por exocitose, que se liga aos seus recetores. Posteriormente, a ACh é hidrolisada em colina e acetato através da ação da enzima acetilcolinesterase. A colina é recaptada e reutilizada para a síntese de acetilcolina, sendo depois armazenada em vesículas (adaptado de Santos, 2009). **21**

Figura 9. Vias de fase I e II envolvidas na biotransformação de xenobióticos (adaptado de George, 1994). **24**

Figura 10. Representação simplificada do destino dos xenobióticos nas células hepáticas. (I) Mecanismo possível para a destoxificação ou toxicidade. (II) Mecanismo possível para a indução enzimática. AhR, recetor aril hidrocarboneto; HSP90, proteína de choque térmico de 90KDa; ARNT, translocador nuclear do recetor Ah; DREs, elementos de resposta às dioxinas; Cyt P450s, isoenzimas de citocromo P450; GSTs, glutationa-S-transferases; UDP-GTs, UDP-glucuronil transferases. **26**

Figura 11. Representação esquemática dos efeitos observados em solos contaminados com prometrina (adaptado de Boulahia *et al.*, 2016). **28**

Figura 12. Desreguladores endócrinos com elevada potência estrogénica (adaptado de Jonhson e Sumpter, 2001). **36**

Figura 13. Procedimento geral do teste de Ames (adaptado de Mortelman e Zeiger, 2000). **41**

Figura 14. Resultados do ensaio do cometa. (A) Classes de dano genotóxico: 0, nulo ou mínimo; 1, baixo; 2, médio; 3, elevado; 4, extremo. (B) Peixes controlo. (C) Peixes expostos a eritromicina 0,4 µg/L (exposição crónica)) (Fonte: Rodrigues, S., Antunes, S. C., Correia, A. T., Nunes, B. Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of *Oncorhynchus mykiss*, Science of Total Environment, 2016). **43**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de biomarcadores promissores na avaliação da exposição a compostos químicos e estado de saúde de peixes selvagens no compartimento aquático.

7

Tabela 2. Biomarcadores de suscetibilidade para alguns agentes químicos.

9

LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AhR	Recetor aril hidrocarboneto (do inglês <i>Aryl hydrocarbon Receptor</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APx	Ascorbato peroxidase
ARNT	Translocador nuclear do recetor Ah
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CE ₅₀	Concentração efetiva 50
ChE	Colinesterase
CL ₅₀	Concentração letal 50
CYP	Citocromo P450
CYP P450	Isoenzima de citocromo P450
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifenildicloroetano
DRE	Elemento de resposta às dioxinas
ED	Desregulador endócrino (do inglês <i>Endocrine Disruptor</i>)
EEG	Eletroencefalograma
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>)
EROD	Etoxiresorufina <i>O</i> -deetilase
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
GA	Ácido glucorónico (do inglês <i>Glucuronic Acid</i>)
GPx	Glutationa peroxidase
GRed	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa- <i>S</i> -transferase
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSP90	Proteína de choque térmico de 90KDa
MDA	Malonildialdeído

MFO	Sistema oxidase de função mista (do inglês <i>Mixed Function Oxidase</i>)
MS	Espectrometria de massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MT	Metalotioneína
PCB	Bifenilos policlorados
PCDD	Dibenzodioxinas policloradas (do inglês <i>PolyChlorinated DibenzoDioxins</i>)
PCDF	Dibenzofuranos policlorados (do inglês <i>PolyChlorinated DibenzoFurans</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBT	Tributilestanho
UDP	Glucuronil transferase
UT	Unidade de toxicologia
TCDD	Tetraclorodibenzeno- <i>p</i> -dioxina

I. INTRODUÇÃO AOS BIOMARCADORES AMBIENTAIS

Com o crescimento exponencial da industrialização e da urbanização verificado nas últimas décadas, aliado à falta de tratamento adequado dos seus produtos e destino impróprio dos resíduos sólidos, líquidos e voláteis, os ecossistemas aquáticos e terrestres têm vindo a sofrer grandes impactos decorrentes desses mesmos processos. Muitos desses contaminantes podem sofrer um processo de bioacumulação e posterior biomagnificação nos distintos níveis tróficos através da cadeia alimentar, atingindo, desta forma, locais distantes do ponto inicial de descarga (Amorim, 2003).

É frequente medir o impacto de um determinado xenobiótico presente no meio ambiente apenas quando a sua presença implica a alteração ou a destruição do equilíbrio de um ecossistema. Esta política, no entanto, não traduz respostas sobre os efeitos adversos que estas substâncias vêm a causar nos organismos vivos presentes nos ecossistemas terrestres e aquáticos (Barrett *et al.*, 1997).

Para o estabelecimento da condição homeostática destes ecossistemas naturais é necessário a sua monitorização, permitindo a adoção de medidas de prevenção e precaução adequadas. No entanto, a monitorização ambiental não se deve basear exclusivamente em análises químicas de amostras ambientais, pois estas não são apropriadas na indicação e predição dos efeitos deletérios causados por contaminantes no biota (Silva, 2013). Desta forma, na biomonitorização da contaminação ambiental devem ser incluídas ferramentas biológicas que forneçam respostas quanto aos efeitos que estes compostos podem vir a causar. Uma destas ferramentas biológicas são os biomarcadores (ou indicadores biológicos) que podem ser definidos como as alterações moleculares, bioquímicas, celulares, ou mudanças fisiológicas nas células, fluídos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativas da exposição ou efeito decorrente da exposição a um xenobiótico (Ryan *et al.*, 2007). A necessidade de detetar e avaliar o impacto das substâncias poluentes, especialmente em concentrações baixas, subletais, na monitorização da qualidade ambiental, levou à avaliação e medição de uma gama de respostas biológicas em diversas espécies. Entre os inúmeros biomarcadores ecotoxicológicos propostos nos últimos anos, aqueles baseados na resposta ao nível molecular e celular traduzem respostas sobre os primeiros sinais de perturbação

ambiental. O uso deste tipo de biomarcadores mostra ser uma ferramenta sensível de alerta para os efeitos biológicos medidos em avaliações da qualidade ambiental. Como os aspetos comuns entre organismos diferentes se acentuam principalmente ao nível molecular, muitos biomarcadores possuem a vantagem de poderem ser aplicados a uma ampla variedade de organismos vivos. Uma das características mais importantes dos biomarcadores moleculares/celulares é que a sua avaliação antecipa mudanças nos níveis superiores da organização biológica (população, comunidade ou ecossistema). De facto, no período que precede as manifestações da doença ou morte, os organismos podem responder ao dano através de alterações que ocorrem a nível molecular e celular sendo, por isso, que os biomarcadores podem ser usados de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas medidas de biorremediação antes que ocorram danos ecológicos irreversíveis e de consequências severas. Estas ferramentas são de grande importância na avaliação da exposição e dos efeitos dos diferentes xenobióticos, tais como metais pesados, compostos de matriz orgânica, compostos organometálicos e pesticidas, podendo estes ser medidos através de diferentes abordagens moleculares (Silva, 2013).

Outra característica importante dos biomarcadores é que estes podem detetar a exposição ou os efeitos tóxicos de compostos que são rapidamente metabolizados e eliminados do organismo, como é o caso dos compostos organofosforados resultantes da atividade agrícola (Ryan *et al.*, 2007). Nas análises ecotoxicológicas é recomendado o uso de diferentes espécies de biomarcadores, uma vez que a avaliação de uma única resposta biológica pode não refletir de forma ampla os danos causados aos organismos de um dado ambiente poluído; contudo, é igualmente importante que seja feita a escolha mais apropriada da espécie indicadora da qualidade do ambiente em estudo. O uso de biomarcadores na monitorização ambiental requer um profundo conhecimento das funções biológicas dos organismos utilizados. Além disso, é necessário identificar todas as possíveis variações naturais que possam influenciar essas respostas para padronizar o processo analítico. Além da pertinência das respostas biológicas estudadas como potenciais biomarcadores de dano ambiental, é igualmente importante avaliar a influência exercida pelas variações naturais causadas por fatores intrínsecos e extrínsecos, para diferenciar os efeitos da poluição dos da influência de outros fatores ambientais e de variações fisiológicas sazonais normais de um possível biomarcador (Links e Groopman, 2010).

Cada vez mais o Homem se apercebe que a sua marca ecológica no meio ambiente se traduz num impacto negativo na biosfera. Apesar da melhoria da sua qualidade de vida, devido aos avanços nas áreas da saúde, indústria, agricultura e aquacultura, os indícios de perturbações ou mesmo de destruição do equilíbrio dos ecossistemas naturais são hoje em dia notáveis. Dado que os recursos naturais disponíveis ao Homem são limitados e finitos, devem-se adotar medidas de precaução e prevenção de forma a praticar uma gestão de desenvolvimento sustentável necessária para assegurar que as próximas gerações também poderão usufruir desses mesmos (Grandjean, 1995).

O presente trabalho teve como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica sobre a temática supra referida, procurando-se demonstrar a importância dos biomarcadores como ferramentas capazes de identificar de forma precoce efeitos histopatológicos, neurotóxicos, genotóxicos, de desregulação endócrina, de biotransformação e de daniificação oxidativa devido à exposição a determinados xenobióticos nos diferentes compartimentos ambientais (água, ar, solo e biota).

A pesquisa bibliográfica foi efetuada em bases de dados científicas como a PubMed, Science Direct (Elsevier), Web of Science, Springer e Wiley Interscience, utilizando as palavras-chave “environmental”, “biomarker”, “pollutant”, “xenobiotic”, “biomarker of exposure”, “biomarker of effect”, “biomarker of susceptibility”. Os critérios de inclusão foram a respeito pelas palavras-chave, artigos científicos escritos em Português, Inglês e Francês e o acesso aos artigos na sua versão completa.

Foi ainda recolhida informação em livros didáticos e websites governamentais, usando o motor de busca “Google”. Esta pesquisa foi contínua ao longo do desenvolvimento deste trabalho, tendo-se realizado desde setembro de 2015 a setembro de 2016.

II. CONCEITOS E ÁREAS DE APLICABILIDADE

II.1 Definição de biomarcador

Uma questão que desde logo se levanta quando se aborda a temática dos biomarcadores é a sua própria definição, visto que a sua área de aplicação na Toxicologia e nas suas vertentes é atualmente muito vasta e abrangente. As principais áreas de aplicação e de investigação com biomarcadores incluem a Toxicologia Ambiental, a Toxicologia Clínica, a Toxicologia Ocupacional e a avaliação da segurança dos fármacos no processo de desenvolvimento de novos fármacos. De uma forma genérica, os biomarcadores constituem indicadores ou eventos sinalizadores, em amostras ou sistemas biológicos, de alterações mensuráveis a nível molecular, bioquímico, celular, fisiológico, patológico e comportamental, como resposta à exposição a xenobióticos (Gupta, 2014). Com o uso de um biomarcador pretende-se que este, de uma forma geral, seja necessariamente relevante em termos biológicos ou clínicos e que esteja relacionado com os mecanismos de toxicidade primária e com a patologia (Gupta, 2014). Deve demonstrar a existência de exposição, indicar o efeito e estabelecer a ligação entre o xenobiótico e toxicidade, sendo preditivo de efeito tóxico reduzido (Ryan *et al.*, 2007). Para além disso, o biomarcador deve ser detetado precocemente, refletindo um efeito tóxico reversível e subclínico (Gil e Hernández, 2009), pois isso permitirá a adoção de medidas preventivas (Sogorb *et al.*, 2014).

O biomarcador deverá ser específico, preciso, válido e sensível (Gupta, 2014). A sensibilidade, característica importante para a relevância do biomarcador, refere-se à sua capacidade para mostrar diferenças marcadas mesmo após níveis subtis de exposição toxicológica (Sogorb *et al.*, 2014). Deve ainda ter sensibilidade suficiente para fornecer informação sobre diferenças existentes em populações provenientes de regiões distintas e em diversos intervalos de tempo (como, por exemplo, variações sazonais e variações ao longo do tempo) (Ryan *et al.*, 2007).

O biomarcador terá de ser quantificado com confiança, de uma forma conveniente, fácil e rápida (Gil e Hernández, 2009), desejando-se naturalmente um custo razoável associado à metodologia analítica (Castro *et al.*, 2015). Outras características desejáveis

num biomarcador ideal incluem, por exemplo, a sua persistência, a sua presença numa fração importante da população, uma distribuição espacial alargada e uma ocorrência temporal adequada (Ryan *et al.*, 2007).

Os biomarcadores têm sido classificados usualmente em três grandes categorias (Sogorb *et al.*, 2014):

- **Biomarcadores de exposição**, para determinar se um organismo foi exposto a um dado xenobiótico;
- **Biomarcadores de efeito**, para determinar o efeito ou resposta do organismo exposto ao xenobiótico;
- **Biomarcadores de suscetibilidade**, para prever a suscetibilidade ou resistência do organismo face aos efeitos nocivos de um xenobiótico particular.

De um modo geral, esta classificação tradicional está alicerçada no significado toxicológico inerente a cada categoria. Pode, no entanto, existir sobreposições entre categorias, não sendo sempre simples a distinção entre elas (Manno *et al.*, 2010). De facto, em alguns casos não é possível atribuir apenas uma categoria a um dado biomarcador, pois isso dependerá do significado toxicológico particular e do contexto em que este esteja a ser utilizado (Manno *et al.*, 2010).

II.2 Biomarcadores de Exposição

Um biomarcador de exposição pode ser definido, de uma forma genérica, como sendo um composto exógeno ou um seu metabolito, ou ainda um produto da interação entre o xenobiótico ou metabolito e um componente endógeno (Manno *et al.*, 2010). Refletem a distribuição do xenobiótico ou dos seus metabolitos através do organismo, e por isso são identificados como dose interna. Consequentemente, a dose externa refere-se à concentração do agente tóxico presente no ambiente em contacto com o organismo.

Teoricamente, a distribuição do xenobiótico pode ser traçada através de vários níveis de organização biológica, como tecidos e células, até ao seu alvo de toxicidade, como é ilustrado na Figura 1 (Amorim, 2013).



Figura 1. Biomarcadores de dose interna das substâncias químicas para as quais o principal mecanismo de interação ocorre a nível molecular (adaptado de Amorim, 2013).

A exposição a um xenobiótico é a condição necessária, embora não suficiente, para que ocorram alterações nos organismos (Sogorb *et al.*, 2014). Uma exposição pode ser analisada quer numa perspectiva individual quer populacional. Os biomarcadores de exposição podem ser utilizados com diversas finalidades como, por exemplo, levar à deteção precoce de uma exposição no âmbito da ecotoxicologia, num momento em que ainda não tenham ocorrido alterações significativas na saúde do indivíduo exposto (Amorim, 2013), sendo que alguns exemplos de biomarcadores deste tipo são descritos na Tabela 1. Deste modo, podem contribuir para a prevenção primária e adoção de medidas conducentes à redução da exposição, o que é necessário em estudos epidemiológicos, e podem ainda facilitar as comparações entre níveis de exposição em diferentes compartimentos do organismo de forma a identificar diferenças de suscetibilidade (Barrett *et al.*, 2010).

Tabela 1. Exemplos de biomarcadores promissores na avaliação da exposição a compostos químicos e estado de saúde de peixes selvagens no compartimento aquático (adaptado de Connon *et al.*, 2012).

EFEITO	BIOMARCADOR	REFERÊNCIAS
Ativação do recetor aril hidrocarboneto	CYP1A (mRNA, proteínas) Atividade da EROD induzida	(Stegeman <i>et al.</i> , 1992) (Stagg <i>et al.</i> , 2000)
Ligação aos iões metálicos	Metalotioneínas	(Roesijadi e Robinson, 1994)
Desregulação endócrina	Vitelogenina mRNA CYP1A/aromatase Níveis de estrogénio	(Sumpter e Jobling, 1995) (Rotchell e Ostrander, 2003)
Efeitos genotóxicos	Teste do micronúcleo Teste de Ames Ensaio do cometa	(Pfau, 1997) (Singh <i>et al.</i> , 1991)
Danificação oxidativa	Peroxidação lipídica Enzimas de fase II e co-fatores Enzimas antioxidantes	(Stegeman <i>et al.</i> , 1992) (Van der Oost <i>et al.</i> , 2003) (Winston e Giulio, 1991)
Neurotoxicidade	Inibição da acetilcolinesterase	(Wheelock <i>et al.</i> , 2005)

II.3 Biomarcadores de efeito

Um biomarcador de efeito pode corresponder a um componente endógeno, a uma medida da capacidade funcional, ou a qualquer outro indicador do balanço ou estado do organismo, ou de um órgão afetado pela exposição (Grandjean, 2011). Estes biomarcadores refletem diferentes tipos de alterações mensuráveis no organismo, que, de acordo com a sua magnitude, podem ser reconhecidas como associadas a uma disfunção ao nível do organismo ou a uma doença potencial ou estabelecida (Gil e Hernández, 2009).

Tal como referido anteriormente, pode não existir uma distinção clara entre biomarcadores de exposição e de efeito, embora um biomarcador de efeito usualmente indique alterações em funções celulares, dos tecidos ou do organismo no seu todo (Grandjean, 2011). Consistem geralmente em alterações a nível celular, particularmente

a nível molecular e cromossômico (Links e Groopman, 2010), sendo então representados como indicadores de anomalias pré-clínicas como ilustra a Figura 2.

De um modo geral, os biomarcadores de efeito tendem a ser mais preditivos para um determinado tipo de toxicidade em particular, à medida que as alterações vão sendo mais persistentes e/ou graves, do que propriamente associados a um dado agente específico (DeCaprio, 1997).

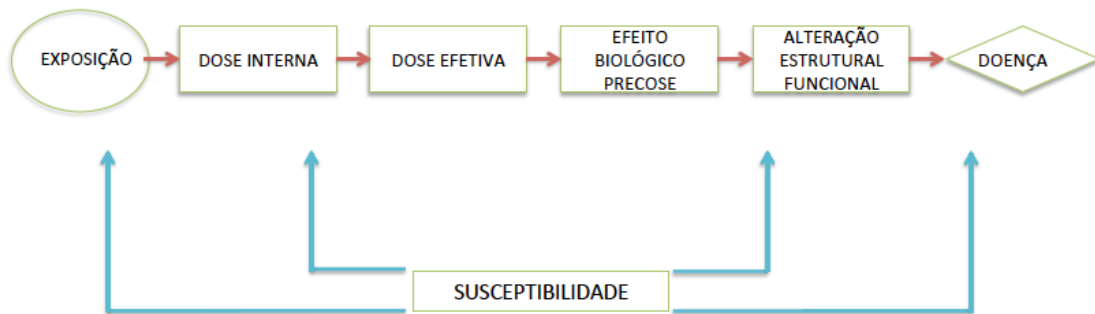


Figura 2. Diagrama esquemático dos indicadores biológicos, ilustrando uma resposta progressiva do organismo à exposição a um agente químico e os fatores de suscetibilidade que podem influenciar as etapas desta progressão (adaptado de Amorim, 2013)

II.4 Biomarcadores de suscetibilidade

A predisposição genética, bem como fatores externos tais como a idade, dieta, espécie, habitat, podem influenciar/afetar a suscetibilidade de indivíduos expostos a substâncias químicas. Embora alguns indivíduos experimentem uma exposição ambiental similar, diferenças genéticas no metabolismo podem produzir doses marcadamente diferentes no local-alvo de toxicidade e, conseqüentemente, um nível diferente de resposta. Até mesmo quando as doses críticas são similares, respostas diferentes podem ser observadas nos indivíduos devido a uma variação na suscetibilidade biológica (DeCaprio, 1997).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem refletir fatores genéticos ou adquiridos que influenciam a resposta do organismo exposto a um determinado xenobiótico. Estes são fatores pré-existent e são independentes da exposição. São predominantemente

genéticos, embora a patologia, alterações fisiológicas, medicamentos e exposição a outros agentes ambientais também possam alterar a suscetibilidade individual. Os biomarcadores de suscetibilidade identificam aqueles indivíduos na população que têm uma diferença genética ou adquirida na suscetibilidade para os efeitos da exposição a substâncias químicas exógenas. Os biomarcadores de suscetibilidade indicam quais os fatores que podem aumentar ou diminuir o risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais. A Tabela 2 mostra alguns biomarcadores de suscetibilidade estabelecidos (e/ou propostos) para alguns agentes químicos (Amorim, 2013).

Tabela 2. Biomarcadores de suscetibilidade para alguns agentes químicos (adaptado de Amorim, 2013).

BIOMARCADOR DE SUSCETIBILIDADE	AGENTE QUÍMICO	RESPOSTA FACE À EXPOSIÇÃO
Glicose 6-P desidrogenase (deficiência)	Compostos nitroaromáticos	Diminuição da resistência ao dano oxidativo
Glutathione-S-transferase	Óxido de etileno, compostos alifáticos halogenados	Diminuição da destoxificação dos intermediários epóxidos
Paroxonase	Organofosforados	Aumento da toxicidade por inibição da atividade da acetilcolinesterase
Metalotioneína	Metais	Aumento da resistência devido aos grupos -SH presentes na proteína

III. ANÁLISE QUÍMICA *VERSUS* ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA

A análise ecotoxicológica permite detetar a toxicidade da amostra como um todo, avaliando os efeitos combinados dos diferentes constituintes da amostra, enquanto a análise química permite quantificar as substâncias isoladas presentes na amostra e obter dados para a padronização de metodologias. Estas últimas representam então análises sensíveis, de elevada especificidade e também quantitativas. Este facto reveste-se da maior importância no caso das descargas de águas residuais, que apresentam uma grande complexidade, e em que o efeito global pode não corresponder à adição dos efeitos dos diferentes componentes presentes mas pode ser sinérgico (superior à adição dos valores de toxicidade dos diferentes constituintes analisados isoladamente) ou antagónico (inferior à adição dos valores de toxicidade dos diferentes constituintes analisados isoladamente) (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). Numa análise ecológica devem ser então utilizadas abordagens biológicas bem como químicas uma vez que a realização conjunta de bioensaios e de análises laboratoriais de identificação de toxicidade permitem identificar componentes tóxicos não analisados quimicamente, os chamados “poluentes-mistério”. Este tipo de avaliação é também denominado de biomonitorização (Jesus, 2009).

III.1 Definição de teste ecotoxicológico

Os testes ecotoxicológicos avaliam os efeitos adversos da exposição a diferentes concentrações de uma substância química em indivíduos de uma determinada espécie. A concentração efetiva 50 (CE₅₀) ou a concentração letal 50 (CL₅₀) corresponde à concentração da amostra responsável, respectivamente, pelo efeito ou morte em 50% dos organismos testados (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). Estes testes podem ser agudos ou crónicos, consoante a sua duração e o efeito observado. No caso dos testes agudos o efeito avaliado relaciona-se com as taxas de mortalidade, de imobilização ou de inibição de crescimento e quanto mais baixo for esse valor, mais elevada é a toxicidade da amostra, o que muitas vezes conduz a interpretações erróneas dos resultados obtidos. Deste modo, começou a utilizar-se a Unidade de Toxicidade (UT) que corresponde a $[(1/CE_{50}) \times 100]$ para a expressão dos resultados. Os testes ecotoxicológicos podem ser realizados utilizando organismos aquáticos ou terrestres

mediante o tipo de estudo. Estes estudos podem ser elaborados ao nível do indivíduo, da população, da comunidade e até do ecossistema, podendo nalguns casos prolongar-se durante vários anos. No processo de avaliação da toxicidade é de realçar a necessidade de realização de uma bateria de testes com organismos pertencentes a vários níveis tróficos diferentes, uma vez que estes organismos possuem uma sensibilidade diferente aos vários tipos de xenobióticos (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). Dependendo dos objetivos definidos para o estudo, os ensaios ecotoxicológicos podem ser realizados segundo condições padronizadas em laboratórios utilizando sistemas celulares (ensaios *in vitro*), organismos (ensaios *in vivo*) ou comunidades simples (ensaios em micro e mesocosmos), mas quando o interesse é avaliar a relevância ecológica da presença de um xenobiótico são realizados estudos de campo. Neste tipo de estudos são realizados ensaios *in situ* ou ensaios em organismos residentes do local de estudo (Connon *et al.*, 2012). A Figura 3 esquematiza as diferentes abordagens existentes. A reprodutibilidade e especificidade dos métodos diminuem com o aumento da relevância ecológica, ou seja, ocorre a diminuição da eficiência dos métodos padronizados. Os biomarcadores ajudam a colmatar esta lacuna pois estes podem ser específicos para um dado efeito e/ou xenobiótico.

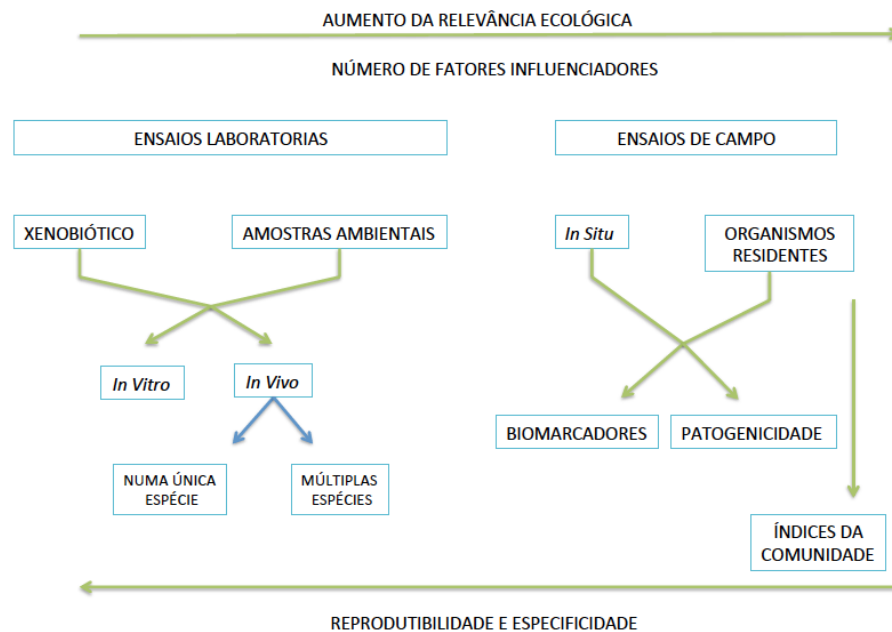


Figura 3. Diferentes abordagens biológicas para a medição da toxicidade de compostos químicos e os seus efeitos no compartimento aquático (adaptado de Connon *et al.*, 2012).

III.2 Exemplos de organismos utilizados em testes ecotoxicológicos

- *Vibrio fischeri*

O *Vibrio fischeri* é uma bactéria não patogénica de origem marinha que emite luz naturalmente. O seu metabolismo é alterado pela exposição a baixas concentrações de xenobióticos, levando a alterações na intensidade da luz emitida. Quanto mais elevado for o grau de toxicidade da exposição, maior é o grau de inibição da produção de luz (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015).

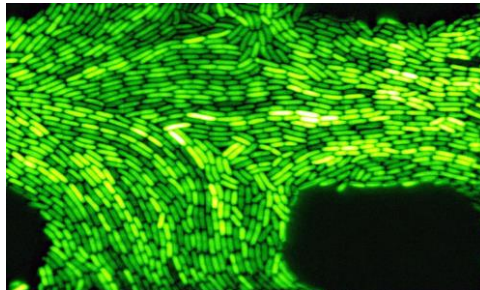


Figura 4. Colónia de *Vibrio fischeri* (adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2015).

- *Daphnia magna*

A *Daphnia magna* (pulga-da-água) é um animal aquático (consumidor primário) cuja estratégia reprodutiva pode alternar entre assexuada (partenogénese) e sexuada. Na partenogénese ocorre o crescimento e desenvolvimento de um embrião sem fertilização, levando a um aumento rápido da população. Na fase sexuada originam-se ovos de resistência (ephippium) que são capazes de sobreviver às condições desfavoráveis, prosseguindo o seu desenvolvimento quando esta situação se altera (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015).



Figura 5. *Daphnia magna* (pulga-da-água) (adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2015).

○ *Pseudokirchneriella subcapitata*

A *Pseudokirchneriella subcapitata* é uma microalga unicelular, de água doce, pertencente à Ordem *Chlorococcales*. É normalmente utilizada na avaliação dos níveis de nutrientes ou de xenobióticos em ambientes de água doce, sendo particularmente sensível à presença de metais pesados (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015).

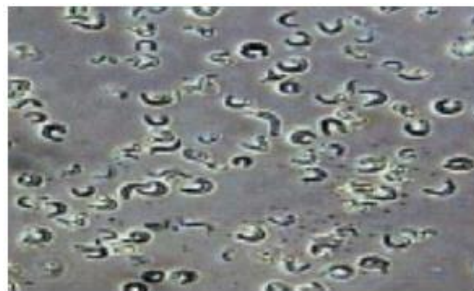


Figura 6. *Pseudokirchneriella subcapitata* em amostra de água doce (adaptado de Agência Portuguesa do Ambiente, 2015).

III.3 Vantagens do uso de biomarcadores de contaminação ambiental

Entre as vantagens do uso de biomarcadores destacam-se as seguintes (Blaise e Perceval, 2010):

- a) Fornecem uma estimativa dos efeitos letais e subletais;
- b) Medem a toxicidade quando o agente tóxico não é identificado quimicamente;
- c) Podem fornecer um sinal de alarme para os potenciais danos ambientais;

- d) Permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos;
- e) Permitem a obtenção de uma resposta global aos efeitos de contaminação;
- f) Contabilizam os efeitos das misturas tóxicas podendo um efluente quimicamente complexo ser avaliado genericamente como um poluente;
- g) Os efeitos destes testes são mais facilmente compreendidos e aceites pelas indústrias e pelo público em geral.

III.4 Limitações do uso de biomarcadores de contaminação ambiental

Dentro das limitações do uso de biomarcadores destacam-se (Blaise e Perceval, 2010):

- a) A substância tóxica não é identificada;
- b) Nos ensaios são apenas utilizadas algumas espécies das muitas presentes nos ecossistemas;
- c) Os organismos-testes não são expostos a situações de stresse durante a realização do ensaio uma vez que não ocorre variabilidade natural dos fatores ambientais;
- d) Os biomarcadores podem ser pouco previsíveis de efeitos adversos quando há limitações no conhecimento do processo de toxicidade a um dado xenobiótico;
- e) As relações entre o efeito-individual e o efeito-populacional podem diferir devido à existência de variabilidade interindividual.

IV. BIOMARCADORES DE DANIFICAÇÃO OXIDATIVA

Com a descoberta da importância dos radicais livres no mecanismo de toxicidade de vários poluentes ambientais verificou-se um aumento na aplicação de biomarcadores de danificação oxidativa nos organismos vivos, especialmente em mamíferos e em plantas expostas a poluição aérea. O potencial dos radicais livres e de outras espécies reativas de oxigênio (ROS) na indução de danos nos componentes celulares, denominado genericamente de danificação oxidativa, tem-se tornado num tópico de interesse crescente nos estudos de Toxicologia Ambiental. O equilíbrio entre fatores pró-oxidantes endógenos e exógenos (por exemplo, poluentes ambientais) e as defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas) nos organismos pode ser usado para avaliar e aferir os efeitos tóxicos subjacentes a condições ambientais de dano, especialmente do tipo oxidativo, induzido por diferentes classes de poluentes químicos. O papel dos sistemas antioxidantes e a sua sensibilidade são de grande importância para o campo da ecotoxicologia. Os metais de transição, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos organoclorados, pesticidas organofosfatados, derivados bifenilopoliclorados, dioxinas, e ainda outros xenobióticos, desempenham um papel muito importante na mecânica da danificação oxidativa. Esta situação de desequilíbrio pode ser manifestada ao nível dos componentes celulares como as membranas lipídicas, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas e ainda das enzimas antioxidantes (Sanders, 2010).

A exposição a certos xenobióticos, especialmente aos poluentes químicos tóxicos, pode-se traduzir num desequilíbrio entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes, e conseqüentemente, a uma diminuição nas defesas antioxidantes. Os radicais livres podem reagir com diversas macromoléculas celulares, tais como ácidos nucleicos, lípidos ou proteínas. Deste modo, o stresse oxidativo pode estar envolvido em processos de mutagénese, carcinogénese, processos inflamatórios, envelhecimento, aterosclerose, entre outros.

Importa ainda referir que os organismos vivos possuem a habilidade de sintetizar e controlar sistemas enzimáticos específicos que podem ser empregues na reparação e remoção de proteínas, lípidos e moléculas de ADN lesadas. Além disso, visto que os

níveis de dano oxidativo podem variar, os organismos são ainda capazes de se adaptarem a esta situação pela indução da síntese de enzimas antioxidantes de maneira a regular este tipo de danificação (Valavanidis *et al.*, 2006).

IV.1 Biomarcadores de peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica é provavelmente o processo de danificação celular mediado por radicais livres mais amplamente investigado. Contudo, dado que a análise direta a produtos endógenos de peroxidação lipídica é complicada, a maioria dos métodos empregues mede os níveis de produtos secundários de oxidação (como aldeídos e cetonas). A técnica mais usada para avaliar este processo é através da quantificação de malonildialdeído (MDA), um produto secundário resultante do ataque oxidativo aos lípidos poliinsaturados das membranas celulares. Este método experimental envolve a reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), com a formação de um complexo MDA-(TBA)₂ de tonalidade vermelha cuja absorvância é medida através de um método espectrofotométrico a 532 nm. Outro método analítico para medir o processo de peroxidação lipídica envolve a deteção de dienos conjugados, contudo, esta técnica é pouco sensível a pequenas variações do meio. Também têm sido utilizadas técnicas de cromatografia gasosa acoplada a detetor de captura de eletrões (ECD) que permitem de forma simultânea detetar diferentes produtos de peroxidação lipídica (Henriques, 2011).

IV.2 Biomarcadores de oxidação proteica

É já bem conhecido que a exposição de proteínas a ROS leva a alteração das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, fragmentação da cadeia peptídica e ligações cruzadas entre proteínas, alterando a função dessas proteínas. Este tipo de biomarcadores mede principalmente derivados proteicos do tipo carbonilo, nomeadamente os produtos finais de reações de oxidação de aminoácidos de tirosina e de fenilalanina. A oxidação da tirosina resulta na formação de ditirosina, composto que tem demonstrado ser um biomarcador de danificação oxidativa a nível celular e urinário viável. Vários métodos de identificação de aminoácidos oxidados no soro, devido a reações de oxidação mediadas por metais, têm sido desenvolvidos nos últimos anos

sendo os derivados proteicos identificados por técnicas de Espectrometria de Massa (MS) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Os biomarcadores de oxidação proteica têm sido aplicados para medições em tecidos ou plasma de organismos (Valavanidis *et al.*, 2006).

IV.3 Sistemas antioxidantes usados como biomarcadores de danificação oxidativa

A avaliação das enzimas antioxidantes permite estimar estado das defesas antioxidantes dos organismos e pode servir como biomarcadores de danificação oxidativa. Os sistemas antioxidantes não enzimáticos são fundamentalmente substâncias de baixo peso molecular, tais como a vitamina C e E, ésteres de retinol, ácido úrico, β -carotenos, glutathione (GSH), entre outras. Para a avaliação dos parâmetros de dano oxidativo também é comum recorrer-se ao estudo da atividade de algumas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GRed), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST). As enzimas antioxidantes facilitam a remoção dos ROS (Figura 7). A SOD protege as células aeróbias da ação do radical superóxido (O_2^-), catalisando a conversão deste em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Por sua vez, a moléculas de H_2O_2 pode ser reduzida a água (H_2O) e oxigénio (O_2) pela catalase. O radical de hidroxilo (HO^*) pode ser formado a partir do H_2O_2 na presença de metais de transição, como o ferro ou o cobre, através da reação de Fenton e pela interação com o radical superóxido na reação de Haber-Weiss. Este radical é altamente reativo e pode atacar proteínas e lípidos, formando produtos resultantes dos danos oxidativos. A GPx pode reduzir os peróxidos lipídicos aos seus respectivos álcoois e água. Aquando da exposição a poluentes ambientais, as defesas celulares antioxidantes nos sistemas biológicos podem ser depletadas, mas podem igualmente aumentar de forma a contornar o desequilíbrio oxidativo. As medições destas alterações podem ser usadas como biomarcadores de efeitos adversos na saúde dos organismos expostos a xenobióticos (Sanders, 2010).

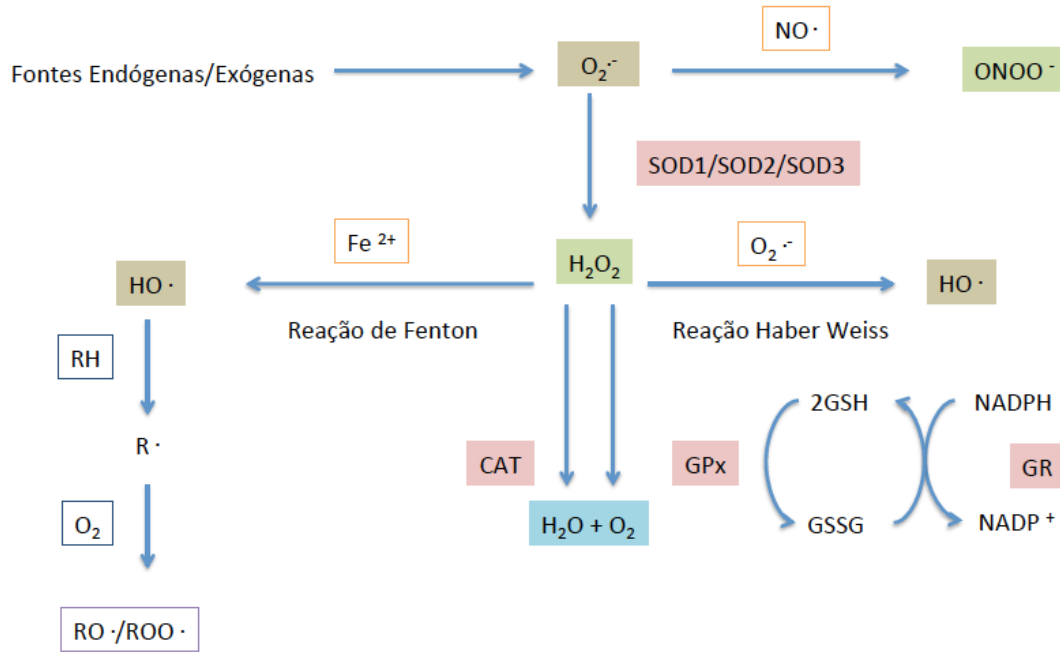


Figura 7. Interligação das funções dos agentes oxidantes enzimáticos (adaptado de (Sanders, 2010)).

IV.4 Metalotioneínas como biomarcadores de danificação oxidativa

Outros biomarcadores moleculares para a danificação oxidativa que têm sido utilizados de forma extensa em organismos aquáticos, particularmente associados à exposição a metais pesados, são as metalotioneínas (MT). Estas representam proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína, que por sua vez são constituídas por grupos tiol (-SH) que, apresentam uma elevada afinidade para os iões metálicos. A atividade das MT é induzida numa enorme variedade de espécies (mamíferos, plantas e microrganismos) e ainda em vários invertebrados marinhos devido à exposição a metais pesados. Funcionam como agentes quelantes de forma a reduzir o excesso de compostos metálicos no interior das células, desempenhando deste modo um papel importante nos mecanismos de destoxificação de metais pesados (Valavanidis *et al.*, 2006).

IV.5 Aplicação de biomarcadores de danificação oxidativa em testes ecotoxicológicos

Os invertebrados marinhos, especialmente as espécies bivalves como moluscos e ostras, têm sido frequentemente usadas como bioindicadores sensíveis de poluição aquática, dada a sua capacidade de acumular elevadas quantidades de metais pesados. Assim sendo a quantificação de metais pesados nestas espécies traduz-se numa avaliação da contaminação do meio marinho (Valavanidis *et al.*, 2006).

No estudo realizado por Nogueira (2013), pretendeu-se avaliar se a glândula digestiva de mexilhões da espécie *Perna perna* sofria alguma alteração a nível de peroxidação lipídica quantificado pela concentração de malondialdeído em tempos de exposição de 6h, 12h, 48h e 168h, a concentrações de 0,01 e 0,1 mL/L de biodiesel B5. Verificou-se que a concentração de MDA sofreu alterações após seis horas de exposição ao biodiesel em que esta diferença foi relacionada com o aumento da concentração de MDA no grupo exposto a 0,1 mL/L de B5 em relação ao grupo exposto a uma concentração de 0,01 mL/L.

A espécie dulçaquícola *Gambusia holbrooki* também tem sido utilizada de forma rotineira para aferir a contaminação aquática com produtos farmacêuticos como fármacos psicoativos (fenitoína, carbamazepina, diazepam). De uma forma geral, os resíduos farmacêuticos, que são persistentes no meio ambiente, podem estimular a produção de ROS e resultar em dano oxidativo nestes organismos. Neste tipo de aferições avalia-se o efeito da exposição aguda destes produtos nas brânquias e fígado da espécie animal, quantificando-se a atividade das enzimas glutathione-S-transferases (Henriques, 2011).

V. BIOMARCADORES DE NEUROTOXICIDADE

A neurotoxicidade é definida como qualquer efeito adverso numa estrutura ou função do Sistema Nervoso Central (SNC) e/ou Sistema Nervoso Periférico (SNP) devido à exposição a um agente biológico, químico, ou físico que apresenta a capacidade de comprometer a sobrevivência do organismo exposto ou a sua capacidade de se reproduzir e de se adaptar ao seu meio envolvente (Slikker e Bowyer, 2005).

Os biomarcadores de neurotoxicidade permitem avaliar, através de métodos acessíveis, a ação de um agente químico no SNC. O estudo destas alterações bioquímicas pode possibilitar a identificação precoce de uma exposição excessiva e avaliar a neurotoxicidade para prevenir o aparecimento de efeitos ou danos irreversíveis. Entretanto, a escolha dos biomarcadores neurológicos não é fácil e nem sempre é possível. É necessário que os parâmetros periféricos sejam equivalentes ou então correlacionáveis funcionalmente ao parâmetro correspondente no SNC. Esta correspondência deve ser comprovada através de estudos experimentais que demonstrem que o parâmetro sob investigação tem a mesma característica bioquímica e funcional daquele presente no SNC; e que as alterações quimicamente induzidas neste parâmetro ocorrem do mesmo modo nos dois sistemas (periférico e central) (Amorim, 2003).

V.1 Inibição da acetilcolinesterase

A análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) é um dos biomarcadores mais usados para avaliar neurotoxicidade. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor sintetizado nos terminais axonais a partir de colina e acetilcoenzima A, que permite a transmissão de impulsos nervosos através das fendas sinápticas. A AChE é uma enzima fundamental do sistema nervoso cuja função é promover a hidrólise da ACh em acetato e colina nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares como ilustrado na Figura 8.

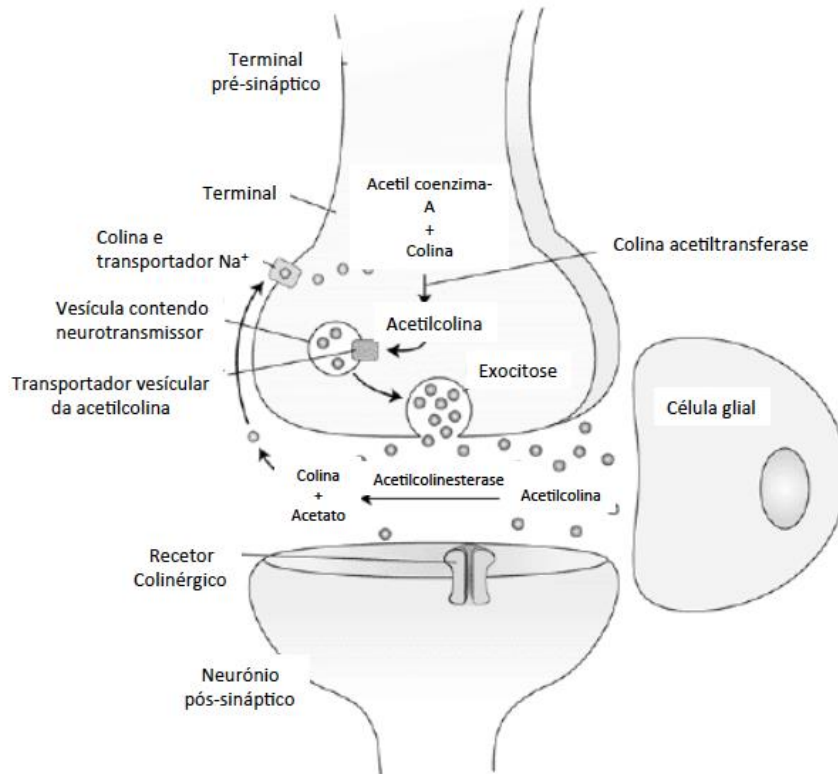


Figura 8. Etapas envolvidas na síntese e liberação de acetilcolina (ACh). Após o estímulo, há liberação de ACh na fenda sináptica, por exocitose, que se liga aos seus receptores. Posteriormente, a ACh é hidrolisada em colina e acetato através da ação da enzima acetilcolinesterase. A colina é recaptada e reutilizada para a síntese de acetilcolina, sendo depois armazenada em vesículas (adaptado de Santos, 2009).

Um grande número de contaminantes ambientais incluindo os inseticidas das classes dos organofosforados e carbamatos, metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem afetar a atividade da AChE. O mecanismo de toxicidade traduz-se na inibição da enzima, resultando na acumulação de acetilcolina nas fendas sinápticas e a alterações da funcionalidade do SNC, levando a alterações de comportamento e mesmo à morte do organismo (Santos, 2009).

A atividade desta enzima tem um significado relevante na investigação dos efeitos biológicos de misturas complexas de contaminantes no meio aquático, pois a inibição enzimática de organismos contaminados frequentemente persiste por longos períodos de tempo. Porém, quando se utiliza biomarcadores em programas de monitorização ambiental, a variabilidade biológica é expectável e alguns fatores devem ser levados em consideração como a temperatura, a salinidade da água e o peso corporal. Podem ser

usadas outras técnicas, tais como a análise da expressão génica da AChE e estudos *in vitro* com células neuronais de peixe, para se aprofundar o conhecimento sobre os efeitos neurotóxicos dos contaminantes e detetar alterações precoces (Assis, 2012).

Os inibidores mais conhecidos das colinesterases (ChE), especialmente da AChE a nível neuronal, são os pesticidas pertencentes aos grupos dos organofosforados e carbamatos. Estes geralmente apresentam uma baixa persistência a nível ambiental, especialmente quando comparados aos pesticidas organoclorados. Os compostos organofosforados fosforilam a AChE de forma irreversível o que impede a hidrólise da acetilcolina levando à sua acumulação nas sinapses muscarínicas e nicotínicas. Este fenómeno resulta numa contínua propagação de impulsos nervosos, pois não ocorre o fenómeno de despolarização sináptica, provocando paralisia dos músculos incluindo os necessários ao processo respiratório e paragem do batimento cardíaco. Os sinais e sintomas de intoxicação por carbamatos são semelhantes à dos organofosforados diferindo apenas na duração e na intensidade da toxicidade. A curta duração da ação e os efeitos ligeiros ou moderados dos carbamatos comparativamente aos organofosforados deve-se ao facto de inibirem de forma reversível a acetilcolinesterase (hidrólise com regeneração da enzima) e serem rapidamente biotransformados *in vivo* (Jebali *et al.*, 2013).

V.2 Aplicação de biomarcadores de neurotoxicidade em testes ecotoxicológicos

No estudo realizado por Jebali *et al.* (2013) quantificaram-se as acetilcolinesterases no cérebro e tecido muscular da espécie de carpa *Cyprinus carpio* que, tem sido amplamente usada muito frequentemente como organismo sentinela em programas de biomonitorização e em ensaios de toxicidade. As amostras foram recolhidas em três lagos turcos submetidos a diversas condições ambientais adversas. Verificou-se uma inibição marcada da atividade da AChE provando assim existir uma forte relação entre a inibição da AChE no cérebro de *C. carpio* e os resíduos de pesticidas organofosforados existentes na água e no tecido adiposo da espécie aquática.

VI. BIOMARCADORES DE BIOTRANSFORMAÇÃO

O termo “biotransformação” refere-se ao metabolismo de substâncias exógenas (xenobióticos), sendo que, em mamíferos, aplicam-se especialmente às reações de destoxificação que ocorrem no fígado. Os metabolitos resultantes são geralmente mais polares do que as substâncias que os originaram e quimicamente distintos. O aumento de polaridade implica difusão mais lenta através das membranas celulares em relação ao composto parental sendo que estes metabolitos tendem a ser eliminados de uma forma mais rápida do organismo, dado que a sua reabsorção nos túbulos renais é reduzida. Quando os compostos exógenos se referem a fármacos, o processo de biotransformação pode implicar a diminuição da atividade farmacológica (conversão do fármaco a um metabolito biologicamente menos ativo). Por vezes, as reações metabólicas podem resultar na produção de compostos farmacologicamente mais ativos ou de substâncias tóxicas (bioativação), em consequência das transformações promovidas na estrutura química inicial. As modificações moleculares decorrentes podem alterar significativamente a interação do novo composto com os recetores endógenos, o que resulta em alterações biológicas acentuadas (Costa *et al.*, 2004).

O processo de biotransformação envolve uma série de reações mediadas enzimaticamente, que tornam estes compostos mais passíveis de serem eliminados do organismo (Van der Oost *et al.*, 2003). Quantitativamente, o fígado é o principal órgão onde ocorre a metabolização de xenobióticos, embora todos os tecidos biológicos possuam alguma capacidade metabólica, como por exemplo as células epiteliais do trato gastrointestinal, pulmões, rins e pele. A biotransformação de xenobióticos inclui duas fases normalmente conhecidas como reações de fase I e reações de fase II. As reações envolvidas na fase I incluem as de oxidação, redução e hidrólise. Durante a fase I, o xenobiótico pode adquirir grupos polares como: -OH, -NH₂, -COOH ou -SH. Já as reações de fase II são reações de conjugação com substâncias endógenas, que incluem a glicina, a cisteína, a glutatona, o ácido glucurónico (GA), os sulfatos e ainda outros compostos solúveis em água. Muitos xenobióticos (por exemplo, poluentes ambientais) sofrem, de forma sequencial, as modificações da fase I e fase II, enquanto outros sofrem reações apenas de fase II, como ilustrado na Figura 9. Os compostos lipofílicos, nas reações envolvendo as duas fases, são primeiramente oxidados e, assim um grupo

funcional é introduzido na molécula. Esse grupo é, então, conjugado por enzimas de conjugação a uma molécula polar, facilitando a excreção deste. A atividade das enzimas envolvidas no metabolismo pode ser induzida ou inibida face à exposição a xenobióticos. A indução enzimática corresponde ao aumento da quantidade ou atividade destas enzimas ou, em alguns casos, ambos. No caso da inibição, a atividade enzimática é bloqueada, possivelmente devido a uma forte ligação (como o estabelecimento de uma ligação covalente) ou formação de um complexo entre a enzima e o composto inibidor (Parkinson e Ogilvie, 2010).

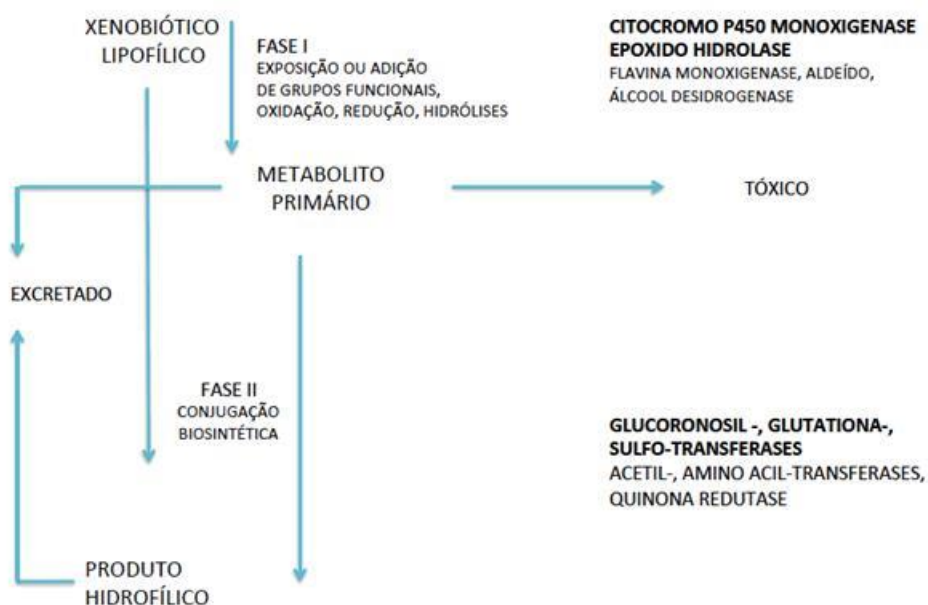


Figura 9. Vias de fase I e II envolvidas na biotransformação de xenobióticos (adaptado de George, 1994).

VI.1 Enzimas de Fase I

A fase I inclui reações de oxidação, redução e hidrólise, denominadas reações de funcionalização, pela introdução de um grupo funcional na molécula que está a ser sujeita ao metabolismo endógeno (adição de um grupo -OH, -COOH, -NH₂). As reações de fase I são catalisadas por monoaminoxidases, flavinas e monoxigenases microsossomais, também conhecidas como o sistema oxidase de função mista (MFO) ou sistema citocromo P450 (constituído por citocromo P450, citocromo b5 e a redutase NADPH citocromo P450). A molécula biotransformada torna-se mais hidrofílica,

podendo ser inativada ou apresentar-se mais ou menos reativa que a substância precursora tal como ilustrado na Figura 10. A indução do citocromo P450 1A monoxigenase (CYP1A) foi proposto como biomarcador de exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). De entre os diferentes membros da família do citocromo P450, o CYP1A desempenha um papel particular no metabolismo de um largo número de compostos, como as dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs) e HAPs (Van der Oost *et al.*, 2003).

A indução da CYP1A é mediada através da ligação dos xenobióticos ao recetor aril hidrocarboneto (AhR) citosólico, representado na Figura 10. Geralmente os ligandos de AhR têm configurações isométricas e são similares em estrutura ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD). A ligação ao receptor é seguida por uma série de eventos moleculares que levam à expressão de vários genes (incluindo o CYP1A). O uso da indução do CYP1A como um biomarcador tem vindo a ganhar notoriedade devido à optimização dos protocolos para a medição rápida e de baixo custo da sua atividade catalítica, como por exemplo a etoxiresorufina *O*-deetilase (EROD). A indução da CYP1A determinada pela atividade da EROD é indicativa da presença de compostos que ativam o AhR em peixes. A indução da EROD tem sido examinada em mais de 150 espécies de peixe, sendo um indicador extremamente sensível a alterações ambientais e usualmente um dos primeiros a ser detetado, quantificando as respostas à exposição. Para além disso, a EROD representa o impacto cumulativo de todos os químicos ambientais presentes, sendo ou não detetados analiticamente. Assim, a medição da atividade da EROD em peixes é constitui um biomarcador de exposição *in vivo* a determinados compostos químicos, como aqueles já referidos no texto acima. Aparte da indução por xenobióticos, a atividade da EROD pode ser influenciada por um amplo número de fatores bióticos e abióticos tais como a temperatura do meio, idade e fase reprodutiva. À medida que existe mais informação acerca da relação entre a atividade EROD e os efeitos nocivos em peixes, este biomarcador pode também servir como uma ferramenta de predição para avaliação do risco de contaminantes (Parkinson e Ogilvie, 2010).

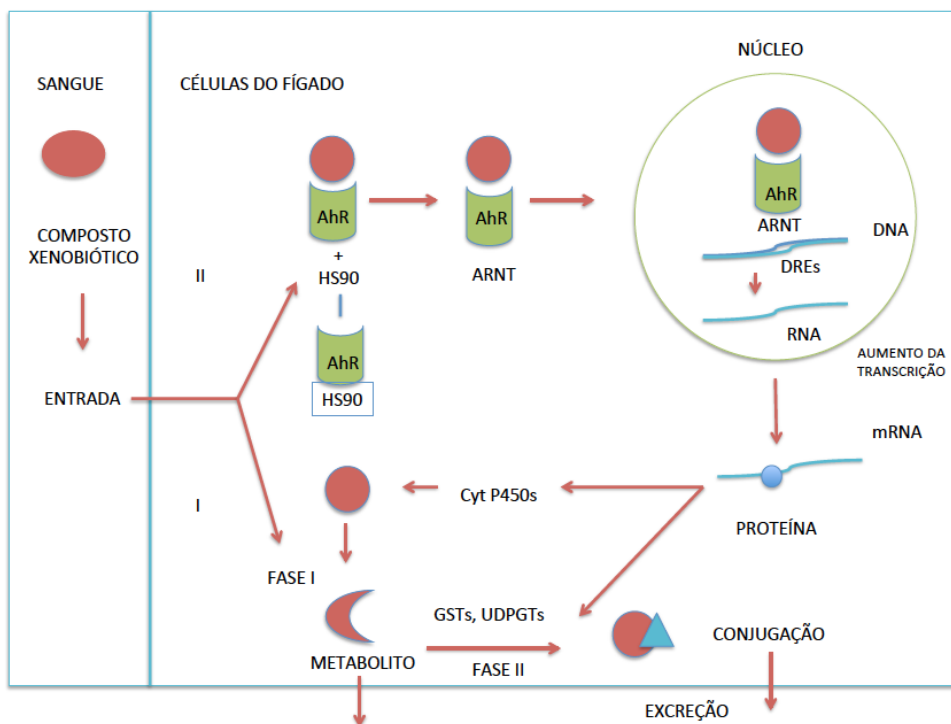


Figura 10. Representação simplificada do destino dos xenobióticos em células hepáticas. (I) Mecanismo possível para destoxificação ou toxicidade. (II) Mecanismo possível para a indução enzimática. AhR, recetor aril hidrocarboneto; HSP90, proteína de choque térmico de 90KDa; ARNT, translocador nuclear do recetor Ah; DREs, elementos de resposta às dioxinas; Cyt P450s, isoenzimas de citocromo P450; GSTs, glutationa-S-transferases; UDPGTs, UDP-glucuronil transferase (Adaptado de Van der Oost *et al.*, 2003).

VI.2 Enzimas de Fase II

A chamada fase II envolve a conjugação do xenobiótico pai ou dos seus metabolitos resultantes das reações de Fase I com um ligando endógeno. As conjugações são reações de adição nas quais grupos químicos de grandes dimensões e frequentemente polares (por exemplo, a glutationa reduzida (GSH) e ácido glucurónico) são adicionados covalentemente aos compostos exógenos (Parkinson e Ogilvie, 2010).

As enzimas de fase II desempenham um papel importante na destoxificação e eliminação de muitos xenobióticos. A via de destoxificação para compostos eletrofílicos é a conjugação com a GSH. O mecanismo de indução para a maioria das formas das enzimas de fase II é também provavelmente regulado pela via do recetor AhR. Em comparação com sistemas de fase I, as respostas de indução das enzimas de fase II são

geralmente menos pronunciadas, devido a serem enzimas pouco específicas, e até geralmente não consideradas como bons biomarcadores. Ainda assim, mesmo pequenas alterações na atividade de fase II podem ser prejudiciais para um organismo. A conjugação dos compostos eletrofílicos (ou metabolitos de fase I) com a GSH é catalisada pela glutathione-S-transferase (GSTs), uma enzima solúvel, dimérica, multifuncional, localizada maioritariamente na fração citosólica das células hepáticas. Para além das suas funções essenciais no transporte intracelular (ácidos biliares, bilirrubina e heme) e da biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, as GSTs têm um papel decisivo na defesa contra o dano oxidativo e produtos de peroxidação de ADN e lípidos. Os efeitos de agentes indutores na atividade da GST hepática, medidos por conjugação com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), têm sido observados em várias espécies marinhas. Deste modo, a indução destas enzimas tem de ser considerada benéfica devido ao papel que as GSTs desempenham ao conjugar epóxidos. Um aumento na atividade da GST hepática tem sido descrita em vários estudos após a exposição de peixes a bifenilos policlorados e dibenzodioxinas policloradas (PCDDs) (Van der Oost *et al.*, 2003).

VI.3 Aplicação de biomarcadores de biotransformação em testes ecotoxicológicos

Num estudo realizado por Boulahia *et al.* (2016) utilizaram-se culturas de feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L., de forma a avaliar o possível dano sustentado pelas espécies vegetais em solos contaminados com prometrina, um herbicida pertencente à família das S-triazinas amplamente utilizado na agricultura. Numa primeira fase do ensaio, foi observado que nos solos tratados com prometrina $\geq 100 \mu\text{M}$ houve uma alteração dos padrões de crescimento das plantas de feijão, e à diminuição da acumulação de pigmentos e produtos fotossintéticos no solo. Posteriormente constatou-se igualmente um efeito deletério nas plantações devido à produção de ROS. Concentrações superiores do herbicida (500 μM) levaram a efeitos desastrosos nas culturas vegetais pois constatou-se uma redução significativa da atividade das defesas antioxidantes (catalase e enzimas envolvidas nos processos de metabolismo de xenobióticos). Em concentrações mais reduzidas (10 μM), a exposição a prometrina conduziu a um aumento na atividade enzimática antioxidante, sem alterar o padrão de crescimento dos feijões nem levando ao aumento dos níveis de MDA. A expressão de

genes de metabolismo de prolina e a acumulação de prolina confirmam que as plantas de feijão respondem ao stresse conforme a concentração de prometrina no solo. As enzimas antioxidantes como a ascorbato peroxidase (APx), a catalase e as enzimas implicadas nos processos de metabolismo de xenobióticos, como a GST, aumentaram a sua atividade para concentrações de 10 e 100 μM o que indica que existe um processo de prevenção endógeno dos efeitos deletérios à exposição a este poluente ambiental. A Figura 11 representa de forma esquemática os efeitos observados no estudo.

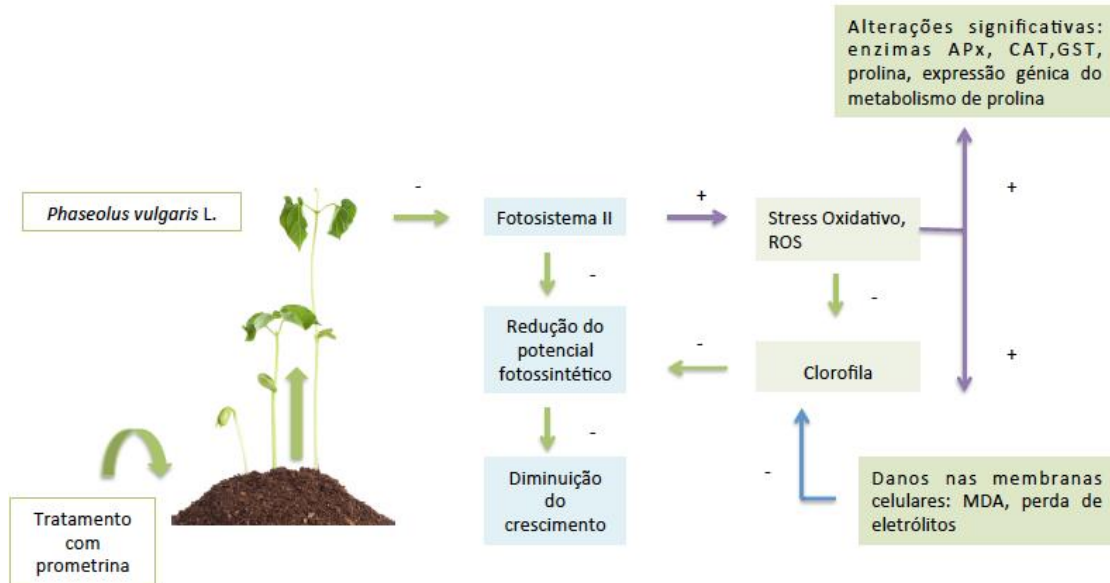


Figura 11. Representação esquemática dos efeitos observados em solos contaminados com prometrina (adaptado de Boulahia *et al.*, 2016).

VII. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

Os níveis de compostos químicos encontrados nos ecossistemas aquáticos tais como metais pesados, pesticidas e ainda outros poluentes orgânicos persistentes, resultantes de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, têm vindo a aumentar de forma alarmante (Sekabira *et al.*, 2010). A atividade antropogénica coloca em causa não apenas a sobrevivência e o desempenho das espécies que habitam os sistemas aquáticos mas também a estrutura e a funcionalidade destes ecossistemas naturais (López-Barea, 1995). A contaminação das águas (quer sistemas de água doce quer marinha) tem se tornando num sério problema ambiental a nível mundial nas últimas décadas. Os metais pesados (como por exemplo o arsénio (As), cádmio (Cd), prata (Hg), níquel (Ni) e chumbo (Pb)), os pesticidas e ainda outros poluentes orgânicos como os PCBs e a dioxinas, representam os poluentes antropogénicos mais comumente encontrados nos organismos de espécies aquáticas. A grande maioria destes compostos tem tendência a se acumular no biota, de biomagnificar ao longo da cadeia alimentar e apresentam também a particularidade de serem dificilmente convertidos em outras substâncias menos prejudiciais (Yancheva *et al.*, 2016).

Os biomarcadores histopatológicos permitem examinar órgãos-alvo específicos como as brânquias e o fígado de peixes (Handy *et al.*, 2002; Cengiz e Unlu, 2006). A análise histológica do fígado de espécies aquáticas demonstra ser uma ferramenta sensível para revelar processos adaptativos, bem como efeitos deletérios nos organismos expostos a xenobióticos pois é um local onde ocorrem processos de acumulação, biotransformação e de excreção de uma vasta gama de compostos. Na presença de contaminantes, o fígado pode desenvolver alterações funcionais e estruturais que podem levar ao comprometimento das funções hepáticas trazendo consequências para a saúde, crescimento e reprodução dos indivíduos (Koehler, 2004). Por outro lado, a análise histológica das brânquias também tem vindo a ser bastante utilizada nos programas de monitorização ambiental pois são o primeiro local de contacto com os xenobióticos, uma vez que a sua função é de realizar as trocas gasosas entre o sangue e a água. Quando existe uma perturbação no funcionamento das brânquias provocada pela exposição a xenobióticos, estas podem de certa forma comprometer a saúde do indivíduo pela diminuição da eficácia respiratória (Leonardo *et al.*, 2001).

VII.1 Alterações histopatológicas como biomarcadores

A histopatologia envolve a examinação microscópica de células e tecidos de organismos bem como a determinação semi-quantitativa de anormalidades histológicas (Yevich e Yevich, 1994). As alterações histológicas em determinados órgãos como aqueles já referidos correspondem a biomarcadores sensíveis de contaminação por xenobióticos pois estas ocorrem de forma precoce e permitem realizar uma melhor avaliação dos efeitos da exposição aguda ou crônica aos poluentes quando comparada com a avaliação de parâmetros bioquímicos. Assim, a análise das alterações histológicas em diferentes tecidos de peixes tem vindo a ser utilizada como um instrumento de monitorização ecológica. Adicionalmente, vários programas de biomonitorização têm vindo a utilizar as alterações histológicas observadas em diferentes órgãos de peixes como biomarcadores de qualidade ecológica dos ecossistemas aquáticos (Lang *et al.*, 2006).

VII.2 Alterações histopatológicas nas brânquias

As brânquias exercem funções vitais nos teleósteos, tais como respiração, osmorregulação, excreção e ainda constituem o local de entrada e de depuração de contaminantes ambientais. Assim sendo, as alterações morfológicas podem ocorrer em razão da introdução de poluentes na água e, portanto, estas alterações podem ser utilizadas como parâmetros para a monitorização ambiental. As brânquias dos peixes teleósteos são constituídas por quatro arcos branquiais em cada lado da faringe. De cada arco branquial estendem-se duas filas de filamentos branquiais ou lamelas primárias, e acima e abaixo destes filamentos, a intervalos regulares, elevam-se lamelas secundárias que correspondem ao local onde ocorrem as trocas gasosas (Koehler, 2004).

O epitélio branquial é um tecido extremamente sensível, altamente dinâmico e metabolicamente ativo. Por estar em contacto direto com o meio externo e representar a barreira entre o meio externo e o interno, este tecido é altamente suscetível às alterações ambientais. Na presença de xenobióticos, as brânquias podem exibir modificações que são consideradas respostas de defesa, visto que algumas levam ao aumento da distância entre o meio externo e o meio interno, diminuindo assim a área de superfície em contacto com o poluente. Porém, esta resposta também dificulta a difusão de oxigénio e

dióxido de carbono, podendo provocar um fenómeno de hipóxia no peixe (Lang *et al.*, 2006).

VII.3 Alterações histopatológicas no fígado

As células hepáticas apresentam várias funções vitais no metabolismo intermediário (de proteínas, lípidos e hidratos de carbono) e de xenobióticos, na hematopoiese e na produção de anticorpos no período larval dos peixes. Este órgão na maioria dos peixes teleósteos é composto por dois lóbulos, o lóbulo direito que se encontra ao lado da vesícula biliar, e o lóbulo esquerdo, próximo do baço. Devido à sua função no metabolismo de xenobióticos e também sensibilidade a poluentes ambientais, o fígado recebe uma atenção especial nos estudos toxicológicos relacionados com a contaminação de diferentes espécies de peixes (Silva, 2004).

Os efeitos hepatotóxicos induzidos por agentes químicos de matriz orgânica ou inorgânica podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática. Na presença de xenobióticos, o fígado pode desenvolver alterações histológicas nos hepatócito que, por sua vez, podem ser usadas para a monitorização dos efeitos produzidos pelos contaminantes no meio aquático. Assim, alguns parâmetros hepáticos, como as alterações histopatológicas e a diminuição dos níveis de glicogénio, têm vindo a ser utilizados nos programas de biomonitorização ambiental (Yancheva *et al.*, 2016).

VII.4 Aplicação de biomarcadores histológicos em testes ecotoxicológicos

Num estudo realizado por Silva (2004), foram avaliadas as alterações histopatológicas nas brânquias e no fígado de peixe *Astyanax scabripinnis*, natural de zonas tropicais. Os animais foram recolhidos em cinco pontos diferentes do rio Cambé (Brasil) durante um período de um ano, sendo este rio sujeito a descargas de efluentes industriais, domésticos e agrícolas. Os peixes recolhidos nos cinco pontos apresentaram várias alterações histopatológicas no tecido branquial como a elevação do epitélio lamelar com redução da distância interlamelar e início de fusão lamelar, rompimento das células pilares e constrição do fluxo sanguíneo. Foi também observado a hiperplasia do epitélio do filamento levando ao seu espessamento e hipertrofia das células pavimentosas e epiteliais do filamento; excessiva proliferação de células do epitélio do filamento

levando a uma fusão lamelar total. Estes tipos de alterações foram observadas em todos os peixes recolhidos nos diferentes locais do rio. Por outro lado, no tecido hepático, foi possível observar a presença de uma grande quantidade de glicogénio dentro de vacúolos nos hepatócitos; degeneração celular e nuclear; necrose; hiperemia; hipertrofia celular e nuclear e vacuolização vascular.

VIII. BIOMARCADORES DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA

O crescimento populacional nas últimas décadas trouxe como consequência o aumento da produção de xenobióticos, em que estes compostos uma vez presentes no meio ambiente podem causar efeitos negativos sobre os seres vivos. Um exemplo desses xenobióticos são os desreguladores endócrinos (EDs) que podem interferir com o sistema endócrino afetado o estado de saúde, crescimento e reprodução dos organismos expostos. Os EDs também estão relacionados com a alta incidência de neoplasias (United States Environmental Protection Agency (EPA), 1997). Estas substâncias podem ser encontradas no esgoto sanitário, águas naturais e potáveis (Bila e Dezotti, 2007).

A EPA (2016) define um desregulador endócrino como um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação, ou eliminação de uma hormona natural no corpo que é responsável pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento, e/ou comportamento dos organismos. Altera uma ou mais funções do sistema endócrino, bem como a sua estrutura, causando efeitos adversos tanto sobre um organismo e sua descendência, como em populações ou subpopulações de organismos (EPA, 2016).

Os EDs incluem uma variedade de moléculas, dentre elas hormonas sintetizadas por organismos vertebrados (estrogénios, androgénios e progesterona), fitoestrogénios e micotoxinas, bem como substâncias sintéticas como hormonas sintéticas, pesticidas, o bisfenol A, parabens, fármacos (como por exemplo, analgésicos, antibióticos, reguladores lipídicos, anti-inflamatórios e hormonas sintéticas), ftalatos, alquilfenóis, componentes de detergentes, e poluentes que são persistentes no meio ambiente (PCBs, PCDDs, PCDFs e HAPs) (Nogueira, 2003).

De acordo com a *World Wild Fundation* (2000), os prováveis mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos são:

- a) Mimetismo hormonal, ou seja, interagem com o recetor específico para desencadear as alterações que seriam provocadas pela hormona endógena;

- b) Bloqueio da ação da hormona endógena ao ocupar os seus recetores, impedindo desta forma que a sua função seja exercida;
- c) Danos no metabolismo hormonal, isto é, na sua síntese ou na sua destruição e eliminação fisiológica. Os organoclorados, como por exemplo o DDE, podem alterar, desta forma, o metabolismo dos estrogénios;
- d) Afetando o SNC, onde está o principal controlo da produção hormonal, a hipófise, que, por sua vez, é regulada principalmente pelo hipotálamo. Todas as hormonas são reguladas também por mecanismos de *feedback-negativo*, isto é, são produzidos de acordo com níveis detetados na corrente sanguínea, constantemente monitorizados pelo hipotálamo. Daí que uma interferência a nível central afeta o controlo de diversas hormonas. Este mecanismo de controlo pode estar alterado tanto por receber informação errada quanto a níveis sanguíneos, como por ações deletérias sofridas diariamente pelo próprio sistema nervoso central.

É importante realçar que a contínua introdução de hormonas no meio ambiente concede-lhes um carácter de persistência, pois estes compostos possuem um carácter lipofílico. Além de estarem presentes na água, estas substâncias são acumuladas nos sedimentos e bioacumuladas em organismos aquáticos, devido ao permanente contacto direto da fauna com as águas contendo estes compostos, o que facilita a entrada dos desreguladores endócrinos pelos sistemas respiratório e digestivo (Nogueira, 2003).

VIII.1 As hormonas sexuais como desreguladores endócrinos

As hormonas sexuais são classificadas em três grupos principais: (1) hormonas sexuais femininas, ou estrogénios, (2) hormonas sexuais masculinas, ou androgénios, e (3) hormonas de gravidez, ou progestagénios. As hormonas esteróides (estrogénios, progesteronas, androgénios, glicocorticóides) são substâncias biologicamente ativas que são sintetizadas pelo colesterol. Os esteróides endógenos são secretados pelo córtex supra-renal, testículos, ovários e placenta, e inclui progesteronas, glicocorticóides, mineralocorticóides, androgénios e estrogénios. Todas estas hormonas exercem a sua função passando através da membrana plasmática e ligam-se a recetores intracelulares. Existem também hormonas esteróides sintéticas como a 17α -etinilestradiol e o

mestranol que são usados atualmente como contraceptivos orais. A ligação entre os recetores celulares e as hormonas pode ser bloqueada ou mimetizada de acordo com a forma e distribuição de cargas dos EDs e com isso pode ocorrer o desencadeamento de respostas biológicas inadequadas como a aceleração/atraso ou superprodução/subprodução das mensagens codificadas devido a mimetização, impedimento da regularização das funções normais devido ao bloqueio, amplificação dos sinais hormonais devido à formação de novos recetores (aceleração endócrina), ação enzimática inadequada, e destruição da hormona ou da sua capacidade de realizar as suas funções (Cordeiro, 2009).

No caso específico dos estrogénios, uma vez no meio ambiente, podem causar efeitos deletérios à reprodução de organismos aquáticos incluindo a inibição da implantação do óvulo, a supressão da espermatogénese e impotência (Lewis, 1991). Normalmente, os estrogénios são excretados do corpo humano atingindo efluentes domésticos e o sistema aquático, sendo a sua principal fonte as mulheres que excretam diariamente entre 10 a 100 µg de 17β-estradiol, enquanto que as mulheres grávidas podem excretar até 30 mg de estrogénios por dia (Baronti *et al.*, 2000). As hormonas são excretadas na sua forma conjugada, mas há estudos que demonstram que também podem ser encontradas na sua forma livre em esgotos, sendo os conjugados cindidos pela enzima β-glucuronidase produzida pela bactéria *Escherichia coli* (D'Ascenzo *et al.*, 2003). Estudos demonstram a presença de hormonas nas águas de rios, no esgoto após tratamento e na água potável. A sua presença, em água potável, é devido ao não remoção destes compostos pelas estações de tratamento de água de abastecimento (ETA) (Cordeiro, 2009).

Segundo Jonhson e Sumpter (2001), os desreguladores endócrinos como o 17β-estradiol e o 17α-etinilestradiol têm uma grande potência estrogénica, sendo o primeiro encontrado em efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ETARs) e águas de superfície em baixas concentrações e o 17α-etinilestradiol em efluentes de ETARs.

Os estrogénios possuem o ciclopentanoperidrofenantreno como características em comum, sendo sintetizados como já referido, pelo colesterol. A Figura 14 apresenta as estruturas das substâncias referidas.

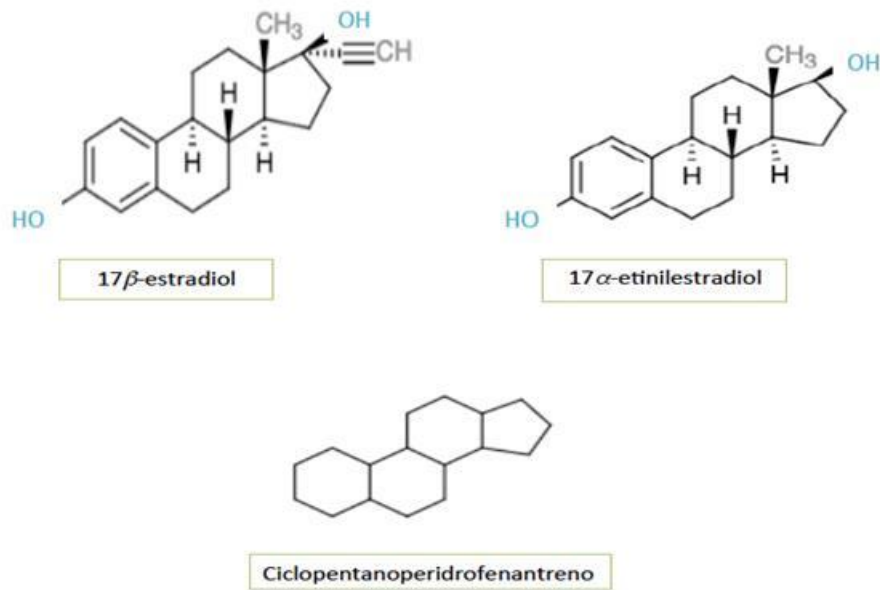


Figura 12. Desreguladores endócrinos com elevada potência estrogénica (adaptado de Jonhson e Sumpter, 2001).

VIII.2 Ação dos desreguladores endócrinos no meio ambiente

Existem já vários estudos que demonstram que a exposição de diversas espécies animais a um ou mais compostos químicos estrogénicos é capaz de induzir uma gama de efeitos adversos como hermafroditismo, hipospádia, criptorquidismo, redução do tamanho normal dos testículos, comprometimento do funcionamento normal das células de Leydig, redução da qualidade dos espermatozóides, entre outros (Witorsch, 2002).

Talvez um dos exemplos mais bem documentados de efeitos ecológicos causados pela interferência na função endócrina tenha ocorrido com os crocodilos do Lago Apopka na Flórida, Estados Unidos. Estudos realizados por Guillette *et al.* (1994) demonstraram que o derramamento de uma mistura de pesticidas do tipo diclorodifeniltricloroetano (DDT) e diclorodifenildicloroetileno (DDE), em 1980, foi o responsável por uma variedade de efeitos adversos como a “desmasculinização” de crocodilos machos e a “superfeminização” das fêmeas. Outros efeitos incluíram a diminuição da capacidade em chocar ovos e o decréscimo dos níveis populacionais.

A investigação conduzida por Fernandez *et al.* (2002) revelou o desenvolvimento de anomalias no sistema reprodutivo de alguns moluscos (caramujos e lesmas) resultante da exposição ao tributilestanho (TBT), composto orgânico encontrado nas tintas dos cascos de embarcações como agente antiincrustante. A presença deste composto nas águas do litoral brasileiro levou ao desenvolvimento de órgãos masculinos em fêmeas, um fenómeno conhecido como *imposex* – imposição sexual – que é irreversível e causa a esterilidade das espécies, podendo levar a um declínio considerável nas populações de espécies mais sensíveis. O TBT interfere na síntese de testosterona, causando um aumento na sua produção em fêmeas. Esta alteração hormonal faz surgir estruturas sexuais masculinas não funcionais, mantendo-se, porém, a anatomia interna do organismo.

VIII.3 A vitelogenina como biomarcador de exposição estrogénica

A vitelogenina é uma proteína produzida pelo fígado na maturidade sexual para o desenvolvimento folicular e está diretamente relacionada com a quantidade de estrogénio no sangue, que por sua vez é diretamente responsável maturação e diferenciação sexual. Assim, a exposição de machos aos estrogénios em determinados níveis faz com que o seu organismo passe a produzir elevadas quantidades de vitelogenina que, em circunstâncias normais, é uma proteína específica encontrada em vertebrados ovíparos do género feminino (Routledge *et al.*, 1998), resultando assim, por exemplo, no desenvolvimento de características hermafroditas em peixes machos (Cordeiro, 2009).

A vitelogenina está presente em condições normais em peixes machos, mas não em quantidades expressivas devido à sua pequena quantidade (Schmid *et al.*, 2002). A presença de elevadas quantidades desta proteína no plasma de peixes machos indica a presença de desreguladores endócrinos na água, portanto, esta proteína pode ser utilizada como um biomarcador de exposição estrogénica (Jonhson e Sumpter, 2001).

Folmar *et al.* (2000) demonstraram que a produção de vitelogenina em peixes machos é cerca de dez vezes maior quando estes são expostos ao 17α -etinilestradiol em comparação com o 17β -estradiol. Na Inglaterra e País de Gales, Purdom *et al.* (1994)

realizaram um estudo sobre a influência dos efluentes de origem industrial e doméstica proveniente de estações de tratamento de águas residuais em populações de trutas arco-íris machos e foi observado que os peixes que sobreviveram apresentavam níveis de vitelogenina plasmática de 500 a 50000 vezes superiores ao normal. Mais tarde, em 1996, Harris *et al.* comprovaram a persistência da atividade estrogénica ao longo do rio expondo trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) machos a efluentes de ETARs até a uma distância de 5 quilómetros das fontes de descarga dos efluentes. Os autores observaram uma elevada concentração de vitelogenina nos peixes estudados, sendo o mínimo de 270 ng/mL e o máximo de 0,5 mg/mL e também foi observado a redução do crescimento dos testículos destes animais.

No estudo realizado por Thompson *et al.* (2000), os peixes das espécies *Oryzia latipes*, *Morone saxatilis*, *Morone chrysops* e *Ictalurus punctatus* foram expostos a concentrações de 17 β -estradiol de 10 a 100 ng/L durante um período de 21 dias. Os resultados deste estudo revelaram o aumento dos níveis plasmáticos de vitelogenina nos animais em estudo.

IX. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

A libertação de produtos químicos para o meio ambiente capazes de danificar o material genético representa um risco quer para a saúde do Homem quer para o seu meio envolvente. A ecotoxicologia genética consiste no estudo das alterações genéticas induzidas pela exposição a determinados poluentes (Depledge, 1994). Atualmente existe uma enorme variedade de compostos xenobióticos com o potencial de provocar efeitos moleculares e bioquímicos nos organismos expostos, incluindo alterações no seu ADN. Uma dessas alterações, a quebra das cadeias de ADN, pode ser avaliada prontamente nos organismos expostos. Ao contrário da formação de aductos de ADN e de outras alterações moleculares subtis, a quebra das cadeias de ADN não pode ser reparada e é um indicativo de dano genético permanente. Este tipo de quebra pode levar ao desenvolvimento de determinadas neoplasias e de outras complicações fisiológicas nos organismos afectados. Assim, este tipo de alteração no material genético pode ser utilizado como uma ferramenta muito útil na avaliação da saúde do ecossistema quer a nível individual ou populacional (Bickham *et al.*, 2000; Shugart *et al.*, 2003).

A exposição a determinados contaminantes ambientais como, por exemplo, misturas complexas de HAPs, tem vindo a mostrar ser genotóxica para animais em experiências de laboratório controladas (Bickham *et al.*, 1998; Maria *et al.*, 2003; Incardona *et al.*, 2004; Peterson e Bain, 2004; Winter *et al.*, 2004) e em estudos de campo *in situ* (Wirgin e Waldman 1998; Gauthier *et al.*, 2004; Maria *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2004; Matson *et al.*, 2005; Barbee *et al.*, 2008). Os HAPs são considerados derivados do petróleo, no entanto, existem outras classes de compostos capazes de induzir um efeito genotóxico tais como os metais pesados (alumínio), herbicidas à base de glifosato e os biocombustíveis (Matson *et al.*, 2009).

IX.1 Ensaios de genotoxicidade

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o ADN produzindo alterações na sua estrutura ou função e quando essas alterações se fixam de forma capaz de serem transmitidas denominam-se de mutações. As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo portanto fundamentais para a manutenção das

espécies. Porém, podem provocar patologias tanto nos indivíduos como nos seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e local onde ocorrem e portanto alterar o balanço dos ecossistemas. Nas populações, podem aumentar a incidência de neoplasias, doenças hereditárias, doenças cardiovasculares, bem como aumentar a virulência de determinados agentes patogênicos. Os compostos mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas (água, solo, ar) e são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas, podendo causar danos genéticos ou efeitos genotóxicos nos indivíduos ou populações expostas (Bickham *et al.*, 2000).

IX.1.1 Teste de Ames

A descoberta feita por Charlotte Auerbach, em 1941, de que o gás mostarda era capaz de induzir mutações em *Drosophila melanogaster* foi a primeira demonstração de mutagênese química induzida. Apesar das implicações desta descoberta na área da saúde humana, a maioria dos geneticistas entre 1940 e 1950 estava interessado em utilizar os compostos mutagênicos como ferramenta para melhor compreender os processos genéticos e celulares. A preocupação com a exposição humana a este tipo de produtos químicos somente se iniciou nos anos 60 do século XX, devido ao avanço industrial após a Segunda Guerra Mundial, que fez com que houvesse a necessidade de se controlar a enorme quantidade de produtos lançados para o meio ambiente. Na década de 70, Bruce Ames e os seus colaboradores da Universidade de Berkeley, na Califórnia desenvolveram um teste *in vitro*, de curta duração, que combinado a um sistema de metabolização *in vitro* (fração S9), demonstrou existir uma elevada correlação entre vários compostos mutagênicos e carcinogênicos conhecidos. Este ensaio hoje em dia é conhecido como o “Teste de Ames” e é considerado um marco na história da Genética Toxicológica (França e Umbuzeiro, 2007).

O teste de Ames é o mais usado atualmente e o único validado em larga escala por inúmeros laboratórios distribuídos pelos diferentes países para aferir o potencial mutagênico dos xenobióticos (França e Umbuzeiro, 2007). O ensaio emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (*his*⁻), especialmente desenvolvidas para detetar mutações do tipo deslocamento de quadros de leitura ou substituições de pares de bases no ADN. Estas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos

que ocorram mutações e as bactérias se tornem prototróficas (Mortelman e Zeiger, 2000), como visível na Figura 15. A frequência de mutações reversas é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico. O ensaio utiliza também uma mistura da fração microsossomal S9 que revela se o xenobiótico teste é mutagênico na sua forma original ou se necessita se ser metabolizado ou ativado para se tornar mutagênico. As diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* que foram desenvolvidas pelo Doutor Bruce Ames, do Departamento de Bioquímica da Universidade da Califórnia, Berkeley, CA, USA, possuem mutações para a histidina em diferentes genes do operão responsável pela biossíntese do aminoácido e apresentam também outras características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade e versatilidade na detecção de diversos tipos de compostos mutagênicos, tais como: mutação *rfa*, deleção *uvr-B* e a presença do plasmídeo pKM101. As linhagens mais comumente utilizadas pela maioria dos autores são as TA98 e TA100, principalmente em estudos de triagem, pois estas têm-se mostrado ser eficientes na detecção de um grande número de agentes mutagênicos (Mortelmans e Riccio, 2000).

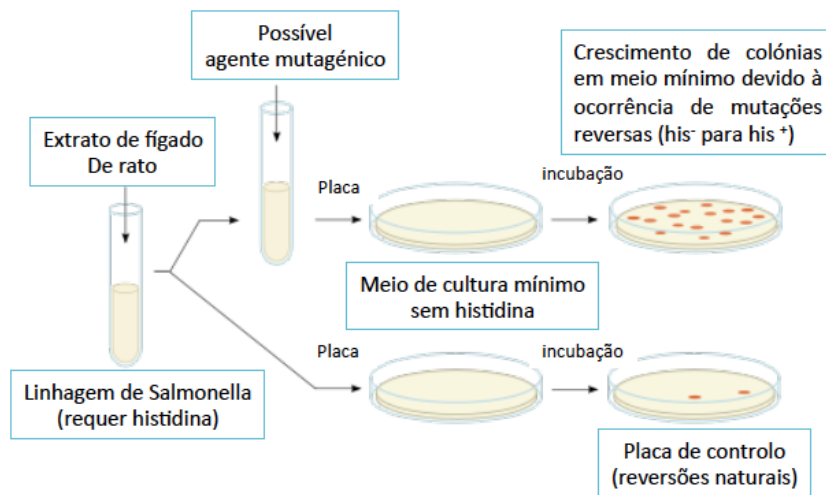


Figura 13. Procedimento geral do Teste de Ames (adaptado de Mortelman e Zeiger, 2000).

IX.1.2 Teste do micronúcleo

Os micronúcleos resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou que se atrasaram em relação aos demais durante a migração para os polos do fuso mitótico. Podem ser

induzidos por agentes capazes de quebrar as moléculas de ADN ou de interferir com a formação do fuso mitótico. No ambiente aquático, os peixes são considerados como bons monitores biológicos por participarem em diferentes níveis da cadeia trófica. Os animais são recolhidos em redes de pesca, vivos, anestesiados e uma amostra de sangue é colhida por meio de punção caudal. Os animais são devolvidos ao seu ambiente natural e são feitos esfregaços no local ou no laboratório. As células são fixadas com metanol e coradas com giemsa. No final, são analisadas 4000 células por animal e o resultado é expresso em frequência de micronúcleos/1000 células (Bucker, Carvalho e Alves-Gomes, 2006).

IX.1.3 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa ou “Single Cell Gel Assay” permite a obtenção de uma grande quantidade de informação em células individuais, necessitando para isso de um número reduzido de células (<10,000). Apresenta uma grande sensibilidade e pode ser realizado virtualmente em qualquer tipo de célula eucariótica. Neste ensaio, as células são aplicadas num gel de agarose e sobre uma lâmina de microscópio sendo de seguida lisadas e submetidas à ação de um campo elétrico em tampão alcalino. A presença de quebras simples, de locais lábeis alcalinos e *crosslinks* resultantes da ação dos compostos genotóxicos, altera a estrutura do ADN das células, que normalmente está superenrolado e fortemente compactado, causando o relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao ânodo (França e Umbuzeiro, 2007).

Desta forma, após a aplicação de corantes específicos, é possível visualizar em microscópio de fluorescência a migração do ADN, que se assemelha à forma de um cometa. A capacidade que o ADN apresenta para migrar é em função do tamanho da molécula bem como da quantidade de extremidades livres (quebras, por exemplo) que, mesmo ligadas a segmentos maiores, migram numa distância pequena do corpo do cometa. O tamanho da cauda inicialmente aumenta proporcionalmente à quantidade de danos, mas a migração máxima é determinada pelas condições de eletroforese, não do tamanho dos fragmentos. A intensidade da fluorescência na cauda em relação à do corpo do cometa fornece informações sobre a quantidade de quebras existentes nas moléculas de ADN. Assim, pode-se avaliar o dano genético tanto através da medida do

comprimento da cauda do cometa, como através da quantidade de ADN presente, sendo ambos em função das doses de exposição (Bickham *et al.*, 2000).

IX.2 Aplicação de biomarcadores de genotoxicidade em testes ecotoxicológicos

No estudo realizado por Ventura (2004) foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do herbicida atrazina no organismo-teste, a espécie de cebola, *Allium cepa*. Os resultados demonstraram que o herbicida em estudo induz alterações genéticas tais como: anáfases multipolares, pontes, quebras e perdas cromossómicas, micronúcleos, atrasos anafásicos e telofásicos, C-metáfases e prófases com perda de material genético e formação de cometas com caudas mais longas. Estas aberrações sugeriram que o pesticida em questão contivesse uma substância mutagénica para todas as concentrações testadas durante a realização do estudo.

Num outro estudo realizado mais recentemente por Rodrigues *et al.* (2016) foi aferida a capacidade da eritromicina, um antibiótico usado quer na medicina humana quer veterinária e presente em diversos compartimentos aquáticos, de exercer uma atividade biológica em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao fármaco. O estudo revelou que a eritromicina induziu danos oxidativos nas brânquias dos peixes mas igualmente danos genotóxicos nas células sanguíneas, visíveis pela realização do ensaio cometa (Figura 14).

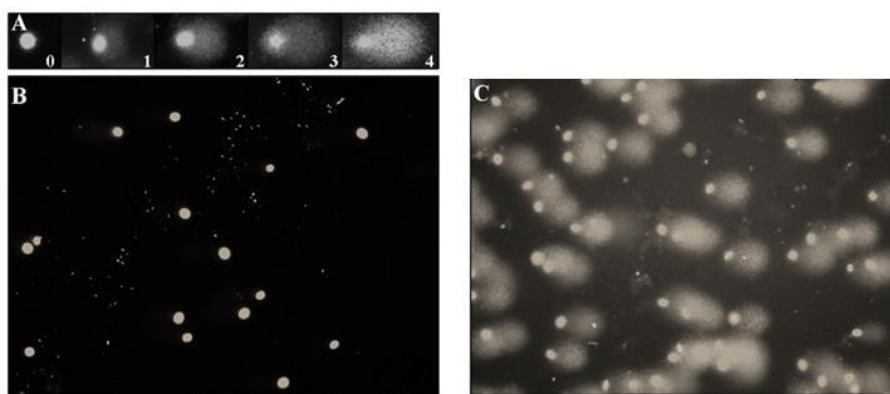


Figura 14. Resultados do ensaio do cometa. (A) Classes de dano genotóxico: 0, nulo ou mínimo; 1, baixo; 2, médio; 3, elevado; 4, extremo. (B) Peixes controlo. (C) Peixes expostos a eritromicina 0,4 µg/L (exposição crónica) (Fonte: Rodrigues, S., Antunes, S. C., Correia, A. T., Nunes, B. Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of *Oncorhynchus mykiss*, Science of Total Environment, 2016).

X. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O termo “Toxicidade Ambiental” é atualmente muito vago dada a necessidade de se conhecer os efeitos que os produtos químicos lançados no meio ambiente possam ter sobre os indivíduos, sobre as populações e comunidades de organismos, além de se conhecer como o Homem pode ser afetado. Devido ao desenvolvimento industrial dos últimos anos, um enorme número de substâncias químicas foram produzidas de forma intencional ou como subproduto de atividades antropogênicas. Algumas dessas substâncias são essencialmente de natureza sintética, mas outras, apesar de terem ocorrência natural, tiveram a sua concentração aumentada no meio ambiente. Estes poluentes ambientais apresentam-se sob variadas formas, sendo por isso responsáveis por diferentes efeitos deletérios nos organismos expostos como dano oxidativo, dano celular, dano a nível reprodutivo, dano a nível do crescimento do organismo, dano cromossomal, entre outros.

Para além disso, a contaminação ambiental desconhece barreiras geográficas, podendo atingir locais muito distantes relativamente às fontes pontuais ou mesmo difusas de poluição pois a grande maioria destes agentes apresentam elevado potencial de lixiviação, elevada persistência no solo, baixa a moderada solubilidade em água e adsorção moderada à matéria orgânica presente nos colóides do solo. A interação entre a interfase biota, sedimento e água é contínua, ou seja, ainda que a entrada de xenobióticos no ambiente possa ser restringida, a libertação de poluentes a partir de um sedimento contaminado, que funciona como um reservatório, pode-se propagar durante um longo período de tempo.

Assim sendo, este ramo permite identificar quais os agentes responsáveis por danos nos seres vivos e comunidades naturais, permite estudar a sua distribuição e destino, permite avaliar o risco de contaminação quer de forma qualitativa quer quantitativa nas cadeias tróficas e no Homem e também tem sido utilizada como um parâmetro legal de regulamentação da qualidade da água, dos efluentes e dos sedimentos. A prevenção dos danos à saúde causados por contaminantes químicos presentes no meio ambiente passa

pela manutenção dos níveis de exposição em valores que não constituam um risco direto para o Homem nem para os ecossistemas. Os biomarcadores são então ferramentas essenciais na área da Toxicidade Ambiental, na avaliação do efeito tóxico de substâncias poluentes nos diferentes ecossistemas que, através do desenvolvimento e aplicação de técnicas de exposição ou efeito em três níveis de complexidade (individual, celular e molecular), tornam possível a elucidação da relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco ambiental. A avaliação dos potenciais efeitos de compostos químicos em organismos não-alvo em ambientes contaminados é algo que merece atenção, pois apesar da gama a que eles se encontram no ambiente ser por vezes baixa, variando de ng/L a µg/L, é suficiente para induzir efeitos tóxicos subletais ao nível dos organismos.

Em conclusão, este trabalho demonstrou o grande interesse e valor dos biomarcadores como ferramenta para avaliar a exposição e o efeito adverso de diferentes contaminantes ambientais, tais como pesticidas, metais e compostos orgânicos. Além disso, a capacidade de identificação precoce das alterações reais que estão ocorrendo nos seres vivos expostos a tóxicos ambientais, torna o uso de biomarcadores fundamental nos estudos de avaliação de risco e impacto ambiental. O uso de biomarcadores em situações de exposição a tóxicos ambientais fornece conhecimentos e evidências científicas necessários para que possam ser tomadas medidas mitigadoras e de proteção a esses ambientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Portuguesa do Ambiente. [Em linha]. Disponível em <http://www.apambiente.pt/>. [Consultado em 06/11/2015].

Amorim, L.C.A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais, *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6(2), pp. 158-170.

Assis, H.C.S. (2012). *Biomarcadores de Neurotoxicidade no Monitoramento Ambiental*, XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas, pp. 895 1.

Barbee, G. C. *et al.* (2008). *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, pp. 454-464.

Barrett, J.C. *et al.* (1997). 12th meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals: Susceptibility to environmental hazards, *Environmental Health Perspectives*, 105, pp. 699-737.

Barrett, J. C. *et al.* (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci, *Nature Genetics*, 42(12), pp. 11-18.

Baronti, C. *et al.* (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage in a receiving river water, *Environment Science & Technology*, 34(24), pp. 5059-5066.

Bickham, J. W. *et al.* (1998). Flow-cytometric determination of genotoxic effects of exposure to petroleum in mink and sea otters, *Ecotoxicology*, 7, pp. 191-199.

Bickham, J. W. *et al.* (2000). Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology, *Mutation Research*, 463, pp. 33-51.

Bila, D. M. e Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências, *Química Nova*, 33, pp. 651-666.

Blaise, C. e Perceval, O. (2010). Séminaire national sur le développement de biomarqueurs et bioessais pour la surveillance des milieux aquatique: *État des lieux sur l'application des biomarqueurs en biosurveillance*, Verneuil-en-Halatte.

Boulahia., *et al.* (2016). *Phaseolus vulgaris* L. Seedlings exposed to the prometryn herbicide contaminated soil trigger an oxidative stress response, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(16), pp. 3150-3160.

Bucker, A., Carvalho, W., Alves-Gomes, J. A. (2006). Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno, *Acta Amazonica*, 36(3), pp. 357-364.

Castro, N. *et al.* (2015). Ecotoxicity of sediments bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools, *Science of the Total Environment*, 540, pp. 297-306.

Cengiz, I. e Unlu, E. (2003). Histopathology of Gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* After Long-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Melathion, *Journal of Environmentak Science and Health, Part B*, 38, pp. 581-589.

Chen, C. *et al.* (2002). A model study of the coupled biological and physical dynamis in Lake Michigan, *Ecological Modelling*, 152, pp. 145-168.

Colborn, T. *et al.* (1993). Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environmental Health Perspectives*, 101, pp. 378-383.

Connon, R. E., Geist, J., Werner, I. (2012). Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment, *Sensors*, 12(9), pp. 12741-12771.

Cordeiro, D. (2009). *Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto*. Tese de Mestrado, Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo.

Costa, A. M. (2004). *Uso de marcadores RAPD e do sistema de informação geográfica no estudo da variabilidade genética e ecológica de Stylosanthes macrocephala*. Tese de Mestrado, Instituto de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília.

D'Ascenzo, G. *et al.* (2003). Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment*, 302, pp. 199-209.

DeCaprio, A. P. (1997). Biomarkers: Coming of Age for Environmental Health and Risk Assessment, *Environmental Science & Technology*, 31(7), pp. 1837-1848.

Depledge, M. H. (1994). Genotypic toxicity: implications for individuals and population, *Environmental Health Perspectives*, 102, pp. 101-104.

Douhri, H. e Sayah, F. (2010). Validation of *Orchestia gammarellus* enzymatic activities in several sites of Tangier's bay (Marocco), *African Journal of Environmental Science and technology*, 4(5), pp. 120-135.

Fernandez, M. A. *et al.* (2002). Occurrence of imposex in Thai haemastoma: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil, *Caderno de Saúde Pública*, 18, pp. 463-476.

Folmar, L. C. *et al.* (2000). Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol, and diethylestilbestrol in an in vivo male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*), vitellogenin bioassay, *Aquatic Toxicology*, 49, pp. 77-88.

França, D. D. e Umbuzeiro, G. A. (2007). Utilização de diferentes critérios de positividade para o teste de salmonella/microsoma em amostras de água superficial, *Revista Brasileira de Toxicologia*, 20, pp. 18-18.

Gauthier, L. *et al.* (2004). Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*, *Science of the Total Environment*, 323, pp. 47-61.

George, S. G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic – conjugating enzymes in fish. *In: Malis, D. C. e Ostrander, G. K. (Ed.). Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives.* Lewis Publisher, CRC Press, pp. 37-85.

Gil, F. e Hernández, A. F. (2009). Significance of Biochemical Markers in Applied Toxicology *In: Ballantyne, B., Marrs, T. C., Syversen, T. (Ed.). General and Applied Toxicology.* Chichester, UK, John Wiley & Sons, pp. 2247-2264.

Golovanova, I. L. (1994). In vitro effects of cadmium and DDVP (dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleosts. *In: Grosell, M. (Ed.). Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology and Pharmacology,* Florida, USA, Elsevier, pp. 21-25.

Grandjean, P. (1995). Biomarkers in epidemiology, *Clinical Chemistry*, 41, pp. 1800-1803.

Grandjean, P. (2011). Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans, *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 78(1), pp. 107-118.

Guillett Jr. *et alli.* (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida, *Environmental Health Perspectives*, 102(8), pp. 680-688.

Gupta, R. C. (2014). Chapter 1: Introduction. *In: Gupta. R. C. (Ed.). Biomarkers in Toxicology*. Kentucky, USA, Elsevier, pp. 3-5.

Handy, R. D., Runnalls, T., Russell, O. M. (2002). Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the Freshwater Fisheries Directive, *Ecotoxicology*, 11, pp. 467-479.

Harris, J. E. *et al.* (1996). A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(11), pp. 1993-2002.

Henriques, C. (2011). *Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda à fenitoína em Gambusia holbrooki*. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.

Hsieh, M. S. *et al.* (2008). Purification and characterization of the amylase from a small abalone *Haliotis sieboldii*, *Fisheries Science*, 74, pp. 425-432.

Hyne, R. V. e Maher, W. A. (2003). Review Invertebrate biomarkers: Link to toxicosis that predict population decline, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, pp. 366-374.

Incardona, J. P., Collier T. K., Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, pp. 191-205.

Jebali, J. *et al.* (2013). Cholinesterase activity as biomarkers of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination, *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 13(8), pp. 525-537.

Jesus, T.B. (2009). *Utilização de Biomarcadores para a Avaliação das Alterações Químicas, Bioquímicas, Hematológicas e Histológicas em Hoplias malabaricus, após Exposição Aguda ao Metilmercúrio e ao Cloreto de mercúrio*. Tese de Doutorado, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Jonhson, A. C. e Sumpter, J. P. (2001). Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works, *Environment Science & Technology*, 45, pp. 4697-4703.

Lagadic, L. et al. (1994). The role of biomarkers in environmental assesment. *In: Shugart, R. (Ed.). Ecotoxicology*, Oak Ridge, USA, Springer, 3, pp. 193-208.

Landis, W. G. e Yu, M-H. (1995). Impacts of chemical upon ecological systems. *In: CRC Press (Ed.). Introduction to environmental toxicology*. Boca Raton, Lewis Publishers.

Koehler, A. (2004). The gender specific risk to liver toxicity and câncer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Waddem Sea coast. *Aquatic Toxicology*, 70, pp.36-60.

Lang, T. *et al.* (2006) Liver histopathology in Baltic flouder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants. *Marine Pollution Bulletin*, 53, pp.488-496.

Lau, A. H. (2002). *Avaliação Múltipla do Potencial Genotóxico da Poluição Urbana*. Tese de Doutorado, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Lavado, R. *et al.* (2006). The combined use of chemical and biochemical markers to asses water quality along the Ebro River, *Environmental Pollution*, 139(2), pp. 330-339.

Leonardo, J. M. L. O., *et al.* (2001). Histologia das brânquias de larvas de tilápia do Nilo de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C, *Acta Scientiarum*, 23, pp. 863-870.

Lewis, R. J. (1991). Effects of alkylphenolic compounds in wildlife. *In: Norris, D. O., Carr, J. C. (Ed.). Endocrin disruption: biological bases for health effects in wildlife and humans*. Oxford, Oxford University Press, pp. 375-389.

Links, J. M. e Groopman, J.D. (2010). Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. In: McQueen, C.A. (Ed.). *Comprehensive Toxicology*. Amsterdam, Elsevier, pp. 225-243.

López-Barea, J. (1995). Biomarkers in Ecotoxicology: an Overview, *Archives of Toxicology*, 17, pp-57-79.

Manno, M. *et al.* (2010). Biomonitoring for occupational health risk assesment (BOHRA), *Toxicology Letters*, 192, pp. 3-16.

Maria, V. L., Correia, A. C., Santos, M. A. (2003). Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary-treated effluents on *Anguilla anguilla L.*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, pp.126-137.

Matson, C. W. *et al.* (2005). Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan, *Ecotoxicology*, 14, pp. 513-525.

Matson, C. W. *et al.* (2009). Wildlife toxicology: biomarkers of genotoxic exposures at a hazardous waste site. *Ecotoxicology*, 18(7), pp. 886–898.

Mortelmans, K. e Riccio, ES. (2000). The bacterial tryptophan reverse mutation with *Escherichia coli* WP2, *Mutation Research*, 20(11), pp. 61-62.

Mortelmans, K. e Zeiger, E. (2000). The ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research*, 20(11), pp. 29-60.

Nogueira, J. M. F. (2003). Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos, *Química*, 88, pp. 65-71.

Nogueira, L. (2013). *Influência da hipoxia em respostas bioquímicas de mexilhões Perna perna expostos ao biodiesel B5*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

Parkinson, A. e Ogilvie, B. W. (2010). Biotransformation of xenobiotics. *In: Shanahan, J. e Naglieri, C. (Ed.). Essentials of Toxicology (2)*. Chicago, Mc Graw Hill Medical, pp.71-98.

Odile, DG. *et al.* (2016). Origino f Energy Metabolism Impairments. *In: Triquet, A., Amiard, JC., Raibow, P. S. (Ed.). Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, New York, CRC Press, pp. 279-306.

Pedro, J. (2008). *Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste Allium cepa*. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Peterson, J. S. e Bain, L. J. (2004). Differential gene expression in anthracene-exposed mummichogs (*Fundulus heteroclitus*), *Aquatic Toxicology*, 66, pp. 345-355.

Pfau, W. (1997). DNA adducts in marine and freshwater fish as biomarkers of environmental contamination, *Biomarkers*, 2, pp.145-151.

Purdom, J. C. P. *et al.* (1998). Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone, *Aquatic Toxicology*, 42, pp. 243-253.

Rodrigues, S. *et al.* (2016). Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of *Oncorhynchus mykiss*, *Science of Total Environment*, 545-546, pp. 591-600.

Roesijadi, G. e Robinson, W. E. (1994). Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *In: Malins, D. C., Ostrander, G. K. (Ed.). Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, pp. 387-420.

Rotchell, J. M. e Ostrander, G. K. (2003). Molecular markers of endocrin disruption in aquatic organisms, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6, pp. 453-496.

Routledge, E. J. *et al.* (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *in vivo responses* in trout and roach, *Environment Science & Technology*, 32, pp. 1559-1565.

Ryan, P.B. *et al.* (2007). Using biomarkers to inform cumulative risk assessment, *Environmental Health Perspectives*, 115(5), pp. 833-840.

Santos, S. (2009). *Estudo da actividade inibidora de acetilcolinesterase e actividade antioxidante por derivados de colina e ácido cafeico, cinâmico e rosmarínico*. Tese de Mestrado, Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa.

Sekabira, K. *et al.* (2010). Assessment of heavy metal pollution in the urban stream sediments and its tributaries, *International Journal of Environmental Sciences and Technology*, 7(3), pp. 435-446.

Slikker, W. e Bowyer, J. (2005). Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206, pp. 225-260.

Silva, A. (2004). *Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquáticas*. Tese de Mestrado, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual Londrina.

Silva, T. (2013). *Avaliação Ecológica do Efeito Combinado de Contaminantes Ambientais*. Tese de Doutoramento, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

Schmid, T. *et al.* (2002). Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Toxicology Letters*, 131, pp. 65-74.

Shugart, L. R. *et al.* (2003). Genetic Effects of Contaminant Exposure and Potencial Impacts on Animal Populations. *In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr., Cairns J. Jr. (Ed.). Handbook of Ecotoxicology.* CRC Press, pp. 1129-1148.

Singh, N. P. *et al.*, (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175, pp. 184-191.

Sogorb, M. A. *et al.* (2014). An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using *in vitro* alternative methods, *Toxicology Letters*, 230, pp. 356-367.

Stagg, R. M. *et al.* (2000). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of the cyp1a in salmon (*Salmo salar*) following experimental exposure and after the Braer oil spill, *Environmental Toxicology*, 19, pp. 2797-2805.

Stegeman, J. J. *et al.* (1992). Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. *In: Huggett, R. J., Kimerly, R. A., Mehrle, P. M., Jr., Bergman, H. L. (Ed.). Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, pp. 235-335.

Sumpter, J. P. e Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environmental Health Perspectives*, 103(7), pp. 173-178.

Sumpter, JP. (2005). Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview, *Acta Hydrochemica et Hydrobiologica*, 33, pp. 9-16.

Thompson, S. *et al.* (2000). Comparative Vitellogenic Responses in Three Teleost Species: Extrapolation to *in situ* Field Studies, *Marine Environmental Research*, 51, pp. 185-189.

Tsao, C. Y., Pan, Y. Z. e Jiang, S. T. (2003). Purification and characterization of amylase from small abalone (*Sulculus diversicolor aquatilis*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 1064-1070.

United States Environmental Protection Agency. (2016). *Special Report on environmental endocrin disruption: an effects assessment and analysis*. Washington DC, Office of Reserch and Development.

Ventura, B. C. (2004). *Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando Allium cepa e Oreochromis niloticus como sistemas-teste*. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Valavanidis, A. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, pp. 178-189.

Van der Oost *et al.* (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), pp. 57-149.

Wheelock, C. E. *et al.* (2005). Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos, *Aquatic Toxicology*, 74, pp. 172-192.

Winston, G. W. e Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Aquatic Toxicology*, 19, pp. 137-161.

Winter, M. J. *et al.* (2004). DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK, *Mutation Research*, 552, pp. 163-175.

Wirgin, I. e Waldman, J. R. (1998). Altered gene expression and genetic damage in North American fish mechanism of methylmercury cytotoxicity, *American Journal of Pathology*, 399, pp 193-219.

Witorsch, R. J. (2002) Endocrine Disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 36, pp. 188-130.

World Wild Foundation. (2000). Problem with toxics: EDC's. [Em linha]. Disponível em www.wwf.org [Consultado em 23/06/2016].

Yancheva, V. S. *et al.* (2016). Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review, *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(1), pp.47-75.

Yevich, P. P. e Yevich, C. A. (1994). Use of histopathology in biomonitoring marine invertebrates. *In*: Kramer, K. J. M. (Ed.). *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*, Boca Raton, Florida, CRC Press, pp.179-192.