

## **Título**

Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes de sedimentos do Estuário do Sado numa linha celular humana\*

## **Autores**

Miguel Pinto<sup>1</sup>, Pedro Manuel Costa <sup>1,2</sup>, Henriqueta Louro<sup>1</sup>, Maria Helena Costa<sup>2</sup>, João Lavinha<sup>1</sup>, Sandra Caeiro<sup>2,3,4</sup>, Maria João Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P., Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>IMAR — Instituto do Mar, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Aberta, Rua da Escola Politécnica, 141, 1269-001 Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>CENSE — Centre for Environmental and Sustainability Research, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

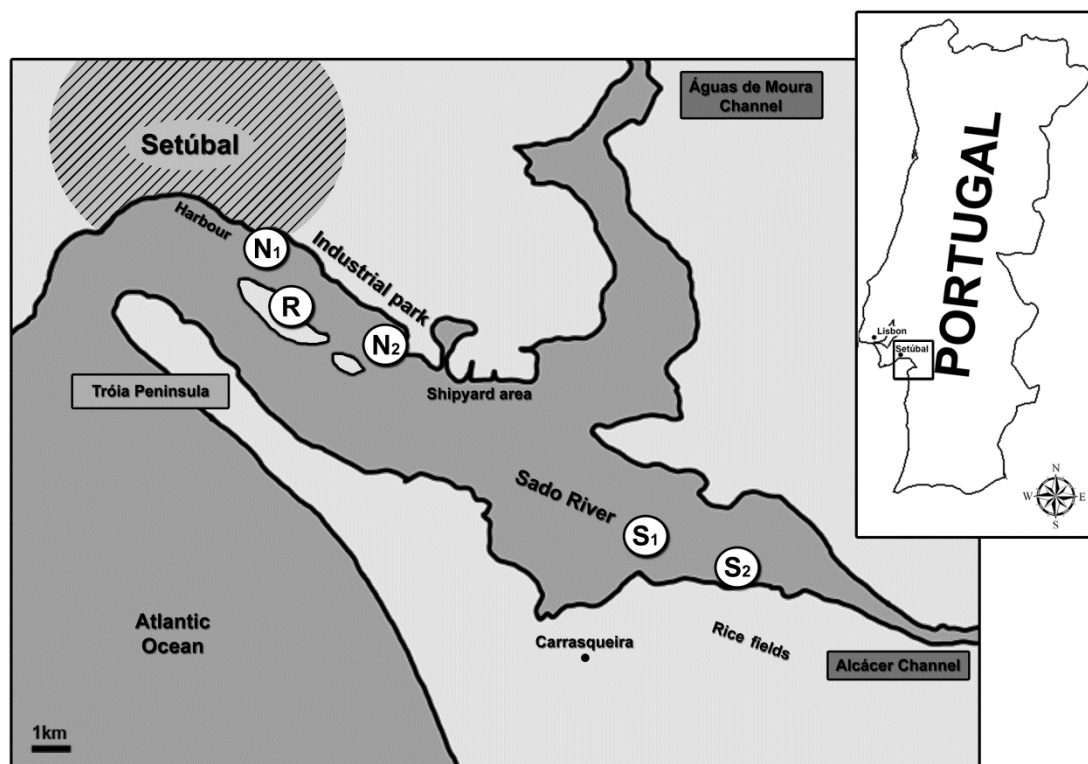
[m.joao.silva@insa.min-saude.pt](mailto:m.joao.silva@insa.min-saude.pt)

\*Baseado na publicação Pinto M, Costa PM, Louro H, Costa MH, Lavinha J, Caeiro S, Silva MJ. *Determining oxidative and non-oxidative genotoxic effects driven by estuarine sediment contaminants on a human hepatoma cell line*. Science of the Total Environment 2014, 478, 25–35.

## **Introdução**

O Estuário do rio Sado (Sudoeste Portugal) é o segundo maior do país e caracteriza-se por ter um grande valor ecológico e económico (Fig. 1). Apesar de ter vindo a ser afetado ao longo dos anos por várias fontes de poluição de origem urbana, industrial e agrícola, ainda continua a ser, para a população local, um local privilegiado para atividades piscícolas e agrícolas. A margem Norte é caracterizada por uma vasta zona urbana e industrial, localizada em torno da cidade de Setúbal; a margem Sul é bem conhecida pela presença de pequenas aldeias cuja população se ocupa, essencialmente, em práticas de pesca no estuário e de pequena agricultura, para além da existência da península de Troia, zona de alto valor turístico<sup>(1)</sup>. Estudos anteriores revelaram a existência de diversas classes de contaminantes nos sedimentos deste estuário, incluindo metais, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), cujos efeitos adversos em organismos vivos são conhecidos e já foram observados neste ambiente<sup>(2)</sup>. Destes conhecimentos prévios surgiu uma preocupação relacionada com a potencial bioacumulação de contaminantes nas partes edíveis de espécies estuarinas, ou de produtos agrícolas de origem local, que poderiam entrar assim na cadeia alimentar humana e representar um problema de saúde pública. Neste contexto, o estudo da toxicidade ao nível genético - tal como a formação de quebras e/ou danos oxidativos no DNA ou de alterações cromossómicas - em modelos celulares ou animais, assumiu-se como particularmente relevante para a caracterização do potencial efeito nocivo dos contaminantes presentes nas

águas e nos sedimentos estuarinos. Atualmente, de entre os biomarcadores de um efeito biológico (p.ex., de genotoxicidade) disponíveis, o ensaio do micronúcleo<sup>(3)</sup> e o ensaio do cometa<sup>(4)</sup> são os mais utilizados.



**Fig. 1** – Mapa da área de estudo, o Estuário do Sado, com indicação dos diferentes locais de amostragem utilizados neste trabalho (N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e R).

## Objetivos

O presente estudo integra-se num projeto mais amplo que visa avaliar o risco ambiental – que inclui os riscos ecológicos e para a saúde humana - associado a este ambiente estuarino contaminado. Em particular, este estudo teve como objetivo caracterizar o potencial citotóxico e genotóxico de sedimentos colhidos em vários locais de pesca do Estuário do Sado numa linha celular humana, tendo em vista uma avaliação de eventuais efeitos nefastos para a saúde humana.

## Material e métodos

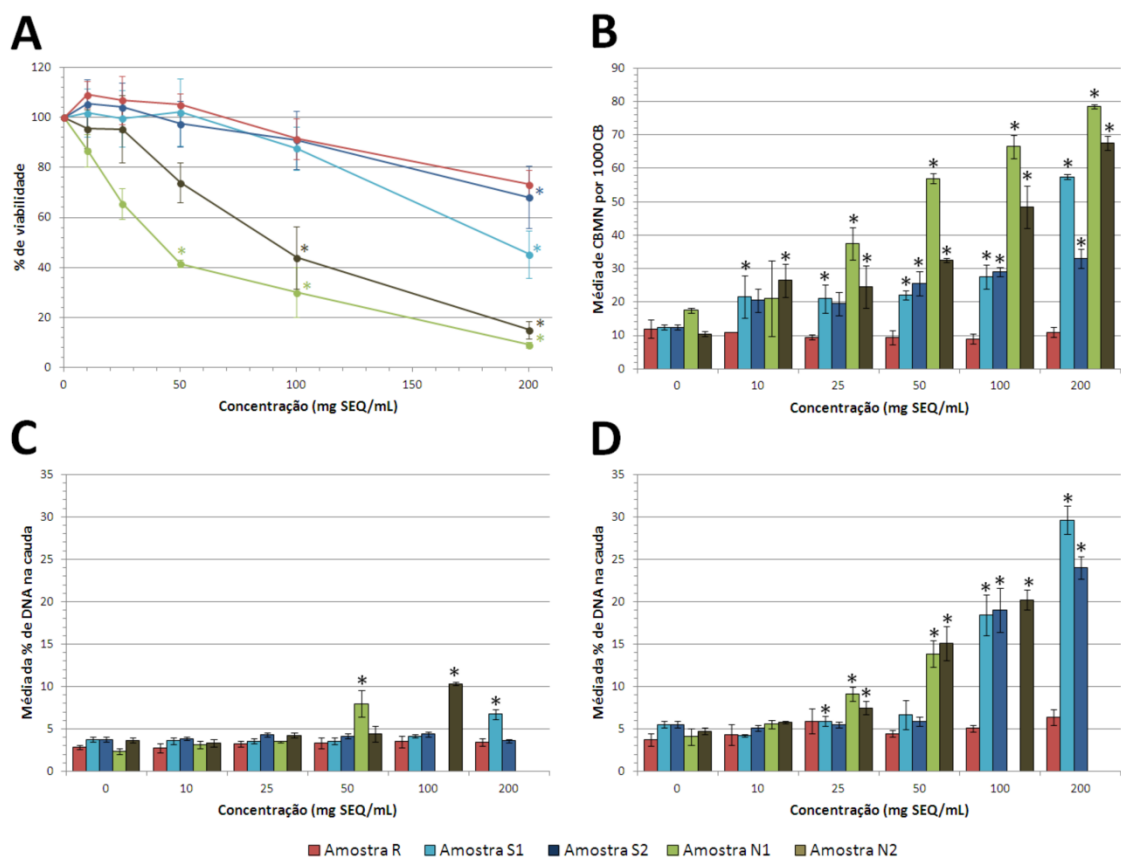
As amostras de sedimentos foram colhidas em 5 locais de pesca distintos do Estuário do Sado: amostras N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> na margem Norte (urbana/industrial), amostras S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> na margem Sul (agrícola) e uma amostra de referência R colhida num banco de areia (Fig. 1). As amostras foram previamente caracterizadas para contaminantes orgânicos e inorgânicos<sup>(5,6)</sup>. Para ensaios celulares, os contaminantes foram extraídos com uma mistura de diclorometano:metanol e recuperados em dimetilsulfóxido (DMSO). Os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos finais foram avaliados na linha celular derivada de um hepatoma humano HepG2 através do ensaio do vermelho neutro e dos ensaios do cometa [modificado com formamido-pirimidina-DNA glicosilase (FPG), para revelar danos oxidativos no DNA] e

micronúcleo, respetivamente, após uma exposição de 48h a diferentes concentrações de extratos de sedimento [de 10 até 200 mg sedimento equivalente (SEQ)/mL de meio de cultura]

## **Resultados**

Os resultados dos diferentes ensaios encontram-se apresentados na Fig. 2. Após uma exposição de 48h, os extratos N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> induziram a maior redução na viabilidade de celular, até app. 91 e 85% de redução, respetivamente. Em contraste, os extratos S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> mostraram-se menos citotóxicos, com uma redução da viabilidade celular até app. 45%. A amostra de referência R não induziu citotoxicidade.

A análise dos resultados dos efeitos genotóxicos avaliados pelo ensaio do cometa, revelou a indução de quebras ao nível do DNA (sem FPG) e de danos oxidativos no DNA (com FPG), após a exposição a todos os extratos exceto o R. No geral, os níveis de danos não-oxidativos foram mais elevados em células expostas aos extratos de sedimentos da área Norte do estuário, enquanto que os níveis de danos oxidativos no DNA foram mais elevados após exposição aos extratos da área Sul. Isto é, as amostras N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> induziram um aumento significativo da percentagem de DNA na cauda, sem tratamento com FPG, às concentrações testadas mais elevadas, em comparação com o controlo de solvente. No entanto, as amostras S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> induziram sobretudo danos oxidativos no DNA, sendo que o valor de percentagem de DNA na cauda, aquando tratamento com FPG, foi 6 vezes superior ao observado sem FPG. Todas amostras contaminadas induziram também um aumento significativo do número de células binucleadas micronucleadas (CBMN), dependente da concentração, revelando um potencial de induzir danos ao nível cromossómico. As amostras N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> aumentaram a frequência de CBMN em cerca de 4 a 6 vezes, respetivamente, a 200 mg SEQ/mL, quando comparado com o controlo de solvente. Em contraste as amostras S<sub>2</sub> e S<sub>1</sub> produziram um aumento significativo da frequência de CBMN app. 3 a 4 vezes superior ao controlo de solvente, à concentração testada mais elevada.



**Fig. 2** – Resultados dos ensaios do vermelho neutro (A), micronúcleos (B), cometa (C) e cometa modificado com FPG (D) em células HepG2, após uma exposição de 48 h aos diferentes extratos de sedimentos (10 a 200 mg SEQ/mL). Os resultados apresentados são o valor médio ( $\pm$ EP) de 3 experiências independentes (para A, C e D), e o valor médio ( $\pm$ DP) (para B). A concentração de 0 mg SEQ/mL corresponde ao controle de solvente (DMSO a 2%, com exceção da amostra N1 no ensaio do cometa que corresponde a 0,5%). CBMN – Célula binucleada micronucleada; \* - Diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o respetivo controle.

## Discussão

Os resultados sugerem que existe uma diferença ao nível do potencial genotóxico dos sedimentos do estuário do Sado, dado que as amostras colhidas na margem Norte do estuário (N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub>) exibem valores mais elevados de indução de quebras de DNA e de micronúcleos do que as amostras colhidas na margem Sul do estuário (S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>) que exibem, sobretudo, valores mais elevados de danos oxidativos de DNA. Conjuntamente com a análise de contaminantes dos sedimentos<sup>(5,6)</sup>, sugere-se que os resultados obtidos para as amostras N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> serão principalmente devidos à presença de um nível mais elevado de contaminantes orgânicos, tais como HAPs, pesticidas ou bisfenilos policlorados, enquanto os resultados obtidos para as amostras S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> se deverão à predominância de contaminantes de origem inorgânica (metais e metaloides). No que diz respeito à amostra R, a falha na indução tanto de citotoxicidade como de genotoxicidade, nos diferentes ensaios, encontra-se concordante com os valores muito baixos de contaminação observados, confirmando ser uma boa área de referência<sup>(6)</sup>. Assim, apesar do estuário ter sido classificado como moderadamente contaminado, com base apenas na caracterização dos contaminantes dos sedimentos, o presente estudo revela que a mistura desses mesmos contaminantes é

capaz de induzir citotoxicidade e genotoxicidade, dependente da concentração, numa linha celular humana. Para além disso, os efeitos observados tiveram também um poder discriminatório capaz de distinguir duas áreas ecogeográficas distintas, a urbana/industrial e a rural/agrícola.

### **Conclusões**

Os resultados obtidos sugerem que células HepG2 expostas a contaminantes da área Norte (urbana/industrial) apresentam os danos genotóxicos mais permanentes, refletidos na forte indução de micronúcleos. Em contraste, a exposição a extratos da área Sul (agrícola) resultou, particularmente, na indução de danos oxidativos no DNA. Estes resultados são concordantes tanto com os níveis e natureza da contaminação observada, como com os efeitos genotóxicos dos sedimentos previamente demonstrados *in vivo*, em espécies estuarinas.

Este estudo revelou que os resultados integrados dos indicadores de citotoxicidade, genotoxicidade e stress oxidativo obtidos em linhas celulares humanas expostas às misturas de contaminantes sedimentares, poderão constituir uma linha de evidência valiosa para a avaliação do risco para a saúde humana decorrente da exposição a um ambiente estuarino (moderadamente) contaminado.

### **Referências**

- (1) Caeiro S, Costa MH, Ramos TB, Fernandes F, Silveira N, Coimbra A, et al. Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: an index analysis approach. *Ecol Indic* 2005;5:151–69.
- (2) Costa PM, Caeiro S, Vale C, Delvalls T, Costa MH. Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? a case study with a benthic fish. *Environ Pollut* 2012;161:107–20.
- (3) Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007;2:1084–104.
- (4) Collins AR. Investigating Oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 2009;681:24–32.
- (5) Costa PM, Neuparth TS, Caeiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, et al. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: laboratory versus *in situ* studies. *Environ Res* 2010;111:25–36.
- (6) Carreira S, Costa PM, Martins M, Lobo J, Costa MH, Caeiro S. Ecotoxicological heterogeneity in transitional coastal habitats assessed through the integration of biomarkers and sediment–contamination profiles: a case study using a commercial clam. *Arch Environ Contam Toxicol* 2013;64:97–109.