

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E DO AMBIENTE

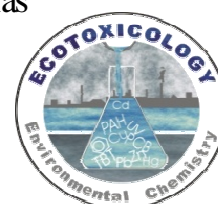
**ESTUDO DE ALP
COMO BIOMARCADOR DE
DISRUPÇÃO ENDÓCRINA EM
*Mytilus galloprovincialis***



Dissertação do Curso de Mestrado
Estudos Marinhos e Costeiros VI – Gestão Ambiental de Zonas Costeiras

Catarina Guerreiro Pereira

Faro, 2009



O conteúdo desta dissertação é da inteira responsabilidade da sua autora

Agradecimentos

À Prof. Doutora Alexandra Cravo, orientadora científica desta tese, agradeço a incansável disponibilidade, a ajuda fundamental, um tema de estudo e as condições para que este trabalho resultasse. E tudo o resto, contido nas acções, mas que não caberia aqui.

À Professora Doutora Maria João Bebianno, agradeço a oportunidade dada para trabalhar no seu laboratório, a integração na equipa e as condições logísticas na realização deste estudo.

Ao pessoal do laboratório de Ecotoxicologia e Química Ambiental, e em especial à Ângela, agradeço o apoio técnico, a ajuda preciosa, além do óptimo ambiente de trabalho e camaradagem. À Rita, Bli e Rui, obrigada pelas gargalhadas partilhadas.

À Olinda, a minha diligente “aprendiz”, sem a qual não tinha levado este trabalho a bom porto.

À Tânia, pelo valioso auxílio em termos técnicos e estatísticos e conhecimentos partilhados, à Cátia, incansável em ajudar e sempre à altura de qualquer tarefa, à Catarina, eterna companheira de trabalho, à Suze, mentora no lazer, e à Maria, pelo apoio incondicional e fonte de força e optimismo. Obrigada pela vossa amizade, paciência e companheirismo infindáveis.

A todos os amigos, os grandes e os especiais, cujos nomes não menciono porque não quero que fique a faltar nenhum! Em especial à “família” do B.A., sempre presente mesmo que só em pensamento, quando a ausência se impõe. A vossa existência torna o caminho mais fácil de percorrer.

À família, agradeço o que costuma vir já com o pacote, e tudo o resto que o pacote não contempla, e que nem por isso deixo de receber. À mAna, a minha fã número um, ao Papá, a imensa confiança, à Mamã, uma força motriz, que me ensinou que basta acreditar!

Resumo

Anualmente, milhares de toneladas de compostos xenobióticos são libertados nos ambientes aquáticos em misturas complexas, onde podem causar danos permanentes nos organismos que a eles se encontram expostos. Algumas destas substâncias têm a capacidade de interferir com o sistema endócrino (compostos disruptores endócrinos – DE) e incluem uma variedade de compostos estrogénicos naturais e sintéticos com a capacidade de mimetizar ou interferir com a actividade “normal” das hormonas endógenas aos organismos (compostos xenoestrogénicos). Efluentes municipais e industriais (tratados e não tratados), onde se incluem hormonas estrogénicas naturais (ex: estradiol) e sintéticas (ex: etinilestradiol), compostos estrogénicos sintéticos associados a detergentes (ex: nonilfenol), plastificantes (ex: bisfenol A), metais, bem como fitoestrogénios, pesticidas e bifenis policlorados (PCBs), são reconhecidas fontes destes químicos, e já foram detectados em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce, representando assim uma potencial ameaça na reprodução e desenvolvimento de populações aquáticas.

Os bivalves, importantes membros dos ecossistemas aquáticos, são particularmente susceptíveis a disrupção endócrina e um dos efeitos documentados dos compostos xenoestrogénicos é a indução da expressão da vitelogenina (Vtg). Esta proteína precursora das reservas energéticas no desenvolvimento embrionário é característica das fêmeas, apresentando níveis geralmente baixos nos machos e juvenis. Assim, esta proteína tem sido proposta como biomarcador de disrupção endócrina, nomeadamente através da sua determinação indirecta pelo método dos Fosfatos Lábeis Alcalinos (ALP). Vários trabalhos já comprovaram a sua utilização, demonstrando que maiores concentrações de ALP (principalmente em machos e fêmeas imaturas) são indicativas da presença de estrogénios ambientais. Com o intuito de contribuir para a avaliação da presença de compostos DE na costa sul de Portugal, especificamente em áreas de portos, marinas e estuários, este trabalho teve como objectivo estudar a utilização das proteínas do tipo-Vtg como biomarcadores de exposição a xenoestrogénios em mexilhões, determinadas através do método do ALP nas gónadas de fêmeas e machos de *Mytilus galloprovincialis*. Esta espécie foi recolhida em oito locais da zona costeira algarvia, em zonas próximas de grandes centros urbanos, comparativamente a um local de baixa influência antropogénica. Os resultados indicam alguma variabilidade em termos espaciais e sazonais, e fêmeas com concentrações de ALP, em geral, superiores aos machos. As maiores concentrações deste biomarcador, bem como a inexistência de diferenças entre sexos, nos mexilhões de Sagres ($88,4 \pm 12,9 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), Portimão ($91,4 \pm 22,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e VRSA ($78,9 \pm 10,0 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), parecem indicar uma maior exposição a compostos xenoestrogénicos, ao contrário dos de Lagos ($32,3 \pm 4,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), Faro ($30,5 \pm 5,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e Tavira ($30,5 \pm 4,3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), que apresentaram valores inferiores. Em Sagres, descargas de águas residuais, bem como as escorrências de água inerentes às actividades de um porto piscatório e da zona agrícola envolvente, e o tráfego

marítimo na região, podem estar na origem da contaminação. Em Portimão e VRSA, os locais em estudo situaram-se em estuários e este tipo de ecossistema está reconhecidamente associado a vários níveis de contaminação, principalmente devido a escorrências bem como efluentes de grandes centros urbanos, provenientes de zonas adjacentes, como é o caso. O estuário do Guadiana, em particular, está descrito como estando sob uma maior contaminação por disruptores endócrinos a nível do país. Na marina de Lagos e na zona lagunar da Ria Formosa, nos portos de Faro e Tavira, os mexilhões parecem estar sob menor influência de xenoestrogénios. A praia da Figueira ($49,1 \pm 9,6 - 53,7 \pm 8,6 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), o local que se esperava registar menor impacto antropogénico, não se apresentou muito diferente dos demais locais em termos de indução da síntese de Vtg, à excepção de Sagres, pelo que a possibilidade de alguma influência antropogénica não pode ser desconsiderada. Sazonalmente, o Inverno de 2006 ($91,4 \pm 22,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) foi a época do ano em que os mexilhões se apresentaram mais afectados por DE, quando consideradas as mais elevadas concentrações de ALP, enquanto em 2008 se verificaram mais situações de semelhança entre os valores nos dois sexos. No verão de 2007 ($28,1 \pm 3,3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) os mexilhões apresentaram-se com menores concentrações deste biomarcador e maior número de locais com fêmeas significativamente mais elevadas que os machos. Apesar de serem esperadas maiores concentrações de ALP nos mexilhões amostrados nos Verões devido ao maior impacto antropogénico causado pelo turismo na região, este resultado pode estar relacionado com as chuvas associadas aos Invernos e respectivas escorrências que acarretam entrada de contaminantes no meio aquático, nomeadamente maiores caudais de efluentes das ETARs. A comparação das concentrações do ALP com dados de metais e hidrocarbonetos (PAHs) não revelou nenhuma associação particular entre o biomarcador e os contaminantes testados. Assim, considerou-se que a determinação das proteínas do tipo-Vtg pelo método do ALP pode vir a ser utilizada como potencial biomarcador de efeito à exposição a contaminantes xenoestrogénicos em mexilhões *M. galloprovincialis*, salvaguardando-se a necessidade de um estudo com uma maior frequência de amostragem para seguir a evolução das concentrações de ALP ao longo do ciclo reprodutivo, para a espécie e locais em estudo.

Abstract

A wide range of compounds, continuously released into the aquatic environment and present in complex mixtures, are able to interfere with the endocrine system of organisms causing adverse effects on various levels. These chemicals, named “endocrine disrupting compounds” (EDCs), include both natural and synthetic estrogens, as well as a variety of estrogen-mimicking chemicals (xenoestrogens). Such compounds include both natural (ex: estradiol) and synthetic (ex: ethinylestradiol) estrogens, synthetic estrogenic compounds associated with detergents (ex: nonylphenol), plasticisers (ex: bisphenol A), metals, as well as phytoestrogens, pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs). These are usually associated with municipal and industrial wastewater discharges, and were detected in freshwater, estuarine and marine environments, thus representing a potential hazard for aquatic species.

Bivalves are important and abundant species of the aquatic ecosystems and susceptible to suffer endocrine disruption. Xenoestrogens can affect particularly the reproductive functions through the induction of vitellogenin-like (Vtg-like) proteins, which are precursors of energetic reserves in embryonic development. These proteins are typically associated to females, presenting low levels in males and juveniles. Hence, they have been proposed as a biomarker of endocrine disruption. Recently, the levels of Vtg-like proteins were quantified in bivalves by an indirect method such as the Alkali-labile Phosphates (ALP) assay. Several studies have proved its viability as a biomarker of ED, revealing higher ALP concentrations especially in males and immature females, indicative of the presence of environmental estrogens.

The aim of this study was to evaluate the presence of EDCs in the south coast of Portugal, specifically in harbours, marinas and main estuaries areas, using Vtg-like proteins as a biomarker of exposure to xenoestrogenic compounds in mussels, through the use of the ALP assay in female and male gonads of *Mytilus galloprovincialis*. Mussels were sampled at eight sites along the Algarve coastal zone, in the vicinity of the major urban areas, in comparison with mussels from a beach less exposed in terms of anthropogenic influence.

Results indicate spatial and seasonal variability, and females showed generally higher ALP concentrations than males. Mussels from Sagres ($88.4 \pm 12.9 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), Portimão ($91.4 \pm 22.5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) and VRSA ($78.9 \pm 10.0 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) presented higher levels and similar ALP values between genders, suggesting the influence of EDCs, in opposition to the lower ALP concentrations in mussels from Lagos ($32.3 \pm 4.5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), Faro ($30.5 \pm 5.5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) and Tavira ($30.5 \pm 4.3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Wastewater discharges along with water runoff from a fishing harbor, shipping traffic and agricultural influence in the area can be a contamination source in Sagres. Study sites in Portimão and VRSA were located within estuaries and these ecosystems are known to be associated with several levels of contamination, mainly due to runoff and sewage discharges from

neighboring urban areas. Guadiana estuary in particular is already described as being under the influence of EDCs. *M. galloprovincialis* from the marina of Lagos and the harbors within the Ria Formosa Lagoon (Faro and Tavira) appear to be in environments less exposed to xenoestrogenic compounds. Despite the apparently less impacted beach (Figueira: $49,1 \pm 9,6 - 53,7 \pm 8,6 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), it was not so different from the other locations, except from Sagres, in terms of Vtg induction. The possibility of contamination could not be ignored. As for seasons, the biomarker under study presented the highest concentrations in the 2006 winter ($91,4 \pm 22,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) but differences in the ALP levels between genders were less marked in the winter of 2008. The lowest values were determined in mussels sampled in the summer of 2007 ($28,1 \pm 3,3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), with high number of locations presenting females with higher ALP concentrations in relation to males. In the summer, the Algarve region suffers higher anthropogenic impact due to tourism, and so higher ALP concentrations in mussels from this season were expected. However, the opposite results here found could be related with heavy rainfall, water drainage and runoff, in winter, known to carry heavier loads of contaminants into the aquatic environments. When comparing the ALP concentrations with available metals and hydrocarbons (PAHs) data no association between the biomarker and those contaminants was found, although some relations could be drawn. In conclusion, the quantification of Vtg-like proteins through the ALP assay can be considered a potential indicator of exposure effects to xenoestrogenic contaminants in mussels *M. galloprovincialis*. Nevertheless, it is imperative to study it within a more frequent sampling period, accompanying the reproductive cycle of this species, in this region.

Índice

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contaminação de Ambientes Aquáticos/Costeiros	1
1.2. Monitorização Ambiental e Utilização de Espécies Bioindicadoras	3
1.3. Biomarcadores	6
1.4. Disrupção Endócrina	9
1.4.1. Biomarcadores de DE: proteínas do tipo vitelogenina	13
1.5. Objectivos	14

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Espécie em Estudo	15
2.2. Amostragem e Locais em Estudo	16
2.3. Análises Biológicas	18
2.3.1. Índice de Condição (IC)	18
2.3.2. Fosfatos Lábeis Alcalinos (ALP)	19
2.3.2.1. Determinação de Proteínas Totais pelo Método de Bradford, 1976	20
2.3.3. Histopatologia das Gónadas	21
2.3.4. Peroxidação Lipídica (LPO)	22
2.3.4.1. Determinação das Proteínas Totais pelo Método de Lowry, 1951	24
2.4. Análise Estatística	24

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros Abióticos	27
3.2. Índice de Condição	28
3.3. Concentração de proteínas do tipo vitelogenina – ALP	29
3.3.1. Variação sazonal de ALP em VRSA	36
3.4. Histopatologia das Gónadas	38

3.5. Análise comparativa de ALP e IC	44
3.6. Stress Oxidativo – Determinação da Peroxidação Lipídica (LPO)	45
3.6.1. Análise comparativa de ALP e LPO	47
3.7. Análise global	48
3.7.1. Análise comparativa com contaminantes	51
4. DISCUSSÃO	54
4.1. Variação de ALP entre sexos de <i>M. galloprovincialis</i>	56
4.2. Variação espacial de ALP em <i>M. galloprovincialis</i>	61
4.3. Variação temporal de ALP em <i>M. galloprovincialis</i>	70
4.4. Variação sazonal de ALP em <i>M. galloprovincialis</i> de VRSA	74
4.5. Análise comparativa da concentração de ALP com contaminantes	78
4.6. Comparação com outros estudos	83
4.7. Considerações Finais	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Lista de Abreviaturas

4-HNE	4-Hidroxicalceno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP	Método dos Fosfato Lábeis Alcalinos, do inglês <i>Alkali-labile phosphates</i>
APES	Alquilfenóis etoxilados, do inglês <i>alkylphenol ethoxylates</i>
BCF	Factor de bioconcentração, do inglês <i>bioconcentration factor</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado
BIOHOTA	Biomarcadores em bivalves de hotspots de contaminação da costa algarvia
BPA	Bisfenol A
BSA	Soro de albumina de bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCA	Análise de correspondência canónica
Cd	Cádmio
DBT	Dibutil-estanho
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DE	Disruptores endócrinos
E2	17 β -estradiol
ELISA	Técnica imunológica, do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent</i>
ER	Receptores hormonais de estrogénio, do inglês <i>estrogen receptors</i>
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
FCT	Fundação para a Ciência e Tecnologia
HCl	Ácido clorídrico
IC	Índice de condição
LPO	Peroxidação lipídica, do inglês <i>Lipid peroxidation</i>
MDA	Malonedialdeído
Ni	Níquel
NP	Nonilfenol
NSO	Petróleo do Mar do Norte, do inglês <i>North Sea Oil</i>

PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, do inglês <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
Pb	Chumbo
PCA	Análise de componentes principais
PCBs	Bifenis policlorados
PPCPs	Agentes farmacêuticos e produtos de cuidado/higiene pessoal
RIA	Técnica rádio-imunológica
ROS	Espécies reactivas de oxigénio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
SHBG	Globulina ligante das hormonas sexuais, do inglês <i>sexual hormone binding globuline</i>
TBT	Tributil-estanho
Vn	Vitelina
VRSA	Vila Real de Santo António
Vtg	Vitelogenina
Zn	Zinco

1. Introdução

1.1. Contaminação de Ambientes Aquáticos/Costeiros

O aumento da poluição marinha constitui um problema crescente, particularmente nos países industrializados. A elevada e crescente concentração populacional e industrial nas zonas litorais tem resultado em modificações substanciais da costa e em efeitos adversos no ambiente aquático, pelo maior impacto da contaminação nestas áreas. As zonas costeiras e estuarinas, principalmente baías e enseadas próximas de portos, cidades ou áreas industriais, encontram-se mais sujeitas à influência de um largo espectro de contaminantes de origem antropogénica que exibem uma persistência e uma grande capacidade de acumulação no meio marinho. Estes ambientes tornam-se assim o reservatório final para um número incontável de compostos químicos libertados pelo Homem, quer através de descargas directas (efluentes municipais, industriais e domésticos), ou difusas (escorrências urbanas e agrícolas) ou mesmo por processos de deposição atmosférica (Bishop, 1983; Phillips & Rainbow, 1994; Stegeman & Hahn, 1994; Zorita *et al.*, 2007; Bocchetti *et al.*, 2008).

Anualmente, milhares de toneladas de compostos sintéticos são produzidos e utilizados na indústria e agricultura, acabando por ser libertados nos ambientes aquáticos, juntamente com grandes quantidades de produtos derivados. Estes químicos antropogénicos juntam-se a uma multiplicidade de produtos naturais também tóxicos, normalmente presentes em misturas complexas, englobando o que se chama de xenobióticos (Stegeman & Hahn, 1994).

As grandes cidades actuam como principais fontes de poluição/contaminação para os ecossistemas aquáticos devido aos sistemas de drenagem de águas residuais, tratadas ou não, que recebem os efluentes das muitas indústrias localizadas nos seus territórios, bem como de origem doméstica. Todos estes efluentes contêm diferentes tipos de compostos xenobióticos tóxicos (Sabik *et al.*, 2003). Na grande maioria das situações de contaminação, ocorre uma entrada múltipla de compostos, ou seja, a contaminação resulta de uma mistura complexa de

contaminantes que pode estimular uma variedade de mecanismos de toxicidade nos organismos expostos (Bayne *et al.*, 1982; Atkinson *et al.*, 2003; Fent, 2004). Diferentes grupos de contaminantes podem ter diferentes efeitos nos organismos, nomeadamente antagónicos, aditivos ou sinérgicos. Um único composto pode ter um efeito detectável nos processos fisiológicos, mas em combinação com outros poderá ter um efeito cumulativo atenuado (antagónico), os efeitos podem ser adicionados (aditivos) ou ainda o efeito final poderá ser superior à soma dos compostos isolados (sinérgico) (Colborn *et al.* 1993; Atkinson *et al.*, 2003; Honkoop *et al.*, 2003).

Os efluentes municipais e industriais, aliados aos resíduos drenados por zonas agrícolas, actividade pecuária e rede viária, representam a maior parte dos contaminantes descarregados no meio aquático e, mesmo com tratamento apropriado, libertam uma mistura complexa de compostos naturais e sintéticos como metais, compostos orgânicos, onde também se incluem hormonas naturais e/ou sintéticas, agentes farmacêuticos e produtos de cuidado/higiene pessoal (designados na literatura anglo-saxónica como *Pharmaceuticals and Personal Care Products* – PPCPs), entre outros (Sumpter, 1998; Birkett & Lester, 2003; Gagné & Blaise, 2003; Islam & Tanaka, 2004; Gagné *et al.*, 2006). Estes xenobióticos, mesmo em baixas concentrações, podem causar danos permanentes nos organismos que a eles se encontram expostos, induzindo mecanismos de resposta à toxicidade que envolvem alterações das funções fisiológicas, ameaçando a sobrevivência das espécies (Atkinson *et al.*, 2003; Islam & Tanaka, 2004). Substâncias como os organoclorados (ex. PCBs), organoestânicos (ex. TBT), hidrocarbonetos (ex. PAHs), surfactantes (ex. APES – *alkylphenol ethoxylates* – como o nonilfenol e octilfenol), plastificantes e agentes farmacêuticos, são hoje em dia muito comuns no meio aquático e possuem um potencial de disfunção reprodutiva pela disrupção do sistema endócrino dos organismos existentes nos locais sob o efeito deste tipo de xenobióticos (Colborn *et al.*, 1993; Sumpter, 1998; Blasco *et al.*, 1999; Kime *et al.*, 1999; Morcillo &

Porte, 2000; EDMAR, 2002; Gagné & Blaise, 2003; Sabik *et al.*, 2003; Álvarez-Muñoz *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007). Estes compostos, denominados de disruptores endócrinos (DEs), incluem uma variedade de compostos estrogénicos naturais e sintéticos com a capacidade de mimetizar ou interferir com a actividade “normal” das hormonas endógenas aos organismos, sendo por isso chamados de compostos xenoestrogénicos (EPA, 1997; Sumpter, 1998; Depledge & Billinghamurst, 1999; EC, 1999; EDMAR, 2002; Atkinson *et al.*, 2003; Gagné & Blaise, 2003; Jobling *et al.*, 2003; Quinn *et al.*, 2004 ; Ropero *et al.*, 2006).

1.2. Monitorização Ambiental e Utilização de Espécies Bioindicadoras

Nas últimas décadas do século XX, a humanidade consciencializou-se dos efeitos adversos e prolongados de muitos xenobióticos e o risco implícito para os ecossistemas aquáticos. Estes compostos são persistentes, rapidamente bioacumulados nos tecidos dos organismos e alguns podem mesmo ser bioamplificados através da cadeia alimentar, causando efeitos negativos no sucesso reprodutivo populacional. A acumulação de contaminantes nos organismos aquáticos depende de vários factores, mas principalmente das propriedades físico-químicas do xenobiótico, características do ecossistema e biologia do organismo “receptor” (Alloway & Ayres, 1993; James & Kleinow, 1994; Phillips & Rainbow, 1994; Clark, 1997; Kennish, 2001). Dois conceitos são comuns em termos de contaminação: biodisponibilidade e bioacumulação. A biodisponibilidade é definida como a proporção de contaminante existente no ecossistema que pode ser assimilada por um organismo; a bioacumulação é a capacidade do organismo para reter o contaminante em resposta a uma fracção existente no ambiente (Sadiq, 1992; Phillips, 1993; Landrum *et al.*, 1996).

É pois essencial identificar e compreender os impactos destes contaminantes e avaliar a resposta dos ambientes aquáticos à contaminação. Esta avaliação não pode, contudo, basear-se apenas em análises químicas de amostras ambientais (como água e sedimentos) que dão uma ideia da concentração dos mesmos mas não fornecem indicação dos efeitos prejudiciais causados no *biota*. É pois necessário medir os efeitos biológicos dos contaminantes nos organismos dos ecossistemas afectados (Bayne *et al.*, 1982; Phillips & Rainbow, 1994; Cajaraville *et al.*, 2000; Deudero *et al.*, 2009).

Os organismos aquáticos entram em contacto com os xenobióticos dissolvidos ou em suspensão na água, adsorvidos a matéria particulada nos sedimentos, ou através da alimentação, acumulando-os devido à grande afinidade destes compostos para se ligarem a inúmeras substâncias orgânicas. Incorporam-nos directamente através da superfície corporal, vias respiratórias, e epitélio digestivo, ou através da ingestão de alimento e/ou partículas, pelo que as concentrações de contaminantes acumuladas nos tecidos podem atingir algumas ordens de magnitude superior às existentes no ambiente (Manahan, 1992; James & Kleinow, 1994; Abel, 1996; Clark, 1997; Deudero *et al.*, 2009). Contudo, muitos organismos desenvolveram estratégias adaptativas para regular, imobilizar ou desintoxicar os contaminantes acumulados, pelo que a toxicidade destes elementos pode variar entre diferentes espécies (Phillips & Rainbow, 1994; Kennish, 2001). A concentração de um contaminante num organismo é o resultado do balanço entre a incorporação e a sua regulação (Deudero *et al.*, 2009).

A acumulação de compostos antropogénicos tóxicos nos organismos aquáticos é uma forma eficaz de avaliar a qualidade ambiental de um ecossistema, permitindo identificar a incidência de exposição e efeitos causados pelos xenobióticos, e actuando como alerta de stress ambiental (Cajaraville *et al.*, 2000; Deudero *et al.*, 2009). Aos organismos aquáticos que possuem a capacidade de acumular quantidades significativas de contaminantes nos seus tecidos em resposta às existentes no meio envolvente chamam-se bioindicadores. Um bom

bioindicador deverá expressar uma correlação simples entre a concentração do contaminante nos seus tecidos e a concentração média no ambiente (factor de bioconcentração, BCF – *Bioconcentration Factor*). Critérios fundamentais na escolha de uma espécie para bioindicadora incluem: facilidade de recolha, ampla distribuição geográfica, *habitat* relativamente sedentário, resistência e tolerância a grandes amplitudes do poluente sem sofrer impactos letais, tamanho adequado, tecido suficiente para análise, e importante do ponto de vista ecológico (Phillips & Rainbow, 1994; Langston *et al.*, 1998). Estes organismos indicadores podem ser utilizados para monitorizar a biodisponibilidade e bioacumulação dos xenobióticos em ecossistemas costeiros, medindo alterações bioquímicas, fisiológicas, genéticas e ecológicas, pois geralmente reflectem os níveis destes compostos no meio. Uma abordagem sistemática que utiliza organismos para avaliar contaminação ambiental, apoiando-se na detecção e quantificação de interacções bioquímicas entre um contaminante e a sua resposta biológica, chama-se de biomonitorização (Phillips & Segar, 1986; Phillips & Rainbow, 1994; Abel, 1996; Cajaraville *et al.*, 2000; Zorita *et al.*, 2008).

De entre os organismos adequados a estudos de biomonitorização em zonas costeiras e estuarinas, os peixes e moluscos (principalmente bivalves), são os mais utilizados como espécies bioindicadoras. Os invertebrados representam um grupo muito abundante com cerca de 95% das espécies animais e são importantes membros dos ecossistemas aquáticos. Neste contexto, os bivalves assumiram um papel determinante, uma vez que são organismos ubíquos mas sésseis, filtrando grandes quantidades de água para respiração e alimentação, extraíndo partículas orgânicas em suspensão do *habitat* onde vivem. Os mexilhões em particular, aliam a estas características factores de bioconcentração elevados para poluentes orgânicos e taxas metabólicas de desintoxicação relativamente baixas, tornando-se particularmente susceptíveis a compostos xenobióticos (Amiard *et al.*, 1986; Viarengo & Canesi, 1991; Hawkins & Bayne, 1992; Phillips & Rainbow, 1994; Langston *et al.*, 1998;

Bocchetti & Regoli, 2006; Gagné *et al.*, 2006; Canesi *et al.*, 2007; Ketata *et al.*, 2008). Dentro dos mexilhões, a espécie *Mytilus* cumpre os critérios fundamentais enquanto espécies bioindicadoras, fornecendo uma resposta integrada e temporal à exposição a contaminantes, tendo sido por isso amplamente utilizados para estudar e monitorizar ambientes costeiros a nível mundial (Amiard *et al.*, 1986; Viarengo & Canesi, 1991; Cajaraville *et al.*, 2000; Honkoop *et al.*, 2003; Bocchetti & Regoli, 2006; Zorita *et al.*, 2007; Deudero *et al.*, 2009).

A necessidade de detecção e avaliação antecipada dos impactos da contaminação no ambiente aquático levou ao desenvolvimento de métodos que fornecessem alertas precoces dos efeitos causados por um grande leque de contaminantes no *biota*. Estes métodos passam pela medição/avaliação de respostas biológicas dos organismos expostos e são conhecidos como biomarcadores (Phillips & Rainbow, 1994; Cajaraville *et al.*, 2000; Lam & Gray, 2003).

1.3. Biomarcadores

Um biomarcador é definido como uma medida quantitativa de alterações nas respostas biológicas ao nível molecular, celular, fisiológico ou comportamental, e que pode ser interpretada como resposta à exposição e/ou a doses de substâncias xenobióticas (Peakall, 1994; Cajaraville *et al.*, 2000; Lam & Gray, 2003; Bebianno *et al.*, 2004). Destas medidas, as que se processam ao nível molecular e celular são as que dão o primeiro sinal de perturbação, sendo muito sensíveis em relação a certos compostos tóxicos. Permitem uma identificação antecipada de efeitos adversos em níveis superiores de organização biológica, e podem ser utilizados preventivamente em avaliações de qualidade ambiental, de modo a iniciar estratégias de bio-remediação antes de danos irreversíveis (Cajaraville *et al.*, 2000; Bebianno *et al.*, 2004; Monserrat *et al.*, 2007; Viarengo *et al.*, 2007; Zorita *et al.*, 2007). Baseando-se no

princípio de que “os efeitos produzidos pelos contaminantes podem ser precocemente detectados a níveis inferiores de organização biológica”, os biomarcadores indicam se o organismo esteve exposto a contaminantes (biomarcadores de exposição) e/ou a magnitude de resposta do organismo ao composto e seus metabolitos (biomarcadores de efeito ou stress) (Schlenk, 1999; Cajaraville *et al.*, 2000; Bebianno *et al.*, 2004; Zorita *et al.*, 2007).

Os biomarcadores de exposição correspondem a alterações que indicam exposição a um agente específico, ainda que estas alterações possam não ser directamente ligadas a efeitos adversos/tóxicos no organismo alvo. O principal objectivo destes biomarcadores é estimar a dose interna ou biodisponibilidade de um xenobiótico num organismo, fornecendo estimativas quantitativas e qualitativas da exposição. Estes biomarcadores deverão ser respostas bem caracterizadas que levem em consideração a dinâmica biológica do organismo e as propriedades físico-químicas do agente. Por outro lado, os biomarcadores de efeito correspondem a alterações biológicas que ocorrem nos organismos, causadas por contaminantes, e elucidam os aspectos qualitativos da identificação do contaminante esclarecendo os mecanismos prováveis de acção. Este conceito baseia-se no facto dos efeitos serem tipicamente manifestados em níveis inferiores de organização biológica, antes de as perturbações serem percebidas ao nível da comunidade populacional. Podem, no entanto, ser medidos em qualquer ponto ao longo dos crescentes níveis organizacionais, desde o molecular ao ecossistema, variando bastante na sua especificidade (Schlenk, 1999; Lam & Gray, 2003).

Considerando a complexidade da mistura de contaminantes existentes nos ecossistemas aquáticos, as enzimas antioxidantes representam biomarcadores de interesse uma vez que a sua resposta não é específica para uma substância tóxica em particular (Doyotte *et al.*, 1997; Cossu *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2007; Monserrat *et al.*, 2007). Os sistemas de defesa antioxidante, presentes em todas as células aeróbias, neutralizam compostos químicos

reactivos produzidos por vias metabólicas endógenas e/ou metabolismo xenobiótico. Quando este sistema falha, podem ocorrer danos celulares, nomeadamente através da peroxidação lipídica (LPO – *Lipid Peroxidation*) das membranas, muito utilizada enquanto biomarcador de stress oxidativo uma vez que indica efeitos potencialmente prejudiciais, mediados pelo aumento da formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) (Cossu *et al.*, 2000; Bocchetti & Regoli, 2006; Viarengo *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009). A LPO está associada a perturbações oxidativas nos lípidos das membranas celulares, resultando em produtos de degradação lipídica e radicais livres, extremamente tóxicos para as células (Viarengo & Canesi, 1991; Bebianno *et al.*, 2004).

Observações que envolvam alterações num nível de organização mais complexo também têm sido utilizadas como biomarcadores de respostas a nível celular e tecidual. Alterações histopatológicas medidas em determinados tecidos de organismos expostos a xenobióticos tóxicos, ou medidas ecofisiológicas da condição dos indivíduos (crescimento, reprodução, etc.), representam biomarcadores intermédios sensíveis e permitem uma pertinente avaliação do estado e actividade fisiológica dos organismos (Pampanin *et al.*, 2005; Viarengo *et al.*, 2007; Ketata *et al.*, 2008).

A maioria dos xenobióticos acumulados pelos organismos são biotransformados em metabolitos antes de serem excretados. Sem esta biotransformação, a sua excreção seria lenta e acumular-se-iam no organismo em quantidades incomportáveis. Contudo, como alguns xenobióticos partilham vias metabólicas com substratos endógenos dos organismos, como as hormonas, tornam-se passíveis de interferir com o metabolismo normal e despoletar alterações endócrinas (Stegeman & Hahn, 1994; Cossu *et al.*, 2000).

1.4. Disrupção Endócrina

Entre os efeitos prejudiciais que a exposição a determinados compostos químicos naturais ou antropogénicos pode provocar, salienta-se a perturbação das funções “normais” do sistema endócrino nos animais e, em última instância, no Homem, o que tem representado uma das grandes preocupações da comunidade científica actual, particularmente a partir do final dos anos 80 (EPA, 1997; Depledge & Billinghamurst, 1999; Almeida *et al.*, 2007). A perigosidade que estes compostos representam a nível de sucesso reprodutivo populacional reflectiu-se na necessidade de criar legislação para minimizar os seus efeitos, como referido na Convenção OSPAR – Convenção Para a Protecção do Meio Marinho do Atlântico Nordeste, e através da listagem de substâncias prioritárias no domínio da política da água, pela Decisão nº 2455/2001/CE da Directiva-Quadro da Água (Anexo X).

Um disruptor endócrino (DE) pode ser definido como uma “substância exógena que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, acção ou eliminação de hormonas naturais, que são responsáveis pela manutenção da homeostasia, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento do organismo” (EPA, 1997; EC, 1999; EDMAR, 2002). Os DE interferem com o funcionamento do sistema endócrino em, pelo menos, três modos: mimetizando a acção de hormonas naturais, como o estrogénio ou testosterona, ligando-se aos seus receptores hormonais; bloqueando os receptores nas células alvo destas hormonas, impedindo a acção das hormonas naturais; ou alterando a síntese e função dos receptores hormonais e modificando a síntese, transporte, metabolismo e excreção das hormonas (Depledge & Billinghamurst, 1999; EC, 1999; EDMAR, 2002; Ropero *et al.*, 2006). A grande parte da informação acerca de mecanismos de acção de DE nos organismos marinhos é retirada de estudos em vertebrados, já que em invertebrados existe uma lacuna nos estudos científicos, parcialmente devida ao conhecimento limitado da sua endocrinologia (Lafont & Mathieu,

2007; Ketata *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009). A Figura 1 ilustra um diagrama da acção das hormonas nos organismos vertebrados, com as principais vias susceptíveis de disrupção endócrina. Nos moluscos, o sistema endócrino inclui apenas células neuro-secretoras e glândulas endócrinas (como nas gónadas), e enquanto em alguns grupos de moluscos muitas das neuro-hormonas actuam directamente nos tecidos alvo, noutros parece existir secreção de mensageiros químicos intermediários. As hormonas sexuais do tipo das dos vertebrados já foram descobertas nos moluscos e estão envolvidas no controlo da reprodução, mas um esquema completo da sua bio-síntese, transporte, receptores ligantes e conversão nos tecidos alvo ainda permanece por esclarecer. A principal questão não está na presença das hormonas nos moluscos, mas sim na sua origem endógena e envolvimento nos processos de regulação endócrina, tal como demonstrado nos vertebrados (Lafont & Mathieu, 2007; Ketata *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009).

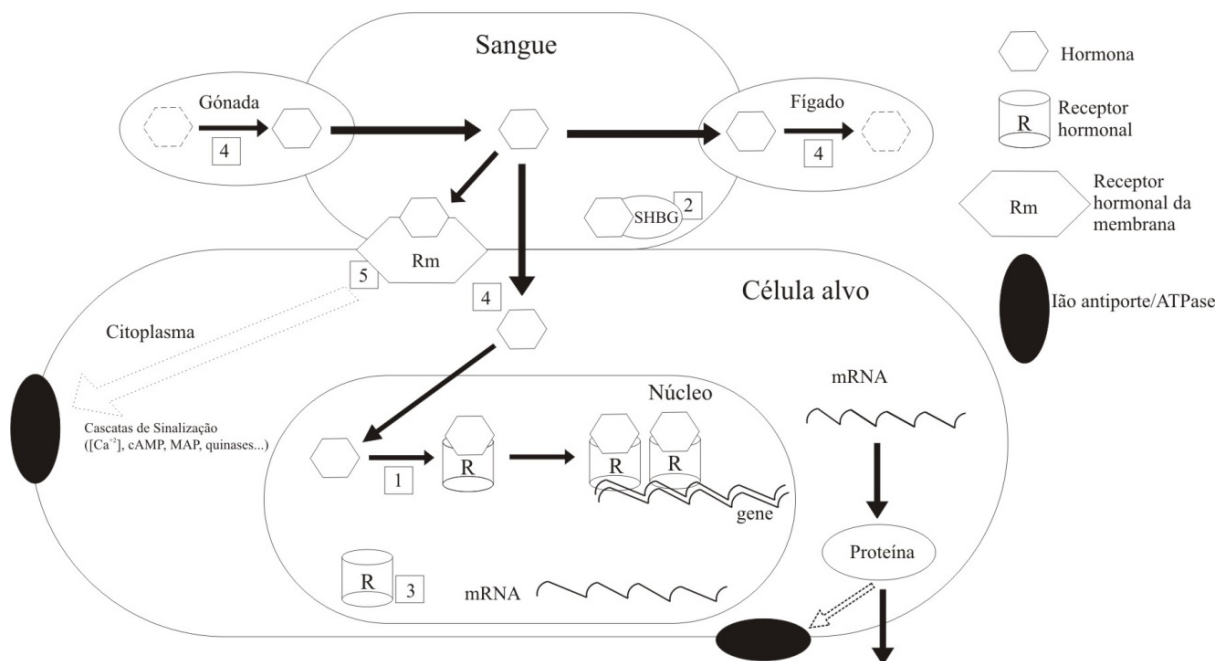


Figura 1 – Diagrama ilustrando vários modos de acção das hormonas nos organismos vertebrados, que podem ser sensíveis a disrupção endócrina: 1) ligação ao receptor hormonal; 2) ligação à globulina SHBG (*Sexual Hormone Binding Globulin*) ou alteração dos seus níveis; 3) alteração dos níveis dos receptores hormonais; 4) alteração da bio-síntese e vias metabólicas, quer na célula alvo, quer no fígado ou gónada; 5) interacção com a acção das hormonas. Adaptado de Falkenstein *et al.* (2000) e WHO (2002).

De entre os DE presentes nos ecossistemas aquáticos, os xenoestrogénios são os mais estudados, dada a sua capacidade para mimetizar ou interferir com a actividade normal dos estrogénios. A relativa baixa especificidade dos receptores de estrogénio facilita a sua ligação a estes compostos, que subsequentemente agem como factores de transcrição quando se ligam directamente ao ADN (Atkinson *et al.*, 2003; Ropero *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007; Pojana *et al.*, 2007; Matozzo *et al.*, 2008). O grupo de xenoestrogénios é estruturalmente diverso e está normalmente associado a águas residuais domésticas, incluindo: hormonas estrogénicas naturais (estradiol, estriol, estrona) e sintéticas (etinilestradiol, mestranol); compostos estrogénicos sintéticos associados a detergentes (nonilfenol, octilfenol); plastificantes (bisfenol A, ftalatos); metais (mercúrio, cádmio, chumbo), bem como fitoestrogénios; pesticidas (DDT, dieldrinas, atrazina) e bifenis policlorados (PCBs) (Colborn *et al.*, 1993; Sumpter, 1998; Depledge & Billingham, 1999; Morcillo & Porte, 2000; Gagné & Blaise, 2003; Sabik *et al.*, 2003; Pojana *et al.*, 2007; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009).

Entre as capacidades disruptivas mais singulares dos compostos xenoestrogénicos encontram-se efeitos a nível das populações, como o aumento da proporção de fêmeas, feminização de machos, e até animais em estados de *intersex* (condição em que o indivíduo possui oócitos ou espermatogónias dentro da gónada do género oposto) (Jobling *et al.*, 2003; Blaise *et al.*, 2003; Gagné & Blaise, 2003). Uma das respostas mais sensíveis aos efeitos destes compostos é a indução (pela ligação aos receptores de estrogénio) da expressão de vitelogenina (Vtg), uma fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas que fornecem reservas energéticas no desenvolvimento embrionário dos organismos ovíparos, as vitelinas (Vn) (Li *et al.*, 1998; Gagné *et al.*, 2001a,b, 2003; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009). As Vtgs têm características semelhantes nos vertebrados, onde estão sob o controlo da via metabólica do receptor de estrogénio, e nos invertebrados, onde são reguladas pela combinação de

estrogénios e neuropéptidos (Li *et al.*, 1998; Blaise *et al.*, 1999; Puinean *et al.*, 2006). Nos peixes, a Vtg é normalmente sintetizada no fígado de fêmeas sexualmente maduras, como resposta aos estrogénios em circulação, e transportada pela corrente sanguínea para os oócitos em desenvolvimento, onde é subsequentemente processada para constituir as proteínas do ovo (as Vn). Nos moluscos, a vitelogénese ocorre por processos heterossintéticos (em vesículas do tecido conjuntivo) ou autosintéticos (no próprio oócito), nas gónadas femininas, e as transformações metabólicas finais ocorrem no oócito (Blaise *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001a,b; Marin & Matozzo, 2004; Matozzo *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008). Os níveis de Vtgs aumentam nas fêmeas sexualmente maduras, sendo geralmente baixos em juvenis. Os machos, em condições “normais”, sintetizam Vtgs em níveis muito baixos, mesmo indetectáveis, mas têm o potencial de o fazer como consequência à exposição a xenoestrogénios (Li *et al.*, 1998; Blaise *et al.*, 1999; Riffeser & Hock, 2002; Marin & Matozzo, 2004; Matozzo *et al.*, 2008).

O processo da vitelogénese é susceptível de ser regulado por fontes exógenas de estrogénios, aumentando as concentrações de Vtg e Vn (proteínas do tipo-Vtg) nos organismos expostos. Em bivalves, níveis aumentados destas proteínas já foram documentados nas gónadas e hemolinfa de ambos machos e fêmeas de mexilhões, amêijoas e ostras expostas laboratorialmente e em meio natural a hormonas como o estradiol, compostos como o nonilfenol, e efluentes municipais (Li *et al.*, 1998; Blaise *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001a,b; Puinean *et al.*, 2006). Assim, estas proteínas têm sido amplamente utilizadas em estudos laboratoriais e de campo como biomarcador de disrupção endócrina na avaliação de efeitos estrogénicos em moluscos bivalves. Estes têm provado ser bioindicadores úteis para avaliar o potencial de exposição a xenoestrogénios (Blaise *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001a,b; Porte *et al.*, 2006; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009).

1.4.1. Biomarcadores de DE: proteínas do tipo vitelogenina

Vários procedimentos têm sido desenvolvidos para avaliar as concentrações de Vtg no fígado e plasma de peixes, bem como gónadas e hemolinfa de bivalves. Métodos directos baseados no uso de anticorpos específicos, como as técnicas ELISA (*enzyme-linked immunosorbent*), RIA (rádio-imunológica) ou análise *western-blot*, ou em ferramentas moleculares (hibridação do ADN), são geralmente reconhecidos como mais específicos e sensíveis que outros métodos. Contudo, são dispendiosos, morosos e requerem um elevado nível de especialização e desenvolvimento tecnológico (Gagné & Blaise, 1998; Blaise *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001a,b; Jobling *et al.*, 2003; Marin & Matozzo, 2004; Viarengo *et al.*, 2007). As técnicas imunológicas são tradicionalmente utilizadas em peixes, mas para invertebrados ainda não se encontram bem desenvolvidas pois existem poucos anticorpos específicos desenvolvidos para a Vtg de bivalves, e os que existem demonstram baixa reactividade entre espécies (Gagnaire *et al.*, 2009). Assim sendo, foram desenvolvidos procedimentos alternativos indirectos, baseados em análises de electroforese, ou em medições de proteínas, de níveis de cálcio ou de fosfatos alcalinos, como o método dos Fosfato Lábeis Alcalinos (ALP) (Li *et al.*, 1998; Blaise *et al.*, 1999; Jobling *et al.*, 2003; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009).

As proteínas do tipo-Vtg podem ser determinadas nos bivalves através de procedimentos indirectos que se baseiam nas suas propriedades, i.e., são proteínas que contém lípidos e fosfatos. O método do ALP baseia-se na determinação dos fosfatos lábeis libertados por estas fosfolipoproteínas após hidrólise com um composto alcalino, avaliando assim os níveis das proteínas do tipo-Vtg a partir das gónadas das fêmeas e machos. A medição destas proteínas através do método do ALP tem sido recentemente utilizada em ambos os grupos de bivalves e peixes, e provou ser altamente correlacionada com as técnicas imunológicas. Portanto, uma análise dos valores de ALP pode representar um bom biomarcador de resposta a compostos

xenoestrogénicos eficiente, rápido e menos dispendioso, apesar de não poder fornecer uma medida quantitativa directa das concentrações das proteínas vitelogénicas (Blaise *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001a,b, 2002a; Gagné *et al.*, 2004; Versonnen *et al.*, 2004; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Pampanin *et al.*, 2005; Puinean *et al.*, 2006; Viarengo *et al.*, 2007; Gagnaire *et al.*, 2009).

1.5. Objectivos

De forma a contribuir para a avaliação da presença de compostos com capacidade de disrupção endócrina na costa sul de Portugal, especificamente em áreas de portos, marinas e estuários (normalmente onde ocorrem descargas de águas residuais), identificados como possíveis *hotspots* de contaminação e associados à presença de xenobióticos com esta capacidade disruptiva, este trabalho teve como objectivo estudar a viabilidade da utilização de proteínas do tipo-Vtg como biomarcadores de exposição a xenoestrogénios em bivalves, determinadas através do método do ALP nas gónadas de fêmeas e machos de mexilhões *Mytilus galloprovincialis*. Esta espécie foi recolhida em oito locais ao longo da zona costeira algarvia, em zonas próximas de grandes centros urbanos, comparativamente com uma zona de influência antropogénica baixa. Como complemento na avaliação de alterações por exposição a disruptores endócrinos, utilizaram-se ainda análises histopatológicas e de condição fisiológica, bem como um biomarcador de dano, a LPO.

2. Material e Métodos

2.1. Espécie em Estudo

No presente estudo utilizou-se como material biológico espécimes de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (Fig. 2) recolhidos na zona costeira sul de Portugal.

Mytilus galloprovincialis (Lamark, 1819)

Família *Mytilidae*



Figura 2 – Imagem de um espécime de *Mytilus galloprovincialis* (adaptado de <http://elrinconmarinos-nogasteropodos.iespana.es/Mytilidae.htm>, acedido no dia 15/04/2009)

Os mitilídeos têm uma distribuição mundial subtropical. *M. galloprovincialis* vive em zonas rochosas, desde o nível intertidal até aos 40 m

de profundidade, e ocorre no Mar Mediterrâneo, ao longo do oceano Atlântico Ibérico, para norte pela costa francesa até ao Canal da Mancha e Ilhas Britânicas, e para sul até à cidade de Cansado na Mauritânia (Sanjuan *et al.*, 1996; Comesana *et al.*, 1998; Kopp *et al.*, 2005; FAO 2005-2009; Fuentes *et al.*, 2009).

Os mexilhões conseguem movimentar-se através do pé extensível, e têm uma glândula que segrega o bisso de filamentos, permitindo-lhe fixação ao substrato. São suspensívoros, possuindo brânquias compostas por um grande número de filamentos paralelos que filtram fitoplâncton e matéria particulada de que se alimentam. O manto segrega a concha, de cor azulada ou violácea, ligeiramente convexa, e contém os gâmetas femininos ou masculinos (FAO 2005-2009). Os sexos são separados, e a baixa incidência de hermafroditismo sugere que *M. galloprovincialis* é uma espécie gonocórica estável (Brouseau, 1983; Villalba, 1995; Cáceres-Martinez & Figueras, 1998). A época de desenvolvimento gametogénico pode ocorrer em qualquer altura do ano e existem diferenças no ciclo sexual entre populações de diferentes áreas geográficas, diferenças nas populações de cada área, bem como diferenças interanuais (Villalba, 1995). No entanto, tem sido descrito que na zona mais a sul da sua

distribuição, a época de desova parece decorrer de Novembro a Dezembro e de Março a Abril (Cáceres-Martinez & Figueras, 1998; Kopp *et al.*, 2005; FAO 2005-2009).

2.2. Amostragem e Locais em Estudo

A amostragem foi levada a cabo em quatro campanhas sazonais, divididas em dois períodos de Verão/Inverno nos dois anos consecutivos de 2005/2006 e 2007/2008, uma vez que o período estival na região está associado a um maior afluxo turístico e desta forma maior impacto antropogénico, comparativamente ao Inverno. As duas primeiras campanhas de amostragem, Verão de 2005 (mês de Agosto) e Inverno de 2006 (mês de Fevereiro), foram inseridas no âmbito do Projecto BIOHOTA, “Biomarcadores em bivalves de *hotspots* de contaminação da costa algarvia” (POCTI/CTA/48027-2002) financiado pela FCT. Nestas duas campanhas iniciais, os mexilhões foram recolhidos em oito locais ao longo da zona costeira sul de Portugal, no Algarve (Figura 3), em zonas próximas de grandes centros urbanos, especificamente em áreas de portos, marinas e estuários identificados como possíveis *hotspots* de contaminação. As amostragens foram efectuadas no porto piscatório de Sagres (37°00'588''N; 8°55'777''W); na marina de Lagos (37°06'461''N; 8°40'281''W); no porto dentro do estuário do Arade, em Portimão (37°08'087''N; 8°32'089''W); na marina de Vilamoura (37°04'406''N; 8°07'295''W); nos portos dentro do sistema lagunar da Ria Formosa: no cais comercial de Faro (37°00'166''N; 7°54'994''W), no porto de Olhão (37°01'367''N; 7°50'212''W) e no local de embarque em Tavira (37°06'995''N; 7°37'732''W); e na zona do molhe na foz do estuário do Guadiana, em Vila Real de Santo António (VRSA; 37°10'678''N; 7°24'508''W).

As outras duas campanhas de amostragem, Verão de 2007 (mês de Agosto) e Inverno de 2008 (mês de Fevereiro), foram levadas a cabo nos mesmos locais das anteriores, incluindo ainda uma nona estação de amostragem, a praia da Figueira (37°03'394''N; 8°50'21,6''W), situada entre Sagres e Lagos. Com esta nova estação pretendeu-se adicionar um local distanciado de zonas de portos e marinas, centros urbanos e/ou locais de maior impacto antropogénico, onde a influência da contaminação fosse menor, podendo funcionar como local de referência.

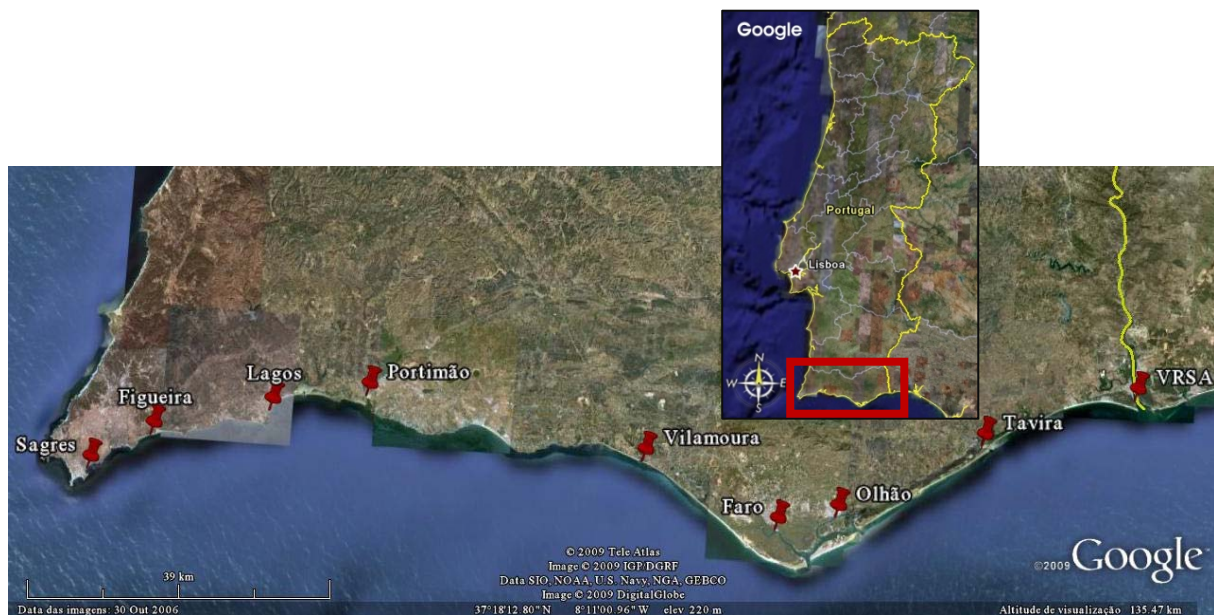


Figura 3 – Locais de amostragem na costa sul de Portugal: Sagres, praia da Figueira, Lagos, Portimão, Vilamoura, Faro, Olhão, Tavira e VRSA (adaptado de Google Earth, 2009).

Por fim, para a estação de VRSA, realizaram-se ainda duas campanhas suplementares, no Outono de 2006 e na Primavera de 2007, com o intuito de analisar sazonalmente este local de forma mais detalhada, uma vez que alguns estudos apontam para o estuário do Guadiana como tendo níveis relativamente elevados de pesticidas, metais e outros contaminantes, podendo mesmo considerar-se um *hotspot* de disrupção endócrina na costa sul de Portugal (Almeida *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, *in press*).

Foram recolhidos 40 espécimes de *M. galloprovincialis* por local de amostragem (9 locais, $n=1360$, tamanho médio= $58,2\pm 7,4$ mm), ao longo das quatro campanhas sazonais, em 3 dias

consecutivos, garantindo assim que não houvesse alteração do estado de maturação entre os indivíduos. A temperatura e a salinidade foram medidas *in situ* com uma sonda multiparamétrica, YSI 6600.

Após transporte para o laboratório em arcas térmicas, os mexilhões vivos foram cuidadosamente lavados para remover sujidade e detritos. De seguida, os seus tecidos foram dissecados, separados e armazenados consoante a análise bioquímica pretendida.

Para a avaliação do estado fisiológico, pela determinação do Índice de Condição (IC), e para o estudo da histologia das gónadas, utilizou-se o total da parte edível dos indivíduos. Separaram-se ainda as gónadas para a determinação das proteínas do tipo vitelogenina, pelo método dos Fosfatos Lábeis Alcalinos (ALP), e as brânquias, para a avaliação do stress oxidativo, pela determinação da Peroxidação Lipídica (LPO), tendo-se congelado imediatamente estes tecidos em azoto líquido e armazenados a -80°C.

2.3. Análises Biológicas

2.3.1. Índice de Condição (IC)

O Índice de condição expressa o estado fisiológico do organismo. Dissecaram-se 15 indivíduos por cada local, em cada campanha de amostragem, num total de 510 mexilhões (tamanho médio $54,6 \pm 5,0$ mm) e o IC, expresso em percentagem, foi calculado como a razão entre o peso seco da parte edível e o peso seco da concha (Walne, 1976; Moschino & Marin, 2006).

O peso seco quer da parte edível, quer da concha, foi determinado após secagem dos mesmos durante 48 horas numa estufa a 70°C.

2.3.2. Fosfatos Lábeis Alcalinos (ALP)

O método dos Fosfatos Lábeis Alcalinos (ALP, do inglês *Alkali-Labile Phosphates*) segundo Gagné & Blaise, 1998, Blaise *et al.*, 1999, 2003, Gagné *et al.*, 2003, determina as propriedades vitelogénicas do tecido em análise, quantificando indirectamente os níveis de proteínas do tipo vitelogeninas (tipo-Vtg). Este método baseia-se na determinação dos fosfatos inorgânicos lábeis, libertados pelas lipofosfoproteínas do tipo-vtg após hidrólise com compostos alcalinos (Blaise *et al.*, 1999, 2002; Gagné *et al.*, 2001a,b, 2003), e já foi significativamente correlacionado com outras técnicas quantificação de vitelogeninas (baseadas no uso de anticorpos específicos – imunológicas, ELISA, *western-blot* – ou em ferramentas moleculares) (Gagné & Blaise, 1998; Blaise *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001a,b). O método analítico adoptado foi o colorimétrico do fosfo-molibdénio, segundo Stanton, 1968, e proposto por Gagné & Blaise, 1998, e Blaise *et al.*, 1999.

O procedimento foi levado a cabo analisando as gónadas de 15 indivíduos por local (num total de 510 mexilhões nas quatro campanhas de amostragem, tamanho médio=61,5±5,9mm), numa tentativa de se analisar um número semelhante de fêmeas e machos. As concentrações de ALP foram determinadas neste tecido uma vez que a síntese de Vtg ocorre nas células foliculares das gónadas dos bivalves. Depois de dissecados, os indivíduos foram separados por sexos recorrendo à cor da gónada para distinguir fêmeas (cor-de-laranja forte) de machos (amarelo esbranquiçado), ou efectuando um esfregaço de uma pequena porção da gónada numa lâmina, para confirmação por observação microscópica (Axiovert S100, Zeiss, ampliação de 100x).

A técnica do ALP foi efectuada na totalidade das gónadas dos indivíduos amostrados, previamente descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 4°C (homogeneizador IKA, modelo Ultra-Turrax T-25) num volume de solução tampão HEPES (25 mM HEPES–NaOH, pH 7.4,

contendo 125 mM NaCl, 1 mM Ditioneitol e 1 mM EDTA) 5 vezes superior ao peso da amostra. O homogeneizado foi centrifugado (centrífuga Beckman J2-21) a 12 000 g durante 30 minutos a 2°C, e o sobrenadante foi cuidadosamente removido, guardando-se uma alíquota para determinação das proteínas totais. Uma sub-amostra de 200 µl foi ajustada a 35% com acetona e centrifugada (microcentrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R) a 10 000 g durante 5 minutos a 2°C. O pellet obtido foi dissolvido em 200 µl de 1 M NaOH e aquecido a 60°C durante 30 minutos. Os níveis de fosfatos inorgânicos foram determinados usando o método fosfo-molibdênio: a 75 µl de amostra, adicionaram-se 125 µl de ácido tricloroacético (6,1 N), 630 µl de água bi-destilada, 170 µl de reagente de molibdato e 50 µl de Fiske-SubbaRow redutor. Incubaram-se as amostras a temperatura ambiente durante 10 minutos e leu-se a absorvância num espectrofotômetro (Jasco V-650) a 660 nm. As leituras obtidas foram convertidas em concentração de fosfatos ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) usando uma recta de calibração construída com as absorvâncias de soluções padrão, cujas concentrações em fosfatos inorgânicos (KH_2PO_4) eram conhecidas. A concentração de fosfatos em cada amostra foi normalizada com a quantidade total de proteínas, determinada pelo método de Bradford (1976), e expressa em microgramas de fosfatos [PO_4] por miligrama de proteína total ($\mu\text{gPO}_4\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$).

2.3.2.1. Determinação de Proteínas Totais pelo Método de Bradford, 1976

A quantidade total de proteínas de cada amostra foi determinada a partir das alíquotas guardadas de sobrenadante, após a primeira centrifugação das amostras homogeneizadas. As amostras foram diluídas (1/500) em água bi-destilada, ao que se adicionou Reagente de Bradford (Bio-Rad) também diluído (1/4), numa proporção reagente/amostra de 3:1, e leram-se as absorvâncias das amostras num espectrofotômetro (Jasco V-650) a 595 nm. As leituras obtidas foram convertidas em concentração de proteínas usando uma recta de calibração construída com as absorvâncias de soluções padrão de BSA (*Bovine Serum Albumin*), cujas

concentrações eram conhecidas. A concentração de proteínas foi expressa em miligrama de proteína total por grama de tecido ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.3.3. Histopatologia das Gónadas

A análise histopatológica foi levada a cabo analisando as gónadas de 5 indivíduos por local, nas quatro campanhas de amostragem, num total de 170 mexilhões (tamanho médio $54,8\pm 5,8\text{mm}$). Após dissecação, a parte edível de cada indivíduo foi fixada num volume de solução de *Bouin* (Ácido Pícrico, Formol e Ácido Acético) 5 vezes superior ao volume da amostra durante 48 horas, e armazenada em etanol a 70% até subsequente análise. Posteriormente, seleccionou-se a porção de tecido correspondente às gónadas do espécimen, e procedeu-se à sua desidratação e impregnação num processador de tecidos: foram imersos em banhos sucessivos de álcoois mais concentrados (desde etanol 70% até absoluto), butanol, e terminando em parafina. Numa consola de parafina fez-se a inclusão dos tecidos em blocos, a partir dos quais se seccionaram num micrótopo cortes histológicos com $5\mu\text{m}$ de espessura, que se colocaram em lâminas de vidro. Seguidamente, procedeu-se à sua desparafinação em banhos de butanol e re-hidratação em banhos sucessivos de álcool menos concentrado (desde etanol absoluto até 50%), terminando em água destilada. Por fim, coraram-se as amostras através da coloração Hematoxilina – Eosina imergindo-as em banhos consecutivos de solução de Hematoxilina de Harris (solução de Hematoxilina, Etanol 95%, Alúmen de Ferro, Ácido Sulfúrico), solução de Eosina (1 g por 100 ml), etanol absoluto e por fim butanol. Depois da coloração, os cortes foram cobertos com lamelas em meio de montagem com uma resina sintética (DPX). As amostras histológicas assim coradas foram observadas num microscópio óptico de inversão (Axiovert S100, Zeiss, ampliação de 100x) e a escala foi obtida a partir da calibração entre uma ocular e uma lâmina com escalas micrométricas.

Observaram-se possíveis alterações nos tecidos das gónadas e o estágio de maturação dos mexilhões, utilizando para o efeito a escala de maturação segundo Villalba (1995):

- estádio 0 – descanso (regeneração rápida do tecido de reserva; ausência de gâmetas);
- estádio I – multiplicação da gónia (gametogénese inicial; folículos pequenos e gónias em grande número);
- estádio II – progressão da gametogénese (desenvolvimento activo, mas ainda sem gâmetas maduros);
- estádio IIIA – maturação da gónada (folículos grandes, tecido conjuntivo inexistente; células em vitelogénese nos folículos femininos; nos folículos masculinos, camada mais fina de células germinativas e espermatócitos, e grande número de espermatídeos e espermatozóides);
- estádio IIIB – libertação dos gâmetas (fase de esvaziamento dos folículos com eliminação dos gâmetas; alguns gâmetas residuais podem permanecer);
- estádio IIIC – restauro (os espaços inter-foliculares começam a ser preenchidos pelo tecido conjuntivo);
- estádio IIID – reabsorção (todo a gónada é constituída por células do tecido conjuntivo; grande degradação das estruturas foliculares acompanhadas por hemócitos).

2.3.4. Peroxidação Lipídica (LPO)

O método da Peroxidação Lipídica (LPO, do inglês *Lipid Peroxidation*) segundo Erdelmeier *et al.*, 1998, Gérard-Monnier *et al.*, 1998, determina as concentrações de malonedialdeído (MDA) e 4-hidroxiaceno (4-HNE), usados como marcadores de dano pela oxidação da membrana fosfolipídica, uma vez que são compostos tóxicos gerados pela degradação de

peróxidos de ácidos gordos polinsaturados. Este método baseia-se no princípio da reacção de 2 moles de *N*-metil-2-fenilindol (reagente cromogénico) com 1 mole de MDA ou 4-HNE, obtendo-se um cromóforo estável com um máximo de absorvância a 586 nm. Estes compostos são então estimados através de Espectrofotometria, usando malonedialdeído-bis (tetrametoxipropano) como solução padrão.

O procedimento foi efectuado analisando as brânquias de 5 indivíduos por local (num total de 170 mexilhões nas quatro campanhas, tamanho médio=61,8±6,5mm) e a LPO foi determinada neste tecido uma vez que as brânquias são uma importante via de entrada, bioconcentração e excreção de compostos, tornando-se um tecido alvo para contaminantes devido à ampla área de contacto e reduzida distância entre o meio interno e externo. As amostras foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas (homogeneizador IKA, modelo Ultra-Turrax T-25) num volume de solução tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,6) 3 vezes superior ao peso da amostra (mas nunca superior a 5 ml de tampão), juntamente com BHT (hidroxitolueno butilado; 10 µl por cada 1 ml de Tris-HCl), num banho de gelo durante 2 minutos. Seguidamente, 3 ml do homogenato obtido foram centrifugados (centrífuga Beckman J2-21) a 30 000 g a 4 °C durante 45 minutos e o sobrenadante (fracção citosólica) foi cuidadosamente separado, guardando-se uma alíquota para determinação das proteínas totais. À sub-amostra de 200 µl adicionaram-se 650 µl de *N*-metil-2-fenilindol (10,32 mM, diluído em 50 ml de acetonitrilo e 6 ml de metanol) e 150 µl de 15,4M ácido metanossulfónico. Após incubação a 45°C durante 60 minutos, leram-se as absorvâncias num espectrofotómetro (Jasco V-650) a 586nm. As leituras obtidas foram convertidas em concentração de MDA e 4-HNE usando uma recta de calibração construída com as absorvâncias de soluções padrão, cujas concentrações de malonedialdeído-bis (tetrametoxipropano) eram conhecidas. A concentração de MDA e 4-HNE em cada amostra foi normalizada com a quantidade total de proteínas, pelo

método de Lowry (1951), e expressa em micromoles de MDA e 4-HNE por grama de proteína total ($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$).

2.3.4.1. Determinação das Proteínas Totais pelo Método de Lowry, 1951

A quantidade total de proteínas de cada amostra foi efectuada a partir de alíquotas guardadas de sobrenadante. Prepararam-se as soluções A (Carbonato de Sódio Anidro [Na_2CO_3] a 2% e 2,5 mM Hidróxido de Sódio [NaOH]), B₁ (20 mM Sulfato de Cobre pentahidratado [$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]), B₂ (35 mM Tartarato de sódio/potássio tetra hidratado [$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]) e C (100 ml sol. A + 2 ml sol. B₁ + 2 ml sol. B₂) e diluíram-se as amostras (1/30) em água bi-distilada. Adicionaram-se 2,5 ml de solução C a 0,5 ml de amostra, incubou-se durante 10 minutos e juntou-se 0,25 ml de reagente de Folin-Ciocalteu, diluído num volume igual de água bi-distilada; incubou-se novamente durante 1 hora e 30 minutos. Leram-se as absorvâncias das amostras num espectrofotómetro (Jasco V-650) a 750nm. As leituras obtidas foram convertidas em concentração de proteínas através de uma recta de calibração construída com as absorvâncias de soluções padrão de albumina (BSA – *Bovine Serum Albumin*) cujas concentrações eram conhecidas. A concentração de proteínas foi expressa em miligramas de proteína total por grama de tecido (mg.g^{-1}).

2.4. Análise Estatística

Para determinar a significância de diferenças relativas a vários parâmetros que se pretendiam testar, foram aplicados testes estatísticos recorrendo a duas metodologias: testes paramétricos e testes não paramétricos. Um teste de hipóteses paramétrico exige a verificação

de duas condições: a variável dependente tem de possuir distribuição normal, e as variâncias populacionais, estimadas a partir das amostras, têm de ser homogéneas (Maroco, 2003).

As análises estatísticas foram levadas a cabo no programa SigmaStat, versão 3.5 (Systat Software, CA, USA), em que as condições para a aplicabilidade dos testes paramétricos foram testadas recorrendo-se ao teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar a normalidade da distribuição da variável sob estudo, e ao teste de Levene, para testar a homogeneidade das variâncias ($\alpha = 0,05$). Assim, consoante os dados obtidos satisfizeram ou não estes pressupostos, aplicaram-se testes paramétricos ou testes não paramétricos.

No tratamento estatístico dos dados pretendeu-se testar a existência de diferenças no IC e nas concentrações de ALP e LPO determinados nos tecidos dos mexilhões entre sexos, locais e períodos de amostragem. Quando se verificaram as condições de aplicação dos testes paramétricos, utilizou-se a análise de variância, ANOVA, seguida do teste de Tukey quando se observaram diferenças significativas. Quando os pressupostos dos testes paramétricos não foram cumpridos, utilizou-se a alternativa não paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's para discriminar as diferenças. As diferenças significativas foram estabelecidas para um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Recorreu-se também ao programa Statistica para uma análise global dos dados, de modo a testar diferenças entre sexos, diferenças espaciais e sazonais/temporais. Assim, realizou-se o teste Anova/Manova de três entradas, considerando sexo, local e campanha, utilizando o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) como teste ad-hoc.

Efectuou-se ainda análises de correlação, recorrendo ao coeficiente de Pearson, para testar o grau de associação entre: (1) as concentrações de ALP nas fêmeas e nos machos, (2) as concentrações de ALP e o IC, (3) as concentrações de ALP e LPO, (4) as concentrações de LPO e o IC, para perceber em que medida estes factores poderiam variar conjuntamente ($\alpha = 0,05$). Como alternativa não paramétrica, utilizou-se o coeficiente de Spearman. O coeficiente

de correlação varia entre -1 e +1: se for significativamente positivo, as variáveis variam no sentido directo, quando é negativo, variam inversamente (Maroco, 2003).

Para estudar padrões gerais de distribuição espacial e sazonal das concentrações de ALP determinadas nos indivíduos de *M. galloprovincialis*, efectuou-se uma análise de componentes principais (PCA), recorrendo ao programa Canoco (Ter Braak, 1995). Aplicaram-se ainda uma análise de correspondência canónica (CCA) e uma PCA ao conjunto de resultados de concentrações de ALP e LPO, e valores de IC, sobrepondo uma segunda matriz de parâmetros ambientais (Temperatura e Salinidade) no caso da CCA. Por fim, recorrendo a dados de concentrações de contaminantes como os metais Zinco (Zn), Níquel (Ni), Cádmio (Cd) e Chumbo (Pb), e os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs), no Verão de 2005, determinados no âmbito do Projecto BIHOTA, testou-se também uma CCA para procurar estabelecer a influência destes contaminantes nas concentrações de ALP e LPO determinadas, nos diferentes locais e períodos de amostragem.

3. Resultados

3.1. Parâmetros Abióticos

Os valores referentes à temperatura e salinidade, registadas nos nove locais de amostragem ao longo da costa sul de Portugal, nas quatro campanhas de amostragem compostas por dois Verões (2005 e 2007) e dois Invernos (2006/2008), estão representados na Figura 4.

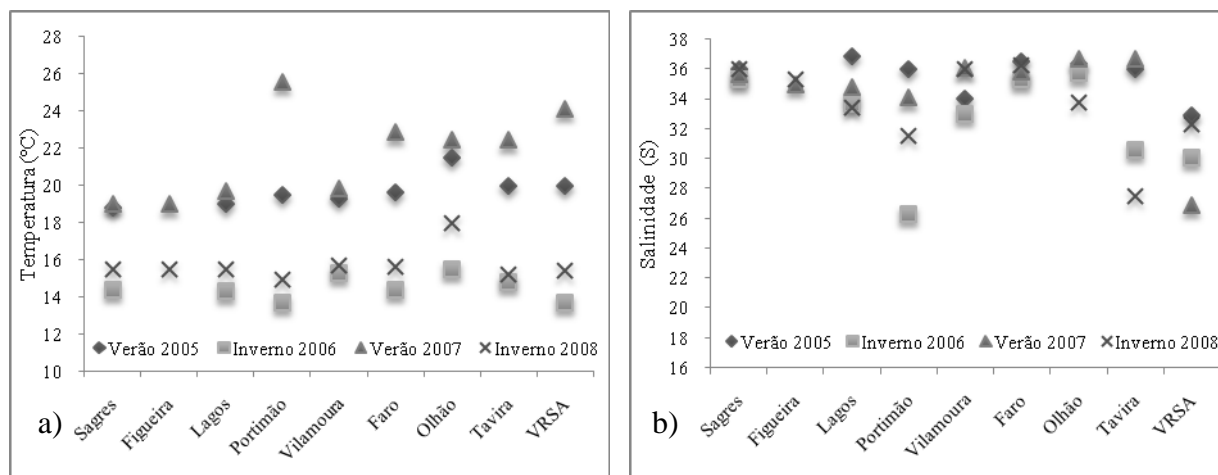


Figura 4 – Temperatura (a) e Salinidade (b) medidas em cada um dos nove locais de amostragem, ao longo da costa sul de Portugal, nas quatro campanhas de Verão/Inverno (2005/2007 e 2007/2008).

A temperatura, como seria de esperar, foi mais elevada durante as campanhas de Verão do que as de Inverno, observando-se ainda uma tendência para valores mais elevados nas campanhas de 2007/2008 relativamente às de 2005/2006. De Verão, a temperatura mais elevada foi registada em 2007, em Portimão (25,5°C), e a mais baixa em 2005, em Sagres (18,8°C). No Inverno, a temperatura foi mais elevada em Olhão (18,0°C) de 2008, e mais baixa em Portimão de 2006 (13,7°C). Para a salinidade verificou-se também a mesma tendência de valores mais elevados no Verão do que no Inverno. No Verão a salinidade foi mais elevada em Lagos (36,9S em 2005), e mais baixa em VRSA (26,9S em 2007). No Inverno, a salinidade foi mais elevada em Olhão (35,7S em 2006) enquanto os locais estuarinos, como Portimão, Tavira e VRSA apresentaram a salinidade mais baixa, devido a uma maior influência de água doce neste período do ano, também associado à precipitação.

3.2. Índice de Condição

O Índice de Condição (IC) determinado nos indivíduos recolhidos nos nove locais de amostragem, nas quatro campanhas de Verão/Inverno, está representado na Figura 5.

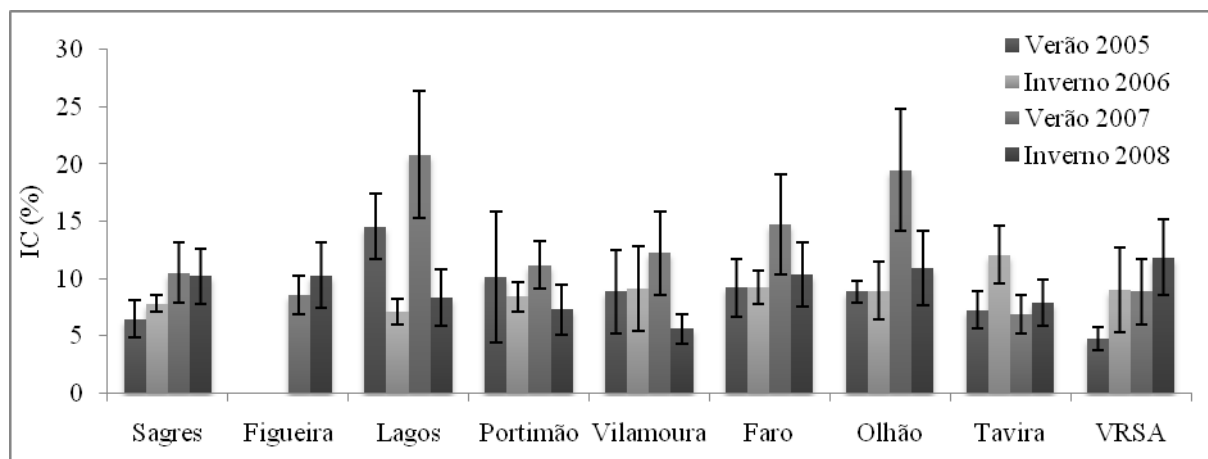


Figura 5 – Índices de Condição dos indivíduos *M. galloprovincialis* amostrados nos nove locais, ao longo da costa sul de Portugal, nas quatro campanhas de Verão/Inverno (2005/2007 e 2007/2008).

Os mexilhões *M. galloprovincialis* amostrados no Verão de 2007 exibiram os valores de IC mais elevados das quatro campanhas, exceptuando em Figueira e VRSA, onde o IC foi mais elevado no Inverno de 2008, e em Tavira, onde foi maior no Verão de 2006.

O IC mais elevado foi encontrado nos mexilhões amostrados em Lagos ($20,9 \pm 5,5\%$) e Olhão ($19,5 \pm 5,3\%$) no Verão de 2007, apresentando-se significativamente mais elevado ($p < 0,05$) que os restantes locais, no mesmo ano. Os indivíduos de VRSA recolhidos no Verão de 2005 registaram os valores de IC mais baixos ($4,8 \pm 1,1\%$), tendo sido significativamente inferiores aos restantes locais do mesmo ano ($p < 0,05$). No entanto, no Inverno de 2008 apresentaram o IC mais elevado, juntamente com os mexilhões de Sagres, Figueira, Faro, e Olhão ($p < 0,05$).

De um modo geral, os mexilhões recolhidos nos períodos de Verão tenderam a apresentar valores de IC mais elevados, mas esta sazonalidade só foi significativa para Lagos ($p < 0,05$), local onde se constatou a maior amplitude de variação entre Verão e Inverno. Nos restantes locais, os mexilhões apresentaram o IC com flutuações mais baixas.

3.3. Concentração de proteínas do tipo vitelogenina – ALP

De seguida apresentam-se as concentrações de ALP (Figura 6), determinadas nas gónadas dos indivíduos *M. galloprovincialis* recolhidos nos nove locais de amostragem, nas quatro campanhas de Verão/Inverno.

No Verão de 2005 (Fig. 6-a), a primeira campanha, os indivíduos do sexo feminino apresentaram as maiores concentrações de ALP em Sagres ($88,4 \pm 12,9 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), valores significativamente mais elevados dos encontrados nos indivíduos de Tavira ($41,1 \pm 12,2 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e Lagos ($49,9 \pm 5,9 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) ($p < 0,05$). Para os indivíduos do sexo masculino, as concentrações foram significativamente mais elevadas nos espécimes de Faro ($70,7 \pm 8,8 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), Sagres ($68,7 \pm 8,2 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e Vilamoura ($61,2 \pm 14,3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), e mais baixas em Tavira ($31,4 \pm 7,2 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) ($p < 0,05$).

Os mexilhões de ambos os sexos apresentaram concentrações de ALP mais elevadas em Sagres e menores em Tavira. Apenas em Olhão se pode verificar que as fêmeas apresentaram valores significativamente maiores que os machos ($p < 0,05$), ao contrário dos indivíduos dos restantes locais. É de salientar que tanto em Faro como em Vilamoura, os valores médios entre machos e fêmeas foram praticamente iguais.

No Inverno seguinte (2006; Fig. 6-b), as concentrações foram mais elevadas ($p < 0,05$) para as fêmeas, em Olhão ($87,1 \pm 14,9 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e Portimão ($84,3 \pm 11,2 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), e para os machos, também em Portimão ($91,4 \pm 22,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Lagos foi o local onde se observaram as concentrações significativamente mais baixas para ambos os sexos (fêmeas $47,4 \pm 2,8$ e machos $32,3 \pm 4,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) ($p < 0,05$).

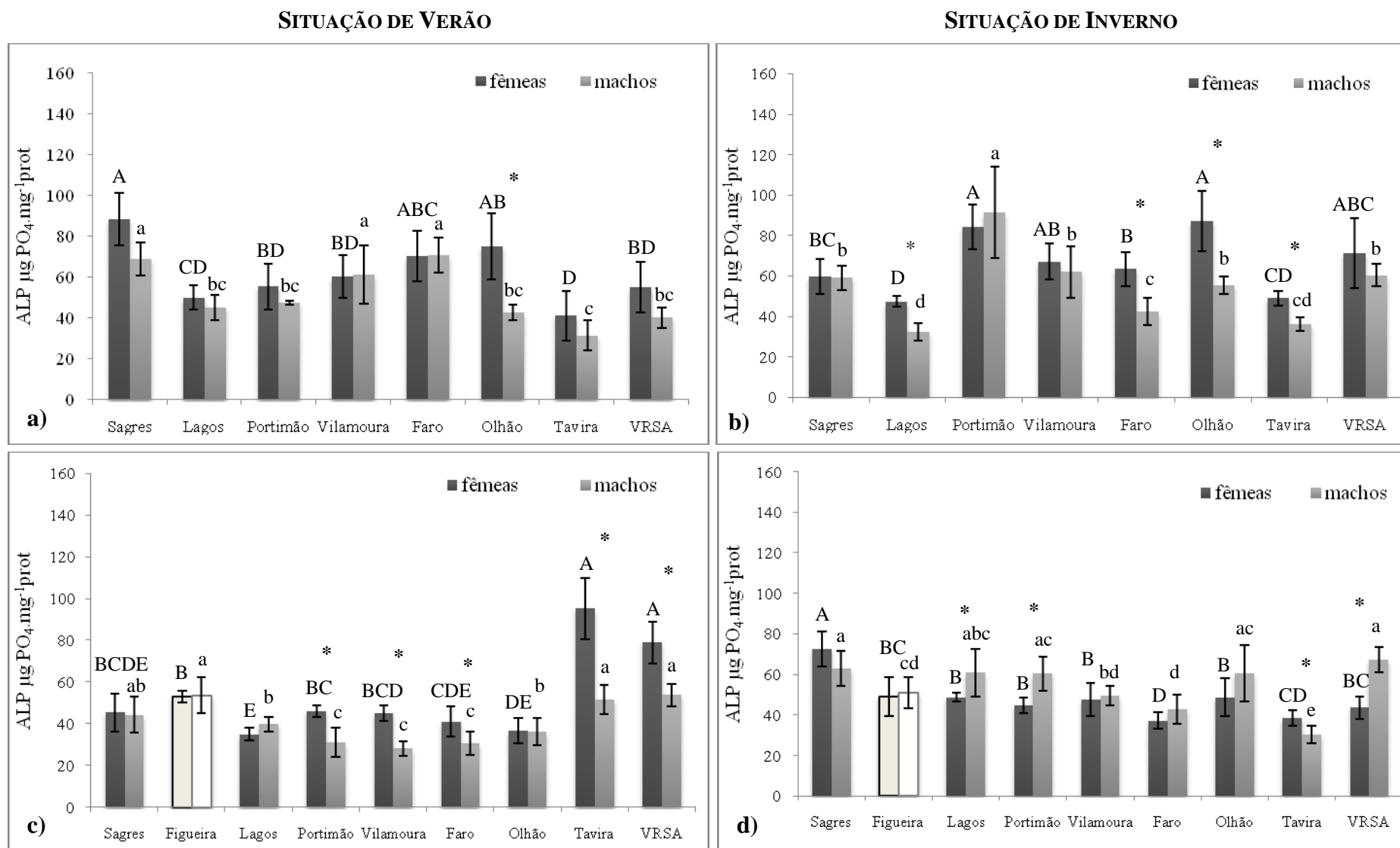


Figura 6 – Concentração de ALP determinada nas gónadas de *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da costa sul de Portugal, nas campanhas de a) Verão de 2005, b) Inverno de 2006, c) Verão de 2007 e d) Inverno de 2008. As letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre locais para o sexo feminino, e as minúsculas para o sexo masculino ($p < 0,05$). O asterisco representa diferenças significativas entre sexos ($p < 0,05$).

De um modo geral, Portimão, Vilamoura, Olhão e VRSA foram os locais onde se verificaram as maiores concentrações de ALP nos indivíduos amostrados, e em Lagos e Tavira, as menores concentrações. As fêmeas apresentaram valores de ALP mais elevados que os machos em Lagos, Faro, Olhão e Tavira ($p < 0,05$), enquanto nos restantes locais os valores foram semelhantes para ambos os sexos.

Na campanha seguinte, Verão de 2007 (Fig. 6-c), os mexilhões dos dois sexos apresentaram concentrações de ALP mais elevadas em Tavira (fêmeas $95,2 \pm 14,8$ e machos $51,7 \pm 7,1 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e VRSA (fêmeas $78,9 \pm 10,0$ e machos $53,8 \pm 5,2 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) ($p < 0,05$). As concentrações mais baixas foram encontradas, para as fêmeas, em Lagos ($35,0 \pm 2,9 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), e para os machos, em Vilamoura ($28,1 \pm 3,3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e Portimão ($30,9 \pm 7,0 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) ($p < 0,05$).

Ambos os sexos exibiram concentrações maiores nos mesmos locais de amostragem, isto é, em Tavira e VRSA, o que não se verificou para as concentrações mais baixas. Em Portimão, Vilamoura, Faro, Tavira e VRSA as fêmeas apresentaram valores significativamente superiores aos machos ($p < 0,05$), enquanto em Sagres, Figueira, Lagos e Olhão, os valores de ALP foram semelhantes para os dois sexos ($p > 0,05$).

No Inverno de 2008 (Fig. 6-d), a última campanha, as concentrações de ALP mais elevadas obtiveram-se em Sagres para as fêmeas ($72,4 \pm 8,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e machos ($62,8 \pm 8,5 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), e em VRSA para os machos ($67,2 \pm 6,1 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) ($p < 0,05$). As concentrações mais baixas obtiveram-se para ambos sexos em Faro (fêmeas $37,3 \pm 4,0$ e machos $42,7 \pm 7,1 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) e em Tavira (fêmeas $38,6 \pm 3,7$ e machos $30,5 \pm 4,3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) ($p < 0,05$).

Resumindo, para ambos os sexos, as concentrações de ALP mais elevadas foram observadas nos mexilhões de Sagres, e as mais baixas nos de Faro e Tavira. Em Tavira, as fêmeas apresentaram valores de ALP significativamente mais elevados que os machos ($p < 0,05$), e o oposto verificou-se nos indivíduos de Lagos, Portimão e VRSA, onde os machos apresentaram concentrações superiores às fêmeas ($p < 0,05$). Nos restantes locais, os valores foram semelhantes para ambos os sexos.

A Tabela I compila os locais onde foram determinadas as maiores e as menores concentrações de ALP em ambos os sexos dos indivíduos *M. galloprovincialis*, nas quatro campanhas.

Tabela I – Locais onde os indivíduos de *M. galloprovincialis* apresentaram os valores absolutos (máximos e mínimos) de concentração de ALP, nas quatro campanhas.

[ALP] ($\mu\text{gPO}_4\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$)		Verão 2005	Inverno 2006	Verão 2007	Inverno 2008
Máximo	Fêmeas	Sagres (88,4 \pm 12,9)	Olhão (87,1 \pm 14,9)	Tavira (95,2 \pm 14,8)	Sagres (72,4 \pm 8,5)
	Machos	Faro (70,7 \pm 8,7)	Portimão (91,4 \pm 22,5)	VRSA (53,8 \pm 5,2)	VRSA (67,2 \pm 6,1)
Mínimo	Fêmeas	Tavira (41,1 \pm 12,2)	Lagos (47,4 \pm 2,8)	Lagos (35,0 \pm 2,9)	Faro (37,3 \pm 4,0)
	Machos	Tavira (31,4 \pm 7,2)	Lagos (32,3 \pm 4,5)	Vilamoura (28,1 \pm 3,3)	Tavira (30,5 \pm 4,3)

Como se pode observar, os máximos para as fêmeas foram relativamente semelhantes entre si, havendo uma maior variação nos máximos para os machos. O contrário foi observado em relação aos mínimos, em que a variação para os machos é menor do que para as fêmeas.

Os valores extremos foram encontrados para mexilhões do Verão de 2007, com a concentração de ALP máxima nas fêmeas de Tavira (95,2 \pm 14,8 $\mu\text{gPO}_4\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$), e a mínima nos machos de Vilamoura (28,2 \pm 3,3 $\mu\text{gPO}_4\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$).

Numa análise global dos dados para as 4 campanhas, para se estudar a variação entre sexos, espacial e sazonal/temporal, recorreu-se ao teste estatístico MANOVA com três entradas, considerando sexo, local e campanha. Verificou-se que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) de concentrações de ALP entre sexos, e que as fêmeas apresentaram valores de ALP significativamente mais elevados do que os machos ($p < 0,05$). No entanto, quando se analisam os locais separadamente por campanha, é de salientar situações em que as concentrações de ALP foram semelhantes entre os dois sexos, tendo-se mesmo verificado casos em que os machos apresentaram valores superiores aos das fêmeas, como na campanha do Inverno de 2008 em Lagos, Portimão e VRSA ($p < 0,05$).

Entre as quatro campanhas, analisando os valores independentemente do sexo e/ou do local, o Inverno de 2006 foi onde se observaram as concentrações significativamente mais elevadas de ALP, principalmente por influência das médias observadas em Portimão, Vilamoura, Olhão e VRSA (em particular nas fêmeas), enquanto o Verão de 2007 foi onde estas foram mais baixas ($p < 0,05$), por maior influência dos valores inferiores observados nos machos. É de salientar também que, de um modo geral, os mexilhões amostrados nas campanhas de 2005/2006 apresentaram concentrações de ALP maiores do que os de 2007/2008.

Analisando globalmente os locais ao longo das quatro campanhas, as concentrações de ALP encontradas em Sagres, Portimão e VRSA foram significativamente mais elevadas que nos restantes locais ($p < 0,05$). Observando as campanhas individualmente, nas fêmeas de Sagres (2005 e 2008), Portimão (2006) e VRSA (2006 e 2007), bem como de Olhão (2005 e 2006) determinaram-se os maiores valores de ALP ($p < 0,05$). Nos machos, as concentrações mais elevadas também se verificaram em Sagres (2005, 2007 e 2008), Portimão (2006) e VRSA (2006, 2007 e 2008), tal como em Vilamoura (2005 e 2006) ($p < 0,05$).

A mesma análise global demonstrou que as concentrações significativamente mais baixas foram determinadas nos indivíduos amostrados em Lagos, Faro e Tavira ($p < 0,05$). Analisando as campanhas separadamente, Tavira foi onde se encontraram as menores concentrações de ALP em ambos os sexos, à excepção do Verão de 2007, onde pelo contrário foram máximas. A estação de Lagos destaca-se pelas menores concentrações de ALP ao longo do tempo nas fêmeas, excepto em 2008 ($p < 0,05$), e no caso dos machos, apesar de apresentarem valores em geral baixos, só foram significativamente mais baixos do que os restantes locais no Inverno de 2006 ($p < 0,05$). Em Faro, os machos apresentaram os valores mais baixos nas quatro campanhas, excepto no Verão de 2005 ($p < 0,05$), enquanto para as fêmeas esta situação só foi significativa no período de 2007/2008 ($p < 0,05$).

Relativamente à estação da Figueira, amostrada no Verão de 2007 e Inverno de 2008 como tentativa de encontrar um local com fraca influência de contaminação antropogénica, verificou-se que, no global, os indivíduos amostrados só apresentaram valores de ALP significativamente mais baixos que os da estação de Sagres ($p < 0,05$), e as concentrações entre sexos foram muito semelhantes ($p > 0,05$).

Uma vez que os locais onde se encontraram as maiores e menores concentrações de ALP foram os mesmos para ambos os sexos, testaram-se correlações entre os valores de ALP das fêmeas e dos machos para comprovar a resposta semelhante deste biomarcador em relação aos dois sexos. De facto, foi encontrada uma correlação positiva ($r = +0,58$, 32 graus de liberdade, $p < 0,05$) entre sexos, indicando que as concentrações nos dois sexos variam directamente. No entanto, analisando as correlações separadamente em cada período de amostragem, para estabelecer se o tipo de correlação entre as concentrações de ALP nas fêmeas e machos se mantinha o mesmo nas quatro campanhas, verificou-se que no Verão de 2005 e Inverno de

2006, as correlações foram positivas ($r=+0,71$ e $r=+0,77$ respectivamente, 6 graus liberdade, $p<0,05$), mas nas duas campanhas de 2007/2008 não se encontrou qualquer correlação ($p>0,05$).

Foi ainda aplicada uma análise de componentes principais (PCA) ao conjunto total de valores de ALP (Figura 7), de modo a confirmar estes resultados. Os locais agrupados na parte positiva do eixo 1 estão associados a maiores concentrações de ALP, enquanto na parte negativa se verificam concentrações mais baixas. Este eixo explica 79,6% da variância dos dados. O eixo 2 explica 20,4% da distribuição e a este eixo associa-se a concentração de ALP nas fêmeas na parte positiva, e a dos machos, no lado negativo.

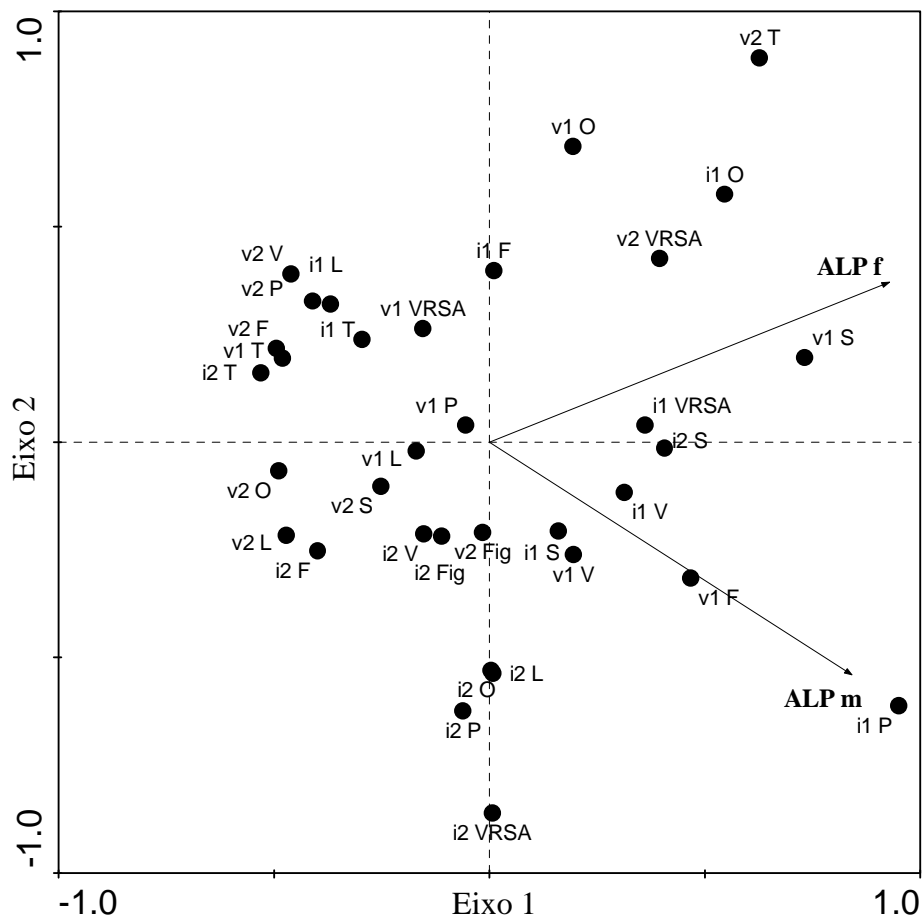


Figura 7 – Análise de componentes principais (PCA) da concentração de ALP em ambos os sexos de *M. galloprovincialis*, recolhidos nas quatro campanhas de Verão/Inverno.

Legenda: v1 – Verão 2005, i1 – Inverno 2006, v2 – Verão 2007, i2 – Inverno 2008; S – Sagres, Fig – Figueira, L – Lagos, P – Portimão, V – Vilamoura, F – Faro, O – Olhão, T – Tavira, VRSA.

No lado direito da PCA, destacam-se no quadrante superior locais mais associados às fêmeas, como Olhão 2005/2006, Tavira e VRSA 2007, onde os valores de ALP são mais elevados. No quadrante inferior, locais como Portimão 2006, Lagos, Portimão, Olhão e VRSA no Inverno 2008 estão mais associados aos machos. As estações de Sagres 2005 e 2008 e VRSA 2006 agrupam-se por maior proximidade, com valores elevados de ALP para ambos os sexos, enquadrando-se entre os vectores identificados para machos e fêmeas. Do lado esquerdo, onde as concentrações são mais baixas, agrupam-se mais estações amostradas no período 2007/2008, mas não se destacam locais em particular.

3.3.1. Variação sazonal de ALP em VRSA

No decorrer deste trabalho, o local de amostragem de VRSA, no estuário do Guadiana, demonstrou ser um dos locais em que as concentrações de ALP nos mexilhões se apresentaram mais elevadas, e inclusivamente com valores significativamente mais elevados nos machos do que nas fêmeas no Inverno de 2008. Uma vez que alguns estudos apontam para o estuário do Guadiana como tendo níveis relativamente elevados de pesticidas, podendo ser considerado na costa sul de Portugal como um *hotspot* de disrupção endócrina (Almeida *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, *in press*), fez-se uma análise sazonal mais detalhada nesta estação (Figura 8), incluindo mais dois períodos de amostragem (Outono em 2006 e Primavera de 2007), para além das quatro campanhas realizadas.

De um modo geral, as concentrações de ALP nas fêmeas deste local, ao longo dos seis períodos de amostragem, foram superiores às dos machos, exceptuando no Outono de 2006 e Inverno de 2008, onde estes apresentaram valores significativamente mais elevados ($p < 0,05$).

Verificou-se também que no Outono de 2006 foi quando se atingiu a concentração máxima de ALP, nos machos ($84,6 \pm 10,9 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), significativamente superior em relação a todas as campanhas ($p < 0,05$).

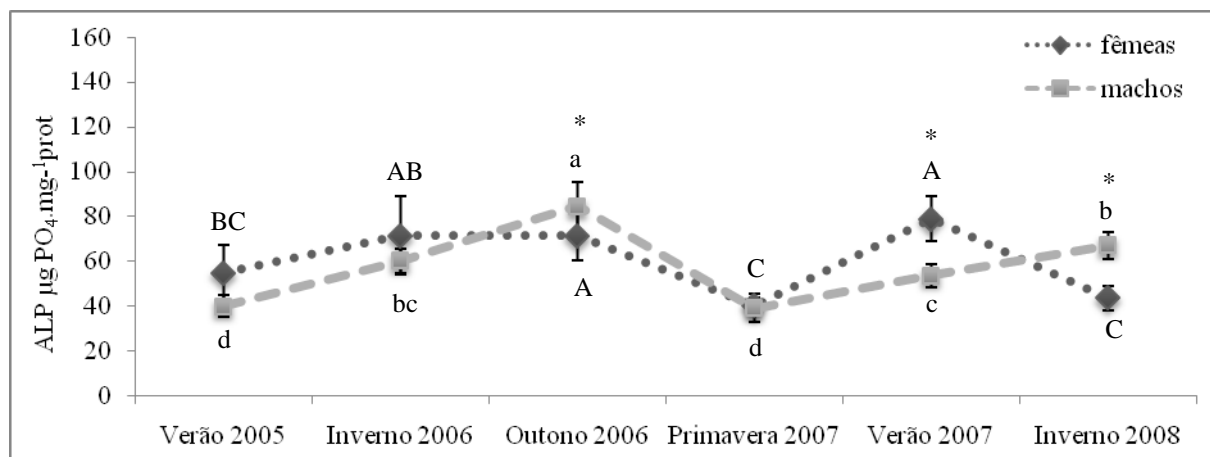


Figura 8 – Concentração de ALP determinada nas gónadas de mexilhões recolhidos no local de VRSA, em seis períodos sazonais diferentes, desde o Verão de 2005 até ao Inverno de 2008. As letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre locais para o sexo feminino, e as minúsculas para o sexo masculino ($p < 0,05$). O asterisco representa diferenças significativas entre sexos ($p < 0,05$).

Assim, observou-se um aumento das concentrações em ambos os sexos desde o Verão de 2005 até ao Outono de 2006 (máxima concentração de ALP), mas na Primavera de 2007 verificou-se uma descida acentuada, tendo-se determinado nesta campanha as concentrações significativamente mais baixas (fêmeas $40,2 \pm 3,5$ e machos $39,0 \pm 6,3 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), apesar das concentrações muito idênticas entre sexos. No Verão de 2007 verificou-se um novo aumento nas concentrações, onde as fêmeas apresentaram o seu valor máximo ($78,9 \pm 10,0 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), significativamente maior que o dos machos ($p < 0,05$). No Inverno de 2008 observou-se outra descida nos valores do ALP, mas apenas para as fêmeas, pois os machos continuaram a aumentar as concentrações de ALP, que foram significativamente superiores às das fêmeas ($p < 0,05$). Isto pode sugerir que, em determinadas alturas do ano, pode haver uma ligeira dessincronia sexual, ou seja, os machos terem um certo atraso na emissão dos gâmetas.

3.4. Histopatologia das Gónadas

Para complementar o estudo das alterações por exposição a compostos potencialmente disruptores endócrinos nos indivíduos de *M. galloprovincialis*, realizou-se ainda uma análise histopatológica dos tecidos das gónadas, observando-se inclusive o estágio de maturação, como descrito na secção 2.3.3.

No Verão de 2005, as gónadas dos mexilhões amostrados em Lagos e Faro apresentavam-se no estágio de reabsorção dos gametas (IIID), com algumas observações de final de libertação das células sexuais (IIIB) nos machos. Em Sagres, encontravam-se no estágio de restauro dos folículos (IIIC), enquanto em Portimão, Vilamoura, VRSA e Olhão estavam em reabsorção dos gametas (IIID), com algumas observações de entrada em repouso sexual (estádio 0), o que impediu a determinação do sexo em muitos casos. Em Tavira, todos os indivíduos estavam já em repouso (estádio 0). Também foram observados fenómenos de atresia, ou seja, degeneração oocitária, numa fêmea de Sagres.

Verificou-se ainda, em Portimão, uma fêmea infestada com o parasita *Steinhausia mytilovum* (como identificado em Villalba *et al.*, 1997; Rayyan & Chintiroglou, 2003) no citoplasma dos oócitos (Fig. 9 a e b), sendo que os mexilhões dos restantes locais não apresentaram alterações histopatológicas das gónadas.

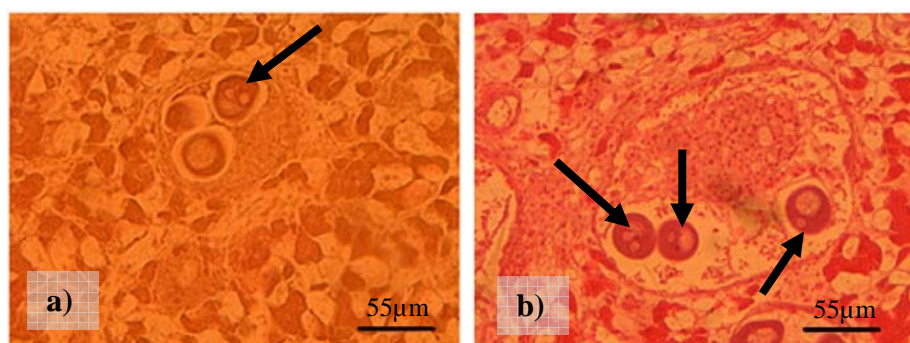


Figura 9 a) e b) – Fotomicrografias de alterações nas gónadas de um indivíduo *M. galloprovincialis* fêmea, recolhido em Portimão no Verão de 2005, infectado com o parasita *Steinhausia mytilovum*.

Na campanha do Inverno de 2006, os mexilhões de todos os locais encontravam-se nos estádios de restauro (IIIC) e reabsorção dos gâmetas (IIID), embora numa fase mais inicial em Sagres e Portimão. Nalguns machos ainda era possível observar-se uma fase final do estágio de libertação de gâmetas (IIIB), indicando uma reabsorção mais lenta relativamente às fêmeas. Em Tavira, alguns indivíduos já estavam em fase de descanso (estádio 0). Fenómenos de atresia foram observados em duas fêmeas em Sagres e em Lagos, e numa em Olhão e em Tavira.

Em Sagres, um indivíduo encontrava-se parasitado com *Bucephalus sp.* (Fig. 10 a e b) (como identificado em Shelley *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2006; Cochôa & Magalhães, 2008), mas nos restantes locais não se observaram alterações histopatológicas das gónadas.

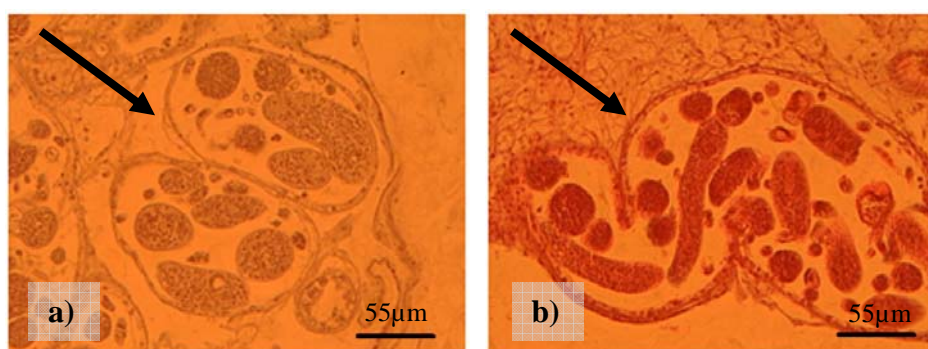


Figura 10 a) e b) – Fotomicrografias de alterações nas gónadas de um indivíduo *M. galloprovincialis* recolhido em Portimão no Verão de 2005, infectado com o parasita *Bucephalus sp.*

No Verão de 2007, os mexilhões de Faro encontravam-se na fase final de libertação dos gâmetas (IIIB). Nos restantes os locais, excepto Lagos, observou-se que os folículos das gónadas dos indivíduos amostrados se encontravam nos estádios de restauro (IIIC) e reabsorção (IIID), alguns a entrar já em fase de descanso (estádio 0), como em Portimão, Olhão e VRSA, indicando um estágio de maturação mais avançado. Em Lagos, todos os

indivíduos observados estavam em fase de descanso (estádio 0). Em Sagres detectou-se ainda uma ocorrência de intersex focal (Fig.11 f) num mexilhão (como identificado em Chesman & Langston, 2006), assim denominada por se verificar um único oócito dentro de um folículo masculino. Em Vilamoura e Olhão, observou-se uma fêmea de cada local com degeneração oocitária (atrésia).

Neste período encontraram-se indivíduos com alterações histopatológicas em vários dos locais amostrados, mas Sagres foi o local mais afectado. Nesta estação encontraram-se parasitas não identificados dentro e fora dos folículos masculinos (Fig. 11 a e b), estando estes circundados por uma intensa infiltração hemocitária (encapsulamento) onde o agente externo é aprisionado e destruído (Fig. 11 c e d), e ainda o que aparenta ser um parasita tremátode dentro da gónada masculina (Fig. 11 e). Estas ocorrências observaram-se em um de cinco indivíduos analisados.

Em Portimão e Tavira observaram-se inclusões procarióticas (como identificado em Kim *et al.*, 2006) num indivíduo de cada local, ambos apresentando pouca resposta imunitária dos hemócitos, face aos parasitas (Fig. 12 a e b).

Em Olhão, um dos espécimes mostrou-se infectado com o parasita *Steinhausia mytilovum* no citoplasma dos oócitos (Fig. 13 a). Em VRSA encontrou-se um possível ovo de copépode dentro de um folículo masculino de um mexilhão recolhido, mas com pouca resposta hemocitária (Fig. 13 b).

Nas gónadas dos indivíduos amostrados nas estações de Figueira, Lagos, Faro e Vilamoura deste Verão de 2007 não se observaram alterações nos tecidos analisados. A Figura 14 apresenta imagens típicas sem perturbações de gónadas femininas (Fig. 14 a) e masculinas (Fig. 14 b), de mexilhões recolhidos na Figueira.

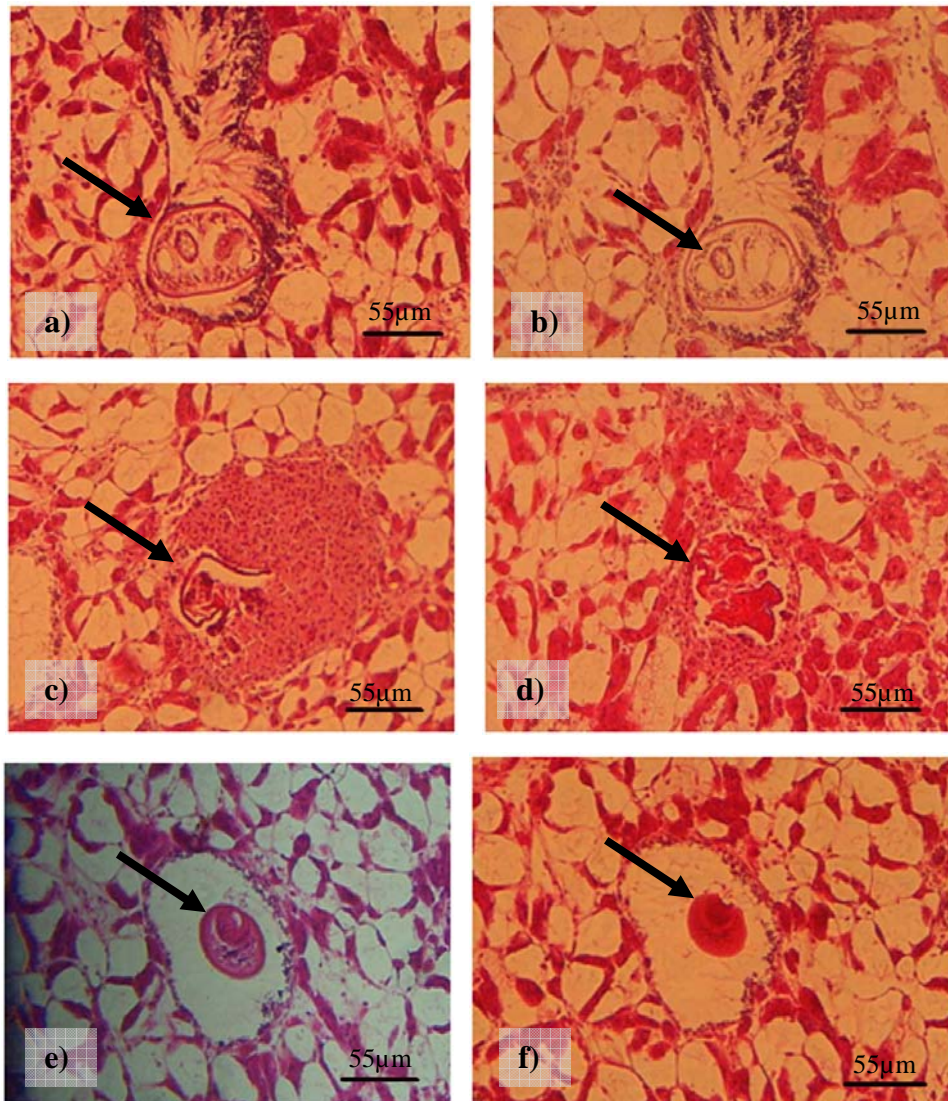


Figura 11 – Fotomicrografias de alterações nas gónadas de *M. galloprovincialis* do sexo masculino, recolhidos em Sagres no Verão de 2007: a) e b) parasita não identificados, c) e d) reabsorção de parasitas por hemócitos, e) possível trematode, f) intersex focal.

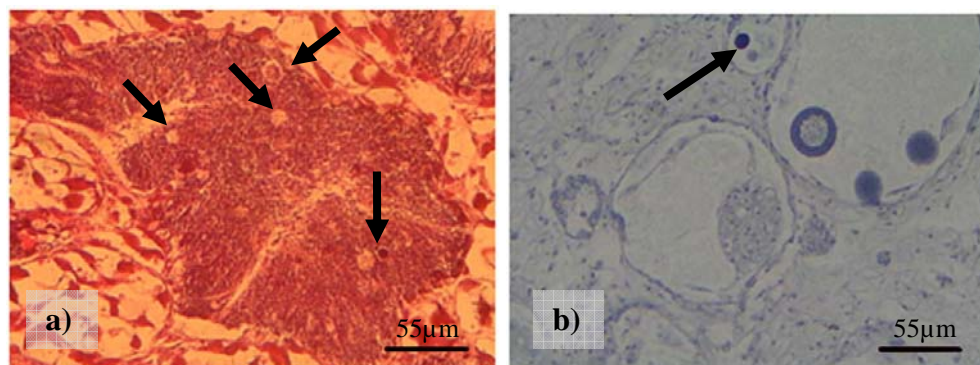


Figura 12 – Fotomicrografias de alterações nas gónadas de *M. galloprovincialis* recolhidos no Verão de 2007 em a) Portimão (indivíduos masculino) e b) Tavira (indivíduo feminino), ambas apresentando inclusões procarióticas.

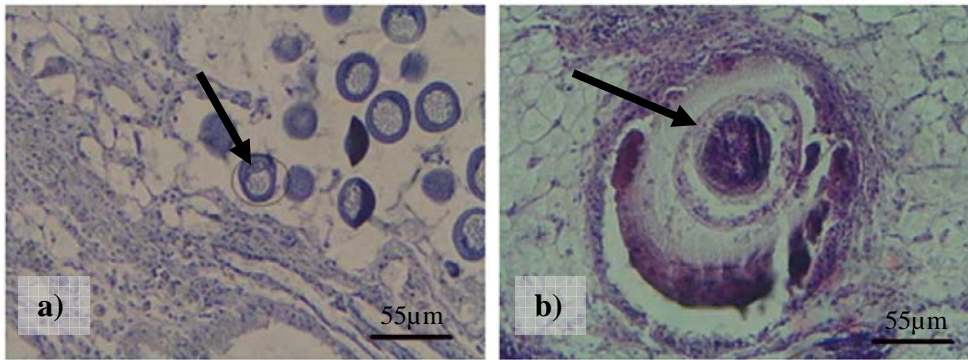


Figura 13 – Fotomicrografias de alterações nas gónadas de *M. galloprovincialis* recolhidos no Verão de 2007 em a) Olhão, fêmea infectada com o parasita *Steinhausia mytilovum*, e b) VRSA, macho apresentando um ovo de copépode.

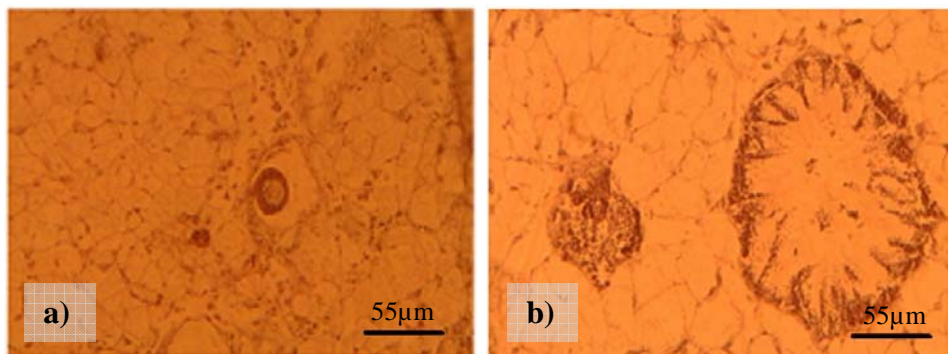


Figura 14 – Fotomicrografias de gónadas a) femininas e b) masculinas de *M. galloprovincialis* recolhidos no Verão de 2007 na Figueira.

No Inverno de 2008, em todos os locais, os indivíduos amostrados apresentavam as gónadas numa fase final do estágio de libertação de gâmetas (IIIB) (maioria dos machos) e/ou em fase de restauro (IIIC) (maioria das fêmeas). No entanto em Lagos, Vilamoura, Faro, Olhão e Tavira também se observaram alguns indivíduos em fase de reabsorção dos gâmetas (IIID). De salientar que foram observados fenómenos de atresia nas fêmeas de todos os locais, excepto Figueira.

Também nesta campanha o local mais afectado foi Sagres, tendo-se observado um indivíduo completamente castrado pelo tremátode *Bucephalus sp.* (Fig. 15 a e b), em vários estádios de desenvolvimento, sendo impossível a identificação microscópica do sexo do mexilhão. Observou-se ainda um segundo indivíduo infectado com o parasita *Steinhausia mytilovum* no citoplasma dos oócitos (Fig. 15-c).

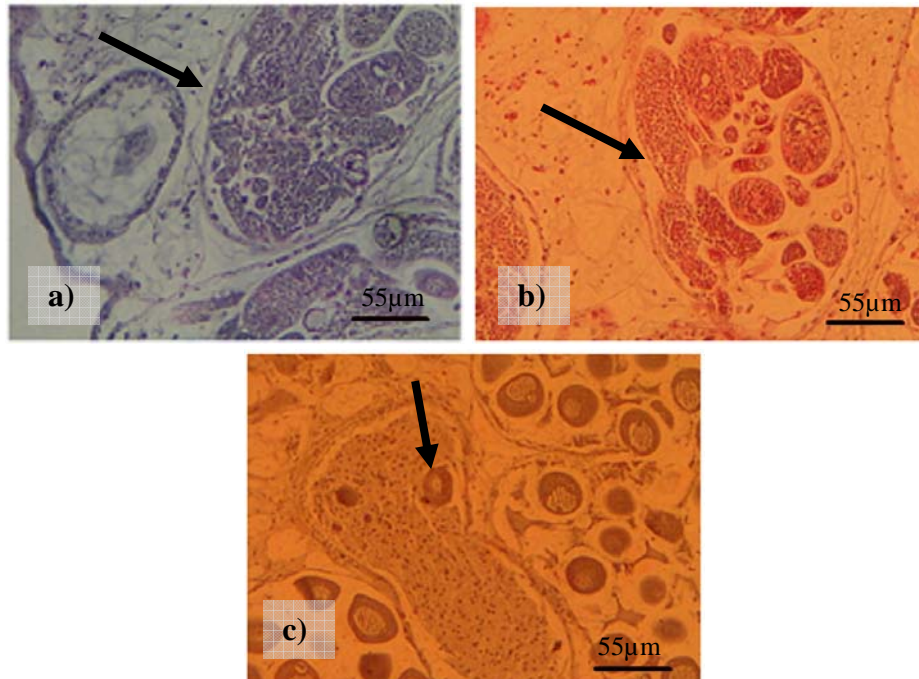


Figura 15 – Fotomicrografias de alterações nas gónadas de *M. galloprovincialis* recolhidos em Sagres no Inverno de 2008: a) e b) parasita *Bucephalus* sp., c) fêmea parasitada por *Steinhausia mytilovum*.

Nas estações de Lagos e Tavira, um indivíduo de cada local também se encontrava infectado pelo parasita *Steinhausia mytilovum* no citoplasma dos oócitos (Fig. 16 a b). Este parasita, no Verão anterior, só foi observado em Olhão.

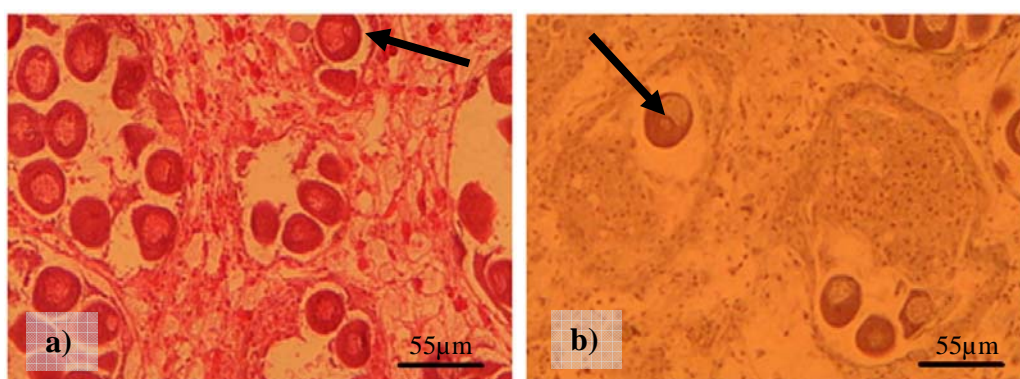


Figura 16 – Fotomicrografias de gónadas infectadas com o parasita *Steinhausia mytilovum* em *M. galloprovincialis* do sexo feminino de a) Lagos e b) Tavira, no Inverno de 2008.

Nas gónadas dos indivíduos amostrados nas estações de Figueira, Portimão, Vilamoura, Faro, Olhão e VRSA deste Inverno de 2008, não se observaram alterações nos tecidos analisados.

De um modo geral, os mexilhões amostrados no Verão apresentaram as gónadas em estádios de reabsorção e/ou restauro de gâmetas, muitas vezes já a entrar em estado de repouso, principalmente no Verão de 2007. Nos Invernos os mexilhões ainda se encontravam em libertação de gâmetas (principalmente os machos) e/ou a entrar em estádios de restauro e reabsorção. Sagres foi o local mais problemático em termos histopatológicos, pois foi onde se observou maior incidência de alterações nos tecidos analisados e em três das quatro campanhas realizadas, tendo-se inclusivamente detectado a possível presença intersex, ainda que num estágio inicial. Esta estação foi ainda mais afectada no Verão de 2007, pela diversidade de parasitas. Em Portimão e Tavira também se observaram alterações em duas épocas diferentes, tendo-se encontrado indivíduos infectados por vários parasitas em ambos os locais. Por outro lado, em Figueira, Faro e Vilamoura não se detectaram alterações histopatológicas em nenhuma das campanhas.

3.5. Análise comparativa de ALP e IC

De modo a analisar a possível influência do estado fisiológico dos organismos na sua resposta em termos da concentração das proteínas do tipo vitelogenina, testaram-se correlações entre os valores de ALP e o IC.

Nos indivíduos do sexo feminino, ao longo das quatro campanhas de amostragem, encontrou-se uma correlação negativa ($r=-0,44$, $p<0,05$, 32 graus de liberdade), indicando que quando o IC das fêmeas se encontrava mais baixo, as concentrações de ALP eram mais elevadas, e quando o IC era mais elevado, os valores do ALP mostravam-se mais baixos. No entanto, considerando cada período de amostragem individualmente, apenas no Verão de 2007 se

conseguiu estabelecer uma correlação negativa ($r=-0,75$, $p<0,05$, 7 graus de liberdade) entre o IC e as concentrações de ALP nas fêmeas.

Em relação aos mexilhões do sexo masculino, não se encontraram correlações entre as concentrações de ALP e o IC, excepto quando analisando os locais separadamente: verificou-se uma correlação positiva em VRSA ($r=+0,98$, $p<0,05$, 2 graus de liberdade), o que indica que o IC seria mais elevado quando as respectivas concentrações de ALP também estavam mais elevadas, e mais baixo quando os valores de ALP se mostraram menores.

3.6. Stress Oxidativo – Determinação da Peroxidação Lipídica (LPO)

Na Figura 17 estão representadas as concentrações de compostos de Peroxidação Lipídica (LPO), determinadas nas brânquias dos indivíduos *M. galloprovincialis*, recolhidos ao longo da costa sul de Portugal, nas quatro campanhas de amostragem.

As concentrações de LPO foram superiores nos indivíduos recolhidos no Verão de 2005, comparativamente aos outros 3 períodos de amostragem ($p<0,05$). Neste Verão, os valores de LPO significativamente mais elevados foram encontrados nos mexilhões de VRSA e Tavira, seguindo-se os de Olhão ($24,7\pm 4,0$; $24,7\pm 3,3$ e $23,8\pm 9,2\mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$, respectivamente; $p<0,05$). No Inverno de 2006 e Verão de 2007, Olhão mantém-se como um dos locais em que os indivíduos apresentam concentrações de LPO significativamente mais elevadas que os restantes locais ($6,4\pm 1,4$ e $5,5\pm 0,7\mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$, respectivamente; $p<0,05$), e em 2008, VRSA é de novo o local onde os mexilhões têm os valores mais elevados ($2,2\pm 0,7\mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$), apesar de numa ordem de grandeza inferior ao observado no Verão de 2005 .

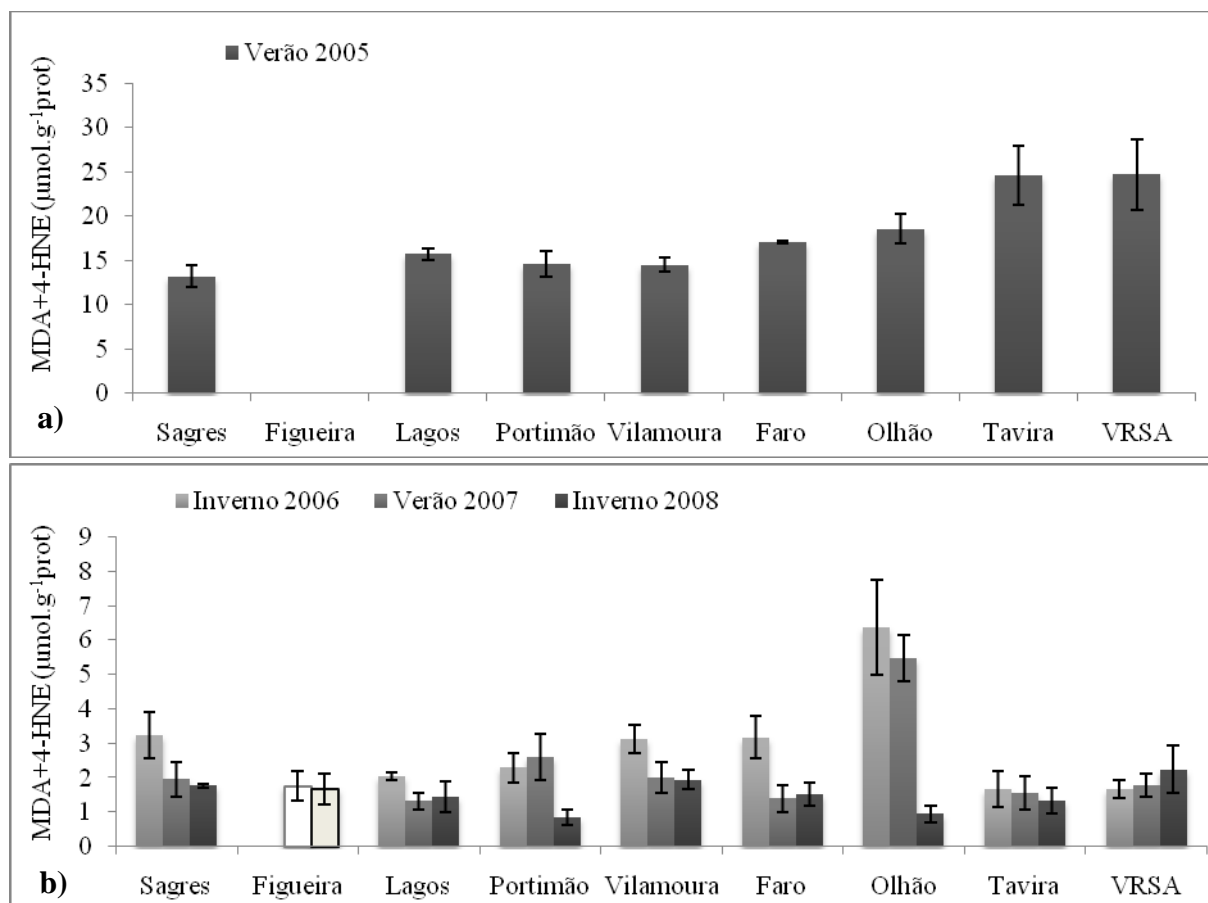


Figura 17 – Concentração de LPO determinada nas brânquias de *M. galloprovincialis* recolhidos ao longo da costa sul de Portugal, nas campanhas de a) Verão de 2005 e b) Inverno de 2006, Verão de 2007 e Inverno de 2008.

Quanto às concentrações mais baixas de LPO, no Verão de 2005 foram encontradas nos espécimes de Sagres ($13,2 \pm 1,2 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$), no Inverno de 2006, em Tavira e VRSA ($1,7 \pm 0,5 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$ nos dois locais), em Lagos de 2007 ($1,3 \pm 0,2 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$) e em Portimão e Olhão de 2008 ($0,9 \pm 0,2 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{prot}$ nos dois locais).

Os espécimes recolhidos no Inverno de 2008 apresentam, de um modo geral, concentrações de LPO inferiores, mas apenas estatisticamente menores em Portimão e Olhão ($p < 0,05$). Contudo, em geral, os mexilhões recolhidos no período de 2007/2008 demonstraram ter valores de LPO significativamente inferiores ao período de 2005/2006 ($p < 0,05$).

Para analisar a possível influência do estado fisiológico dos organismos na sua resposta ao stress oxidativo, analisaram-se as correlações entre o LPO e o IC, não se verificando nenhuma relação significativa entre ambos ($p>0,05$).

3.6.1. Análise comparativa de ALP e LPO

Com o intuito de estudar possíveis relações entre a disrupção endócrina e o stress oxidativo, as concentrações de ALP e LPO foram analisadas através de correlações. Comparando os valores de ALP determinados nos mexilhões de fêmeas e machos com os de LPO, ao longo das quatro campanhas, nenhuma correlação foi significativa ($p>0,05$). No entanto, é de salientar que, de um modo geral, as concentrações de ALP foram mais elevadas em 2005/2006, e o mesmo se verificou para o LPO. Neste período de Verão/Inverno, Olhão sobressaiu como um dos locais onde as fêmeas apresentaram elevadas concentrações de ALP, e foi nos mexilhões deste local que se determinaram os maiores teores de LPO. Similarmente, no Inverno de 2008, em VRSA, determinaram-se maiores concentrações de LPO e também de ALP nos machos (e superiores às das fêmeas). De notar ainda que ambos os biomarcadores evidenciaram concentrações mais baixas nos espécimes recolhidos em Tavira no Inverno de 2006 e em Lagos no Verão de 2007 (ALP baixo nas fêmeas).

Contudo, considerando cada período amostrado individualmente, no Verão de 2005 foi possível estabelecer uma correlação negativa entre as concentrações de ALP nos machos e o LPO ($r=-0,74$, $p<0,05$, 6 graus de liberdade). Porém, se os locais forem considerados isoladamente, somente para os machos de Faro se encontrou uma correlação positiva entre a sua concentração de ALP e os valores de LPO ($r=+0,96$, $p<0,05$, 2 graus de liberdade).

3.7. Análise global

Para avaliar a distribuição espacial e temporal dos valores de ALP, LPO e IC entre os diferentes locais e períodos de amostragem, foi aplicada uma análise de correspondência canónica (CCA) ao conjunto total de dados, representando-se na Figura 18 os resultados da análise, com as coordenadas dos locais nos eixos principais. A CCA permite sobrepor uma segunda matriz de dados, que neste caso são ambientais (temperatura e salinidade), utilizada no cálculo dos eixos principais e representada por vectores, e a magnitude do vector dá-nos a boa ou má representatividade dessa matriz.

A CCA (Fig. 18) discriminou diferenças sazonais uma vez que associa os locais amostrados nos períodos de Inverno na parte positiva do eixo 1, e os locais de Verão na parte negativa; esta distinção está positivamente associada aos vectores de temperatura e salinidade. De facto, houve uma grande amplitude de variação destes 2 parâmetros, com valores mais elevados no Verão e mais baixos no Inverno. Do agrupamento central, na parte positiva do eixo 1, destaca-se Portimão e VRSA (Inverno 2006) e Tavira (nos dois Invernos) uma vez que os parâmetros ambientais foram mais baixos nesta estação, e no caso de Tavira e VRSA, talvez por maior influência da variação da salinidade, já que estas estações se situam próximas da influência dos rios Gilão e Guadiana, respectivamente. De salientar que na estação de Portimão e VRSA, os indivíduos aí amostrados apresentaram concentrações mais elevadas de ALP; em Tavira, nos dois Invernos, determinaram-se concentrações baixas.

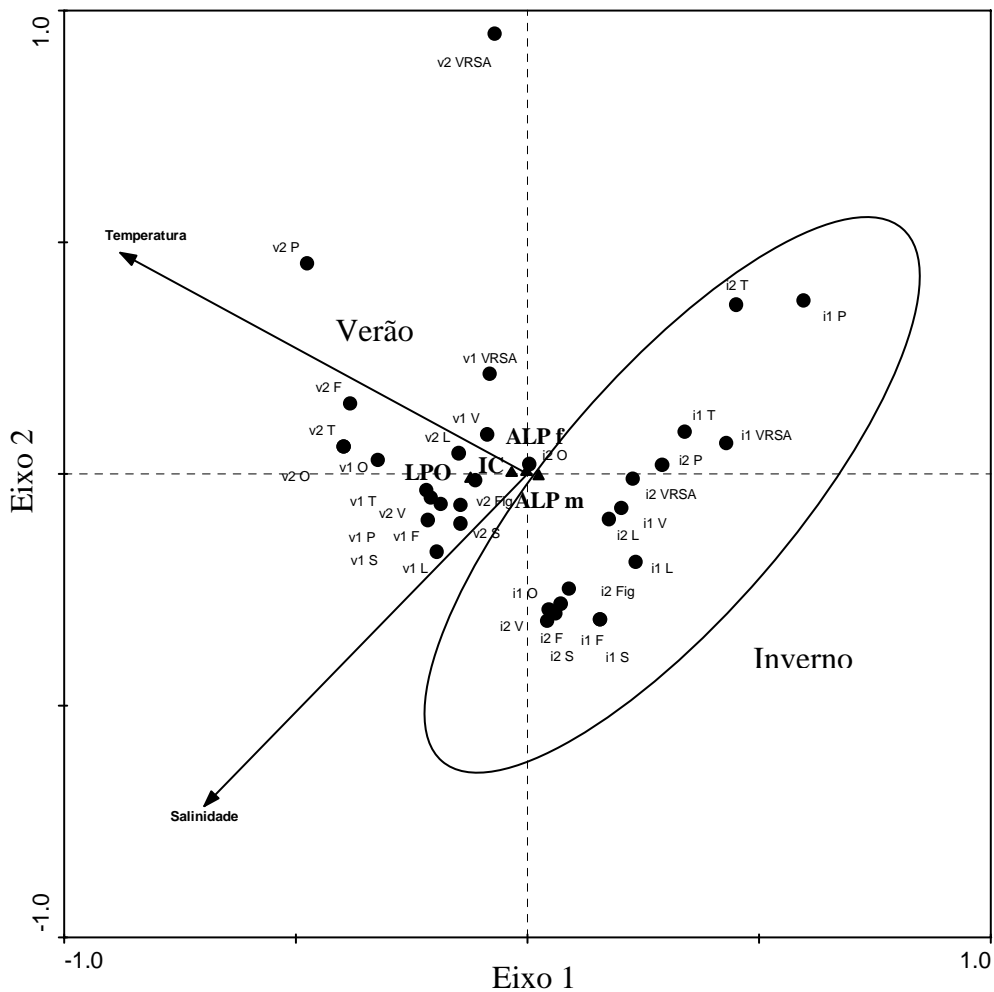


Figura 18 – Análise de correspondência canónica aplicada ao conjunto de resultados de concentração de ALP e LPO, e valores de IC, Temperatura e Salinidade nos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos durante as quatro campanhas de Verão/Inverno.

Legenda: v1 – Verão 2005, i1 – Inverno 2006, v2 – Verão 2007, i2 – Inverno 2008; S – Sagres, Fig – Figueira, L – Lagos, P – Portimão, V – Vilamoura, F – Faro, O – Olhão, T – Tavira, VRSA.

Na parte positiva do eixo 2, distinguem-se VRSA e Portimão (Verão de 2007), onde as temperaturas foram mais elevadas e salinidades mais baixas, dentro do Verão. Os espécimes de VRSA no Verão de 2007 também mostraram concentrações de ALP mais elevadas. Denota-se ainda que a variável do LPO se situa ligeiramente do lado negativo do eixo 1, associando-se mais ao agrupamento de Verão, acentuando uma maior influência nestas estações, enquanto o ALP e o IC se encontram ao centro, não se encontrando especialmente associadas a nenhum período ou local.

3.7.1. Análise comparativa com contaminantes

No meio aquático, inúmeros compostos presentes em misturas complexas são disruptores endócrinos; uma análise detalhada de todas estas substâncias existentes no meio seria demasiado complexa, morosa e dispendiosa, e o objectivo deste trabalho foi avaliar efeitos de alterações endócrinas destes compostos através do biomarcador ALP e não propriamente a sua quantificação. No entanto, estando as duas primeiras campanhas de Verão/Inverno inseridas no âmbito do Projecto BIHOTA, foi possível aceder a dados de concentrações de contaminantes, como os metais Zinco (Zn), Níquel (Ni), Cádmió (Cd) e Chumbo (Pb), e os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs), no Verão de 2005 (Tabela II), contaminantes descritos como tendo efeitos de disrupção endócrina nos organismos aquáticos (EPA, 1997; Depledge & Billinghamurst, 1999; EDMAR, 2002; Matozzo *et al.*, 2008).

Tabela II – Concentrações dos contaminantes Zn, Ni, Cd, Pb e PAHs determinados nos indivíduos de *M. galloprovincialis* amostrados nos oitos locais do Verão de 2005 (Projecto BIHOTA).

Local	(µg/g peso seco)				(ng/g peso seco)
	[Zn]	[Ni]	[Cd]	[Pb]	Total PAHs
Sagres	237,9	0,0	1,6	0,7	74,7
Lagos	143,3	0,1	0,4	0,4	59,9
Portimão	242,5	0,3	0,6	6,9	78,8
Vilamoura	180,7	0,0	0,5	2,7	510,5
Faro	267,5	0,2	1,2	3,5	162,4
Olhão	111,3	0,1	0,5	5,6	911,4
Tavira	287,0	0,2	1,2	4,1	49,3
VRSA	379,7	0,3	2,3	14,5	240,5

Assim, foi aplicada uma análise de correspondência canónica (CCA) ao conjunto total de dados, testando uma possível relação entre os contaminantes atrás referidos e as concentrações de ALP e LPO determinadas, nos diferentes locais no período de amostragem

do Verão de 2005. Na Figura 20 representam-se os resultados da CCA com as coordenadas dos locais nos eixos principais e sobrepondo a segunda matriz com os dados das concentrações dos contaminantes, representados pelos vectores.

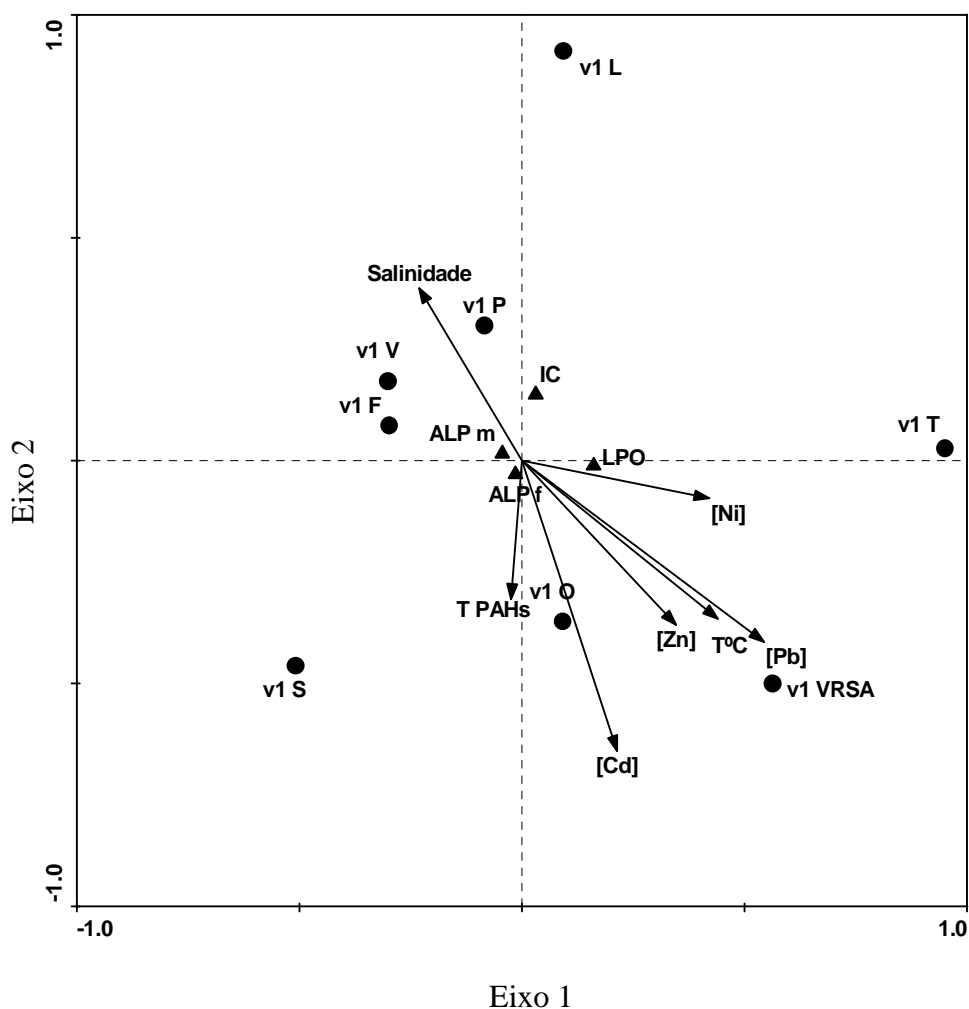


Figura 20 – Análise de CCA aplicada ao conjunto de resultados de concentração de ALP, LPO e contaminantes (metais – Zn, Ni, Cd e Pb, e PAHs), e valores de IC, Temperatura e Salinidade, nos mexilhões *M. galloprovincialis* recolhidos durante o Verão de 2005.

Legenda: v1 – Verão 2005; S – Sagres, L – Lagos, P – Portimão, V – Vilamoura, F – Faro, O – Olhão, T – Tavira, VRSA.

A análise de correspondência canónica representa as maiores concentrações de metais no quadrante inferior direito, às quais se poderá associar o LPO uma vez que está deslocado na parte positiva do eixo 1. O ALP nas fêmeas e nos machos encontra-se situado ao centro, não

permitindo estabelecer uma relação com as concentrações dos metais. Tanto o IC como a salinidade posicionam-se na parte positiva do eixo 2 aparentando variar inversamente às concentrações dos contaminantes. Assim sendo, destaca-se a estação de VRSA (estuário) no mesmo quadrante dos metais, associando-se às suas maiores concentrações, bem como a níveis mais elevados de LPO, mas que não se reflectiram no aumento de ALP.

A estação de Olhão encontra-se associada a maiores concentrações de PAHs, salientando-se os valores elevados de ALP aqui determinados para as fêmeas, bem como de LPO. Tavira evidencia-se na parte positiva do eixo 1, possivelmente associada a valores mais elevados de LPO, mas que em termos de ALP foram baixos. No quadrante inferior esquerdo, destaca-se Sagres, talvez relacionado com concentrações relativamente mais elevadas de Cd, sendo que esta estação apresentou os valores de ALP mais elevados. Por último, salienta-se ainda Lagos na parte positiva do eixo 2, em que as concentrações dos biomarcadores e dos contaminantes são baixas, e o IC elevado.

4. Discussão

Actualmente, sabe-se que os compostos disruptores endócrinos (DE), incluindo substâncias estrogénicas ambientais (xenoestrogénios), são pelo menos parcialmente responsáveis pela disrupção da reprodução e desenvolvimento das populações nos ecossistemas aquáticos, uma vez que afectam numerosos processos controlados por hormonas (Gagné *et al.*, 2002a; Jobling *et al.*, 2003). No sentido de alcançar uma maior compreensão da perturbação provocada pelos DE na fisiologia dos organismos, têm sido desenvolvidos biomarcadores de disrupção endócrina que a monitorize, e que possam ser aplicados a uma variedade de espécies (Jobling *et al.*, 2003; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005).

Um dos efeitos documentados dos compostos xenoestrogénicos, dada a sua capacidade de interagir com os receptores de estrogénio, é a indução da expressão da vitelogenina (Vtg) (Blaise *et al.*, 1999; WHO, 2002; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Matozzo *et al.*, 2008). Esta fosfolipoglicoproteína, envolvida nos processos de vitelogénese como precursora das reservas energéticas embrionárias, tem associados a si fosfatos que são lábeis por alcalinidade, pelo que este princípio funciona como base para a determinação indirecta das suas concentrações. Assim, esta proteína tem sido proposta como biomarcador de disrupção endócrina, nomeadamente através da medição dos fosfatos alcalinos pelo método do ALP (Blaise *et al.*, 1999; Marin & Matozzo, 2004; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Matozzo *et al.*, 2008). Vários trabalhos, desde o fim da década dos anos 90, têm vindo a demonstrar a viabilidade da utilização do ALP como medição indirecta da presença de xenoestrogénios em moluscos bivalves, evidenciando que maiores concentrações de ALP podem ser indicativas da presença de estrogénios ambientais (Blaise *et al.*, 1999; Depledge & Billingham, 1999; Gagné *et al.*, 2001a, b, 2002b; Aarab *et al.*, 2004, 2006; Quinn *et al.*, 2004, 2006; Gagné *et al.*, 2005; Matozzo & Marin, 2005; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Pampanin *et al.*, 2005; Zorita *et al.*, 2006; Matozzo & Marin, 2007; Gagné *et al.*, 2008; Ricciardi *et al.*, 2008).

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a presença de compostos com capacidade de disrupção endócrina na costa sul de Portugal, estudando a utilização do método do ALP como biomarcador de exposição a compostos xenoestrogénicos em bivalves. Nesta zona costeira concentra-se mais de 70% da população da região, população essa que sofre uma forte variação sazonal associada ao turismo, podendo aumentar em cerca de 10 vezes no verão. Assim, nesta época do ano a pressão antropogénica na zona costeira aumenta substancialmente. Os centros urbanos, portos/marinas e indústrias são a principal fonte de contaminação, que está directamente associada ao impacto da descarga de águas residuais quer domésticas, quer industriais (Bebiano & Machado, 1997; Bebianno *et al.*, 2007). Efluentes municipais e industriais não tratados e/ou tratados em estações de tratamento de águas residuais (ETARs), escorrências agrícolas e actividade pecuária são reconhecidas fontes de compostos xenoestrogénicos nos ecossistemas aquáticos, cuja principal origem provém da utilização de hormonas em animais e humanos (libertadas por excreção), bem como da utilização de compostos orgânicos a nível doméstico, industrial e agrícola (Sumpter, 1998; Gagné & Blaise, 2003; Pojana *et al.*, 2007; Matozzo & Marin, 2007; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009). Os bivalves, importantes membros dos ecossistemas aquáticos, são particularmente susceptíveis a este tipo de compostos xenobióticos, uma vez que são organismos sésseis e filtradores, capazes de bioconcentrar estes compostos em concentrações elevadas, mas com taxas de desintoxicação relativamente baixas (Amiard *et al.*, 1986; Viarengo & Canesi, 1991; Gagné *et al.*, 2001b, 2002a, 2006; Canesi *et al.*, 2007; Ketata *et al.*, 2008). No entanto, os estudos de disrupção endócrina nestes organismos têm sido dificultados, principalmente pela falta de conhecimentos da sua fisiologia endócrina básica (Osada *et al.*, 2003; Jobling *et al.*, 2003; Canesi *et al.*, 2007; Lafont & Mathieu, 2007; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009).

Na zona costeira do sul de Portugal existem ainda três sistemas aquáticos importantes, nomeadamente os estuários dos rios Arade e Guadiana, e o sistema lagunar da Ria Formosa. Juntamente com as linhas de água e ribeiras, estes sistemas funcionam como meio de entrada de contaminantes antropogénicos para os ambientes aquáticos (Bebianno, 1995; Bebianno & Machado, 1997; Bebianno *et al.*, 2007). Assim, a escolha dos locais em estudo incluiu áreas de portos, marinas e estuários, em zonas próximas de centros urbanos, em comparação a uma praia com influência antropogénica baixa (praia da Figueira).

4.1. Variação de ALP entre sexos de *M. galloprovincialis*

A vitelogenina é a grande precursora das proteínas que fornecem as reservas energéticas no desenvolvimento embrionário, as vitelinas. Nas fêmeas maduras, a síntese de Vtg aumenta em resposta aos estrogénios endógenos, tal como o 17 β -estradiol (E2), sendo armazenada nos oócitos em desenvolvimento. Nos machos, a Vtg é sintetizada em níveis muito baixos, mesmo indetectáveis, mas a exposição a compostos xenoestrogénicos pode aumentar o seu potencial de síntese. Assim, apesar da exposição a estes compostos induzir a síntese de Vtg tanto nas fêmeas como nos machos, aumentos mais acentuados de Vtg nos machos (e em fêmeas imaturas) são mais indicativos de exposição ambiental a estas substâncias (Blaise *et al.*, 1999; Matozzo & Marin, 2007; Matozzo *et al.*, 2008).

Assumindo que fêmeas e machos de *M. galloprovincialis* se encontraram no mesmo estado de maturação aquando da amostragem (realizada no mesmo dia em cada local), e uma vez que esta espécie é gonocórica estável com sexos separados (Brouseau, 1983; Villalba, 1995; Caceres-Martinez & Figueras, 1998), a comparação entre os valores de ALP em ambos os sexos fornece uma indicação da exposição dos bivalves a compostos DE. Neste trabalho

verificou-se que, globalmente, as fêmeas de *M. galloprovincialis* apresentaram valores de ALP significativamente mais elevados do que os machos ($p < 0,05$), o que está em acordo com a situação típica uma vez que as proteínas do tipo-Vtg são características das fêmeas (Blaise *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001b). Outros autores como Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville (2005) também encontraram, noutra espécie de mexilhão, *Mytilus edulis*, exposto laboratorialmente a DE, valores de concentrações de ALP nas fêmeas, de um modo geral, superiores às dos machos, tal como verificado por Gagné *et al.* (2002b) em amêijoas *Mya arenaria*, e Matozzo & Marin (2007) em *Tapes philippinarum*, em meio natural.

Contudo, concentrações de ALP mais elevadas nas fêmeas do que nos machos não exclui à partida a presença de compostos xenoestrogénicos no meio, uma vez que o sexo feminino também é susceptível de sofrer indução da Vtg. De facto, num estudo com mexilhões *Elliptio complanata* expostos a um efluente municipal, Gagné *et al.* (2001b) constataram que os níveis de proteínas do tipo-Vtg aumentaram em ambos os sexos, mas de forma mais intensa nas fêmeas. Estes autores sugeriram que as fêmeas seriam assim mais sensíveis à indução de Vtg por parte dos compostos estrogénicos presentes no efluente do que os machos. Do mesmo modo, Blaise *et al.* (2003) observaram a feminização desta espécie de mexilhões como efeito mais extremo por exposição a efluentes municipais.

Por outro lado, no presente trabalho, analisando especificamente cada local em estudo, também se observaram situações em que as concentrações de ALP não foram significativamente diferentes entre fêmeas e machos, podendo mesmo ter-se apresentado muito semelhantes. No Verão de 2005, esta situação verificou-se em todos os locais excepto Olhão, e o mesmo ocorreu no Inverno de 2006, em Sagres, Portimão, Vilamoura e VRSA. No Verão de 2007 não se verificaram diferenças significativas entre as concentrações de ALP de ambos os sexos em Sagres, Figueira, Lagos e Olhão, e no último Inverno (2008), em Sagres, Figueira, Vilamoura, Faro e Olhão. Assim, este resultado pode indicar que os *M.*

galloprovincialis destes locais estariam sob a influência de compostos disruptores endócrinos, que induziram a síntese de Vtg, reflectindo-se em valores de ALP nos machos semelhantes aos das fêmeas. É de salientar ainda que em Sagres os mexilhões das quatro campanhas nunca apresentaram diferenças entre sexos, pelo que este local parece estar sobre maior impacto de compostos xenoestrogénicos, relativamente aos restantes locais.

Outros autores também não obtiveram diferenças significativas entre as concentrações de ALP nas fêmeas e nos machos de diferentes espécies de bivalves, ainda que ambos os sexos respondessem à exposição a compostos xenoestrogénicos com a indução da síntese de Vtg, tal como se observou no actual estudo. A contaminação de *M. edulis* com petróleo do Mar do Norte (*North Sea Oil*, NSO) provocou o aumento dos valores de ALP nas gónadas dos dois sexos, mas não se observaram diferenças entre eles (Aarab *et al.*, 2004). Quinn *et al.* (2004 e 2006) obtiveram o mesmo resultado para mexilhões *Dreissena polymorpha*, expostos a um efluente municipal e a nonilfenol (NP), bem como Ricciardi *et al.* (2008), num estudo de exposição de *M. galloprovincialis* a crescentes concentrações de NP.

Todos estes autores concordam que este tipo de resultado sugere igualmente a ocorrência de disrupção endócrina, uma vez que a exposição a compostos xenoestrogénicos induziu a síntese de Vtg, aumentando os níveis de ALP em ambos os sexos. Sugere-se ainda uma maior susceptibilidade por parte dos machos aos contaminantes presentes naqueles estudos, ao ponto de igualarem as concentrações de ALP observadas nas fêmeas.

Neste contexto, se os machos podem ser mais susceptíveis à disrupção endócrina induzida por determinados contaminantes, então numa situação de exposição a concentrações mais elevadas desses compostos, os mexilhões deste sexo poderiam mesmo apresentar uma maior indução das proteínas do tipo-Vtg relativamente às fêmeas. Este foi o caso observado nos *M. galloprovincialis* amostrados no Inverno de 2008 em Lagos, Portimão e VRSA, em que os machos apresentaram valores de ALP significativamente superiores aos das fêmeas ($p < 0,05$).

O mesmo foi verificado por Matozzo & Marin (2005) em *T. philippinarum*, durante uma exposição laboratorial de concentrações crescentes de nonilfenol. Os autores consideraram que o estado de pré-desova dos indivíduos por si só induzia níveis elevados de Vtg nas fêmeas, podendo mascarar a sua indução pelo NP neste sexo, mas que a resposta por parte dos machos indicava-os como mais sensíveis à acção disruptiva deste composto. Pampanin *et al.* (2005), num estudo com *M. galloprovincialis*, e Gagné *et al.* (2008) com *M. edulis*, também consideram a maior susceptibilidade do sexo masculino a contaminantes presentes no meio, ao passo que nas fêmeas a Vtg é naturalmente expressa durante a gametogénese, contribuindo para mascarar o processo de indução por xenoestrogénios. Contudo, estes estudos realçam também a importância do estado de maturação dos indivíduos aquando da comparação dos efeitos dos compostos xenoestrogénicos.

De um modo geral, neste estudo, fêmeas e machos encontravam-se nos mesmos estádios de maturação sexual, essencialmente em período de pós-desova (reabsorção e/ou restauro de gâmetas). Contudo, ainda se encontraram mexilhões, principalmente machos, em período de libertação de gâmetas, podendo sugerir uma ligeira dessincronia sexual, tal como se referiu para a variação sazonal de ALP em VRSA (secção 3.3.1.). Esta diferença entre os estádios de maturação nos dois sexos poderá contribuir para as situações em que não existem diferenças significativas entre os valores de ALP das fêmeas e dos machos, ou que os machos apresentam valores superiores às fêmeas, já que a síntese de Vtg estaria a diminuir nas fêmeas a entrar em período de pós-desova. Gagné *et al.* (2001b) verificaram que as proteínas do tipo-Vtg nas gónadas de fêmeas de *E. complanata* em períodos de pré e pós-desova eram diferentes, sendo menores nas fêmeas em descanso do que nas fêmeas sexualmente desenvolvidas.

Porém, estas observações de mexilhões em estádios maioritariamente de pós-desova ou de possível ligeira dessincronia sexual não significam necessariamente a diminuição da acção de

compostos xenoestrogénicos no meio aquático dos locais em estudo. Gagné *et al.* (2005), em estudos laboratoriais, comprovaram que a injeção de concentrações crescentes de E2 nas gónadas de *E. complanata* em estágio de descanso induzia o aumento das concentrações de ALP em consonância com a dose do contaminante. Do mesmo modo, Gagné *et al.* (2001a,b), em tratamentos de exposição e injeção de NP, E2, testosterona e coprostanol (metabolito reduzido do colesterol) em *E. complanata* sexualmente indiferenciados, observaram aumentos nos níveis de Vtg. Em estudos de campo, Matozzo & Marin (2007) amostraram *T. philippinarum* em fase de pré-desova, no Verão, e em período de descanso, no Inverno, e constataram que em ambas as estações do ano (e, conseqüentemente, em ambos os estádios de maturação) as concentrações foram mais elevadas nos locais mais contaminados. Os autores salientam ainda que no Inverno a indução de Vtg por xenoestrogénios foi mais perceptível, uma vez que os níveis de Vtg deveriam ser residuais nesta altura (por ser uma fase de descanso). Quinn *et al.* (2004), em experiências de contaminação com xenoestrogénios em *D. polymorpha* no início da gametogénese, obtiveram aumentos do ALP pela exposição em ambos os sexos.

Os estudos destes autores indicam que, quer em fase de descanso, sexualmente indiferenciados ou em estádios de gametogénese, os mexilhões respondem à influência de estrogénios exógenos, podendo haver maior susceptibilidade à disrupção endócrina na fase do desenvolvimento das gónadas (Quinn *et al.*, 2004). De um modo geral, os machos parecem ser mais sensíveis a determinados compostos, como o nonilfenol, enquanto as fêmeas podem mascarar o processo de indução de Vtg pela sua síntese natural, apesar de se apresentarem particularmente susceptíveis à exposição a efluentes municipais. Assim, níveis elevados de ALP reflectem a exposição a compostos disruptores endócrinos, principalmente se determinados em machos e/ou fêmeas em período de pós-desova, tal como se verificou no presente trabalho.

4.2. Variação espacial de ALP em *M. galloprovincialis*

À luz do que foi anteriormente referido, e assumindo estados de maturação semelhantes entre os mexilhões dos diferentes locais em estudo, a comparação entre as concentrações de ALP observadas nos indivíduos de cada local poderá indicar onde se fará sentir maior influência de compostos disruptores endócrinos.

Neste trabalho verificou-se que, globalmente para os quatro períodos de amostragem, as concentrações de ALP encontradas em Sagres, Portimão e VRSA foram significativamente mais elevadas que nos restantes locais, sendo significativamente mais baixas em Lagos, Faro e Tavira ($p < 0,05$). Mas, se por um lado o facto das concentrações de ALP serem extremas naqueles locais já é em si um indicativo do diferente grau de exposição a substâncias xenoestrogénicas, por outro é necessário analisar as diferenças de concentração de ALP entre as fêmeas e machos, bem como quaisquer alterações que existam nos estádios de maturação, para poder retirar relações mais conclusivas.

Assim, relativamente aos locais onde globalmente se observaram os maiores valores de ALP (Sagres, Portimão e VRSA), os mexilhões encontravam-se em estádios de maturação idênticos, em cada período de amostragem. No Verão de 2005 e Inverno de 2006, não se verificaram diferenças de concentração de ALP entre fêmeas e machos dos três locais ($p > 0,05$), o que é consistente com o que se poderia esperar em locais sob maior influência de compostos disruptores endócrinos. Porém, no Verão de 2007, em Portimão e VRSA, as fêmeas obtiveram valores significativamente mais elevados que os machos ($p < 0,05$), ao passo que em Sagres mantiveram concentrações semelhantes entre sexos. Neste local detectou-se ainda uma ocorrência de intersex focal, uma condição inerente à exposição a xenoestrogénicos. Foi também neste período de 2007 que se observaram ligeiras diferenças nos estádios de maturação, com alguns indivíduos de Portimão e VRSA já em fase de

descanso, mas isto não explica o facto de os mexilhões destes locais apresentarem diferenças entre sexos e em Sagres não. Inclusivamente, nesta campanha as concentrações de ALP dos indivíduos de VRSA foram mais elevadas do que as encontradas nos mexilhões de Sagres e Portimão. Portanto, se a fase do ciclo reprodutivo não explica as diferenças, esperar-se-á uma diferente influência espacial de disruptores endócrinos. De facto, no Inverno de 2008 a situação inverteu-se. Em Portimão e VRSA os machos apresentaram concentrações de ALP mais elevadas do que as fêmeas, continuando a manterem-se concentrações semelhantes em Sagres, apesar do estágio de maturação ser semelhante entre mexilhões destes locais.

Constata-se assim que os *M. galloprovincialis* de Sagres, Portimão e VRSA parecem estar mais expostos a compostos xenoestrogénicos. Em Sagres, os mexilhões foram amostrados num pequeno porto piscatório o que, à partida, não faria esperar a maior influência a xenobióticos comparativamente aos outros locais. Contudo, o intenso tráfego marítimo existente nesta região pode ser parcialmente responsável pela entrada de xenobióticos no ecossistema aquático, assim como águas de escorrências inerentes às actividades de um porto piscatório, já que este foi o único local em estudo que correspondia a este tipo de porto. É de considerar também a influência de descargas de águas residuais associadas ao emissário submarino que serve a população da zona (cerca de 2000 habitantes) e que desagua a cerca de 1700 metros ao largo da costa, próximo da praia da Baleeira, em frente ao porto (INSAAR, 2002-2009), bem como as escorrências de zonas agrícolas bastante comuns nas áreas circundantes. Esta região é ainda bastante afectada por ventos e correntes, e é uma área de ocorrência de fenómenos de afloramento costeiro, que podem trazer à superfície contaminantes de níveis mais profundos, ou provenientes de outros locais. Em Portimão e VRSA, os mexilhões foram recolhidos nos estuários de rios, no porto do Arade e na foz do Guadiana, respectivamente. Ecossistemas naturais deste tipo podem estar bastante associados a vários níveis de contaminação, principalmente devido a escorrências de águas pluviais das

zonas próximas ao rio/estuário, que atravessam zonas agrícolas. As águas urbanas das cidades adjacentes também funcionam como fontes de contaminação pelos sistemas de drenagem de águas residuais (tratadas ou não), que recebem os efluentes domésticos e industriais (Bebianno & Machado, 1997; Sabik *et al.*, 2003; Bebianno *et al.*, 2007). O estuário do Guadiana, em particular, está descrito como um dos mais contaminados do país em termos de disruptores endócrinos (Almeida *et al.*, 2007) e onde já se encontraram estádios de intersex em amêijoas *Scrobicularia plana* (Gomes *et al.*, *in press*) em níveis de incidência mais elevados que no estuário do Arade (Gomes *et al.*, dados não publicados).

Em relação aos locais onde globalmente se observaram os menores valores de ALP (Lagos, Faro e Tavira), os mexilhões não se encontraram sempre em estádios de maturação idênticos. No Verão de 2005 não se verificaram diferenças entre as concentrações de ALP nas fêmeas e nos machos dos três locais, mas nesta campanha os indivíduos de Lagos e Faro estavam em fase de reabsorção dos folículos, enquanto os de Tavira já estavam em descanso, isto é, em fase mais avançada. Uma vez que neste estádio os níveis de Vtg são residuais (Matozzo & Marin, 2007), a não existência de diferenças significativas entre sexos pode assim ser justificada, pelo menos neste local, representando valores “basais” de ALP ($\approx 30 - 40 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$). No Inverno de 2006, a fase do ciclo sexual foi a mesma nos mexilhões dos três locais (reabsorção/restauro), e as fêmeas apresentaram concentrações de ALP significativamente mais elevadas do que os machos, o que está de acordo com a situação típica da Vtg ser característica das fêmeas. No Verão de 2007, as fêmeas mantiveram valores de ALP mais elevados que os machos em Faro (mexilhões em fase de libertação dos gâmetas), tal como em Tavira (mexilhões em fase de reabsorção/restauro), mas em Lagos as concentrações foram idênticas para os dois sexos, estando os mexilhões já no período de descanso. Novamente, os níveis residuais de Vtg neste período de descanso ($\approx 35 - 40 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) explicam a inexistência de diferenças significativas entre sexos. No

Inverno de 2008, apenas em Tavira os mexilhões mantiveram valores de ALP mais elevados nas fêmeas do que nos machos. Em Faro, os mexilhões apresentaram concentrações de ALP semelhantes entre sexos e em Lagos os machos tiveram valores mais elevados. No entanto, os estados de maturação foram idênticos nos indivíduos dos três locais (libertação de gâmetas e reabsorção/restauro), pelo que não é a fase do ciclo reprodutivo que pode explicar estas diferenças na síntese de Vtg.

Por um lado, os estádios de maturação nos *M. galloprovincialis* explicam algumas das diferenças encontradas nestes locais com menores concentrações de ALP e apoiam o facto de em Lagos, Faro e Tavira os organismos parecerem estar sobre menor influência de compostos disruptores endócrinos. Por outro lado, existem situações mais difíceis de explicar para estes mesmos locais, como a inexistência de diferenças de concentração de ALP entre sexos em Faro e Lagos em 2005 e Faro em 2008, valores mais elevados nos machos do que nas fêmeas em Lagos em 2008, e ainda as maiores concentrações encontradas em Tavira em 2007, em ambos os sexos (apesar de manter diferenças entre eles). Assim, pelo menos nestes locais e para estas campanhas, há que considerar a possibilidade de influência de substâncias xenoestrogénicas.

Por outro lado, nesta avaliação da presença de compostos disruptores endócrinos nos locais em estudo, há ainda que considerar que as alterações observadas entre as concentrações de ALP determinadas nos *M. galloprovincialis* podem também estar relacionadas com as propriedades anti-estrogénicas de certos contaminantes. Estes compostos podem atrasar ou impedir a vitelogenese, induzindo menores níveis de ALP (Blaise *et al.*, 1999). A presença deste tipo de substâncias poderá ajudar a explicar situações como a falta de diferenças entre as (baixas) concentrações de ALP nos dois sexos em Faro e Lagos em 2005, e Faro em 2008, podendo indicar que, nos locais sob menor influência de disruptores endócrinos, a contaminação antropogénica não deixa de existir. Da bibliografia consultada, compostos

como o metal cádmio (Blaise et al., 1999), petróleo do Mar do Norte (NSO) e PAHs (Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005), e efluentes industriais (Gagné & Blaise, 1998) induziram efeitos anti-estrogénicos em *M. arenaria*, *M. edulis* e hepatócitos de truta *Oncorhynchus mykiss*, respectivamente, reduzindo as suas concentrações de ALP. Contudo, estes resultados não são conclusivos pois Aarab et al. (2004) constataram o oposto, também em *M. edulis* expostos a NSO, medindo concentrações mais elevadas de ALP. Ainda assim, a possibilidade de influência anti-estrogénica de alguns compostos pode limitar a resposta de um biomarcador de disrupção endócrina como o ALP.

Quanto à estação da praia da Figueira, os *M. galloprovincialis* foram amostrados no Verão de 2007 e Inverno de 2008 como tentativa de encontrar um local com fraca influência de contaminação antropogénica. Verificou-se que os mexilhões só apresentaram concentrações de ALP significativamente mais baixas que os da estação de Sagres, além das concentrações entre sexos terem sido muito semelhantes. Assim sendo, não se pode considerar que os indivíduos deste local não estivessem sujeitos à influência de compostos xenoestrogénicos. Neste local da Figueira, apesar da baixa densidade populacional e acção antropogénica na zona, existe uma pequena ribeira que desagua na praia e que, a cerca de 1km a montante, recebe o efluente de uma pequena ETAR (com tratamento secundário, que serve 400 habitantes) (INSAAR, 2002-2009). No entanto, o efeito de diluição e a distância da zona em que os mexilhões foram amostrados da foz da ribeira (cerca de 600m) fazem supor uma menor influência deste efluente nos resultados obtidos. É também de considerar a contribuição de escorrências dos terrenos agrícolas adjacentes, bem como campos de golfe na região, para a presença de disruptores endócrinos no local que se esperava com menos impacte antropogénico. Na realidade, actualmente é bastante difícil encontrar zonas costeiras no sul de Portugal onde não haja influência deste tipo de contaminação.

É de referir que Matozzo & Marin (2005) registaram a mesma situação em que *T. philippinarum* de um suposto local de referência apresentou níveis mais elevados de proteínas do tipo-Vtg do que se esperaria, considerando então que as amêijoas tinham estado expostas a estrogénicos no seu ambiente natural.

Outros factores podem também estar associados às alterações observadas entre as concentrações de ALP determinadas nos *M. galloprovincialis* dos locais em estudo. Esta resposta à exposição a compostos xenoestrogénicos pode ser influenciada por factores ambientais, biológicos e metabólicos, ou seja, relacionados com parâmetros abióticos como a temperatura e salinidade, a condição fisiológica do organismo, disponibilidade de alimento, efeito dos contaminantes, etc. (Honkoop *et al.*, 2003; Bocchetti & Regoli, 2006; Almeida *et al.*, 2007 ; Fuentes *et al.*, 2009).

Temperaturas mais elevadas e maior disponibilidade de alimento podem influenciar o ciclo reprodutivo no sentido de uma maturação sexual mais avançada (Villalba, 1995; Caceres-Martinez & Figueras, 1998; Kopp *et al.*, 2005; Moschino & Marin, 2006). Neste estudo, porém, o ciclo reprodutivo por si só não explicou as diferenças encontradas entre as concentrações mais elevadas e mais baixas de ALP nos mexilhões dos vários locais. Ajudou, sim, a reiterar as observações efectuadas, principalmente nos locais com menor influência de disruptores endócrinos. Este biomarcador, quando analisado pela CCA aplicada ao conjunto total de dados (Fig. 18), não se associou aos parâmetros abióticos, o que sugere que estes factores não foram preponderantes nos resultados obtidos.

A condição fisiológica dos organismos também pode ser um elemento importante a ter em consideração, pois representa o estado nutricional do organismo e o seu decréscimo pode reflectir situações de stress (Moschino & Marin, 2006; Matozzo & Marin, 2007). Além disso, durante o período de reprodução, os mexilhões perdem uma parte considerável das suas reservas e na fase de desova encontram-se com um fraco índice fisiológico (Kopp *et al.*, 2005;

FAO 2005-2009). Neste trabalho, o estado fisiológico dos mexilhões (dada pelo Índice de Condição, IC) parece ter tido influência na sua resposta em termos da concentração das proteínas do tipo-Vtg. O IC aumentou inversamente com o ALP, principalmente com o das fêmeas, tal como se constatou na análise PCA aplicada ao conjunto total de dados (Fig. 19) e pela correlação negativa encontrada. Mas se um menor IC se verifica em estádios de pós-desova, e nesta fase do ciclo reprodutivo os níveis de Vtg deveriam ser residuais, então a relação inversa encontrada entre o IC e o ALP não é típica de situações “normais”. Gagné *et al.* (2003), Quinn *et al.* (2006) e Gagnaire *et al.* (2009) constataram que fracas condições fisiológicas resultaram da exposição prolongada dos organismos a contaminantes, mas as respostas a nível da indução da síntese de Vtg também enfraqueceram. Porém, em dois destes trabalhos (Quinn *et al.*, 2006; Gagnaire *et al.*, 2009), a exposição ocorreu em condições laboratoriais, pelo que os autores consideraram que o baixo IC poderia resultar de carência nutricional, já que as gónadas são o tecido alvo onde o organismo vai buscar reservas energéticas. Assim, as maiores concentrações de ALP e menores valores de IC verificados no presente trabalho podem ser indicativas de exposição a contaminantes xenoestrogénicos, e esta situação é mais aparente em Sagres e VRSA (Fig. 19). Contudo, o IC dos mexilhões não apresentou grandes flutuações entre locais e a relação inversa entre o ALP e o IC só foi confirmado para as fêmeas.

Outro elemento a ter em consideração quando se observam índices fisiológicos mais baixos é a incidência de parasitismo, pois os parasitas alimentam-se das reservas energéticas (portanto, das gónadas) dos hospedeiros (Villalba *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001; Cochôa & Magalhães, 2008). Inclusivamente, Rayyan & Chintiroglou (2003) apontam para uma possível relação entre taxas de parasitismo maiores em zonas mais contaminadas. De facto, os mexilhões de Sagres foram os mais afectados neste aspecto, apresentando maior incidência de alterações nos tecidos das gónadas, provocadas por parasitas (*Bucephalus sp.*, *Steinhausia mytilovum*,

parasitas tremátodes e outros não identificados). Portimão foi outro dos locais em que os indivíduos se encontraram parasitados (*Steinhausia mytilovum* e inclusões procarióticas). O parasitismo destes locais parece confirmar a maior preponderância para infecções parasitárias em locais sob maior influência de contaminantes em associação a um menor IC, pelo menos em Sagres. No entanto, em Tavira e Lagos também se encontraram indivíduos parasitados (*Steinhausia mytilovum* e inclusões procarióticas), e nem por isso apresentaram menores valores de IC.

O *stress* induzido nos organismos expostos a xenobióticos também pode ter efeitos mensuráveis noutra tipo de respostas. Neste contexto, a peroxidação lipídica LPO, que não tem resposta específica a nenhuma substância tóxica em particular, pode contribuir para elucidar a influência de contaminação antropogénica. Neste estudo, as concentrações de LPO foram mais elevadas em Olhão e VRSA, e mais baixas em Lagos e Tavira. VRSA foi um dos locais em que se considerou maior exposição a compostos xenoestrogénicos pela indução da síntese de Vtg, e Olhão sobressaiu pelas elevadas concentrações de ALP nas fêmeas (em 2005/2006), ainda que não se tenha considerado entre os sítios mais afectados. Lagos e Tavira foram locais considerados como menos contaminados por aquelas substâncias, também confirmado pelo LPO. Porém, há que referir que não se observou nenhuma correlação directa entre os dois biomarcadores (secção 3.6.1), nem associação destes nas análises estatísticas de CCA e PCA (Fig. 18 e 19), de modo que se deverá assumir que os compostos que estão a causar peroxidação lipídica por acção oxidante podem não ser responsáveis por provocar alterações endócrinas.

Ainda no contexto da variação espacial da concentração de ALP, resta referir que os locais onde se encontraram as maiores e menores concentrações de ALP foram os mesmos para fêmeas e machos (confirmado por uma correlação positiva), significando que ocorreram respostas idênticas deste biomarcador em relação aos dois sexos. Tal como neste trabalho,

Matozzo & Marin (2007) também constataram que as concentrações de ALP em *T. philippinarum* apresentaram variações espaciais idênticas entre fêmeas e machos.

Apesar da evidente relação, em termos espaciais, nas concentrações de ALP entre os dois sexos, destaca-se a maior amplitude de variação nos valores máximos para os machos, mas menor nos valores mínimos, enquanto o oposto se verificou nas fêmeas (maior semelhança entre os valores máximos e maior variação entre os mínimos; ver Tabela I). Este resultado pode ser um efeito da maior susceptibilidade dos machos aos compostos xenoestrogénicos presentes no meio aquático da costa sul de Portugal.

Em resumo, conforme se expôs e tendo como base a indução da síntese de Vtg, constatou-se que os *M. galloprovincialis* de Sagres, Portimão e VRSA parecem estar mais expostos a compostos xenoestrogénicos, enquanto em Lagos, Faro e Tavira os organismos estavam sobre menor influência destas substâncias. Contudo, deve-se ressaltar que a diferença entre máximos e mínimos (absolutos) das concentrações de ALP nos indivíduos analisados não foi superior a três vezes ($\approx 30 - 95 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), o que sugere que o gradiente de variação espacial de DE, observado entre os locais da costa sul de Portugal, pode não ser muito acentuado.

Na realidade, a interpretação dos resultados e dos efeitos de compostos (anti)estrogénicos em bivalves representa um trabalho complexo devido ao limitado conhecimento que se tem do funcionamento sistema endócrino dos moluscos, das diferenças inerentes a um grande número de espécies, e dos mecanismos de acção das hormonas naturais (Jobling *et al.*, 2003; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Canesi *et al.*, 2007; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009). Alia-se ainda a complexidade da interacção entre os compostos presentes no meio aquático em misturas complexas, que podem ter efeitos directos, induzindo a síntese de Vtg nos indivíduos, podem actuar mais em particular num dos sexos, ou podem ainda apresentar efeitos anti-estrogénicos inibindo a resposta dos organismos.

4.3. Variação temporal de ALP em *M. galloprovincialis*

No decorrer deste estudo, a ideia da comparação entre as situações de Verão e de Inverno baseou-se na maior influência antropogénica no Verão. A zona costeira do sul de Portugal é particularmente importante em termos de turismo e o período estival está associado a um maior afluxo turístico à região, altura em que a população pode aumentar até dez vezes relativamente ao resto do ano. Consequentemente, nesta época do ano os ecossistemas aquáticos costeiros estão sujeitos a uma maior pressão e impacto antropogénicos, comparativamente ao Inverno, situação a que se aliam por vezes ineficiências do tratamento de efluentes nas ETARs face a este aumento populacional (Bebiano, 1995; Bebianno & Machado, 1997; Bebianno *et al.*, 2007).

No entanto, de entre as quatro campanhas, foi no Inverno de 2006 que se observaram as concentrações significativamente mais elevadas de ALP, enquanto no Verão de 2007 foi onde estas foram mais baixas, à excepção de Tavira. Apesar de serem esperadas maiores concentrações de ALP nos mexilhões amostrados nos Verões, este resultado pode estar relacionado com as escorrências de compostos xenoestrogénicos durante o período das chuvas nos Invernos. Estas acarretam grandes entradas de água doce e maior volume de descargas do efluente das ETARs introduzindo, portanto, contaminação significativa no meio aquático com potencial para induzir disrupção endócrina. No entanto, entre Invernos não houve evidência de diferenças na precipitação e/ou nos caudais dos rios e estuários, como o do Arade, Ria Formosa e Guadiana (SNIRH, 1995-2009), que possam justificar a diferente gama de concentrações de ALP encontrada nos dois invernos e os maiores valores em 2006.

Mais uma vez, uma análise do estado de maturação dos indivíduos pode ajudar a explicar as diferenças encontradas. De um modo geral, os mexilhões amostrados no Verão apresentaram as gónadas em estádios de pós-desova (reabsorção e/ou restauro de gâmetas), muitas vezes já

a entrar em estado de repouso, principalmente no Verão de 2007. Este Verão coincidiu com o período onde a indução da síntese de Vtg foi menor, o que está de acordo com o facto de, nas fases de pós-desova, os níveis de Vtg serem residuais. Confirma-se assim que este período foi o que esteve sob menor influência de compostos disruptores endócrinos, resultado apoiado pela observação de que, neste Verão, existiu um maior número de locais com fêmeas a apresentarem concentrações significativamente mais elevadas de ALP do que os machos (em Portimão, Vilamoura, Faro, Tavira e VRSA). Nos Invernos ainda se encontraram mexilhões em fase de desova (estádio de libertação de gâmetas), principalmente nos machos no Inverno de 2008. Esta última campanha foi também onde se encontraram machos com valores de ALP significativamente superiores às fêmeas em três locais (Lagos, Portimão e VRSA) e, de facto, na análise de PCA aplicada ao conjunto total de valores de ALP (Fig. 7) verifica-se que os locais mais associados aos machos pertencem a este Inverno.

Talvez o facto de, nos Invernos, os *M. galloprovincialis* se encontrarem em estádios de libertação de gâmetas, e portanto estádios de maturação mais atrasados comparativamente aos Verões, possa ter contribuído para maiores concentrações de ALP (como em 2006). No entanto, esta situação seria mais aplicável às fêmeas, uma vez que nos machos os níveis de Vtg deveriam ser baixos, mesmo nas alturas da maturação sexual. No Inverno de 2006, ambos os sexos apresentam concentrações mais elevadas de ALP, e principalmente nos locais já referidos como estando mais expostos a compostos xenoestrogénicos (Sagres, Portimão e VRSA). Por outro lado, no último Inverno (2008), os machos estavam maioritariamente em fase de libertação de gâmetas, enquanto as fêmeas já se encontravam em pós-desova, o que poderia ter levado a não se determinarem diferenças nas concentrações de ALP entre sexos, uma vez que os níveis de Vtg nas fêmeas já estariam mais baixos. Mas esta inexistência de diferenças entre sexos também se verificou no Verão de 2005, e neste caso os mexilhões encontravam-se todos em pós-desova. Além disso, o facto dos machos apresentarem valores

mais elevados do que as fêmeas é indicativo de exposição a xenoestrogénicos e, assim, a situação neste Inverno de 2008 não pode ser explicada com base no estágio de pós-desova das fêmeas.

Uma observação curiosa foi a de que, neste Inverno de 2008, as fêmeas de todos os locais apresentaram fenómenos de atresia (degeneração oocitária), mas nas restantes campanhas essa condição só se verificou em um ou dois locais. Este fenómeno parece ser frequente em moluscos bivalves mas não há conhecimento do seu significado fisiológico. Pode estar relacionado com a capacidade limitada do folículo em manter as células germinais; com processos de reabsorção no final do ciclo gametogénico ou falta de condições favoráveis à desova; ou até mesmo com situações de *stress* ambiental, por *deficit* nutricional ou mesmo exposição a contaminação (Suarez *et al.*, 2005). Alguns autores como Aarab *et al.* (2004, 2006) e Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville (2005) confirmaram esta última hipótese ao encontrar maior prevalência de atresia em mexilhões expostos a compostos como o petróleo do Mar do Norte (NSO), alquilfenóis e PAHs. Isto parece contribuir para a ideia de que o Inverno de 2008 poderá ter sido problemático em termos de exposição dos mexilhões a xenobióticos.

De notar ainda que o estado fisiológico dos *M. galloprovincialis* apresentou-se de um modo geral mais elevado nos Verões do que nos Invernos, o que novamente se refere como inconsistente com o estágio de pós-desova em que os mexilhões se encontravam na época estival. Porém, o Verão é caracteristicamente um período de maior disponibilidade de alimento na costa sul de Portugal, e como tal o IC dos indivíduos deve ser maior nesta altura, ainda que em fase posterior à libertação dos gâmetas. No entanto, no Verão de 2007 verificaram-se mais locais com incidência de parasitismo nos indivíduos amostrados (Sagres, Portimão, Tavira, Olhão e VRSA), o que poderá estar associado a locais mais contaminados, onde se encontraram maiores concentrações de ALP.

Os parâmetros abióticos, temperatura e salinidade, também apresentaram diferenças entre as situações de Verão e de Inverno, tal como pode ser observado na análise CCA (Fig.18), em que influenciaram claramente a separação entre as duas estações do ano. Esta separação deve-se à grande amplitude da variação destes dois factores ambientais, com valores mais elevados no Verão e mais baixos no Inverno, não estando necessariamente associados ao biomarcador de disrupção endócrina, como já foi referido.

É de salientar também que, de um modo geral, os mexilhões amostrados nas campanhas de 2005/2006 apresentaram concentrações de ALP mais elevadas do que os de 2007/2008. Na análise de PCA aplicada ao conjunto total de valores de ALP (Fig. 7) é, de facto, possível distinguir um agrupamento de maior número de locais amostrados no período 2007/2008 associados a concentrações mais baixas. O biomarcador de *stress* oxidativo, LPO, também apresentou esta tendência de maiores concentrações nas campanhas de 2005/2006, corroborando mais uma vez os resultados obtidos para a indução da síntese da Vtg. No entanto, pela análise de CCA (Fig.18), denotou-se que a LPO estava ligeiramente associada ao Verão, principalmente devido aos elevados valores encontrados nesta estação em 2005, além de se ter estabelecido uma relação inversa (correlação negativa, secção 3.6.1) entre este biomarcador e os valores de ALP nos machos nesta campanha. Novamente se reitera que os compostos de acção oxidante podem não ser os mesmos responsáveis por disrupção endócrina.

Sazonalmente, e tal como constatado quando se analisaram as concentrações de ALP entre os locais em estudo, a resposta do biomarcador de indução da Vtg foi idêntica nos dois sexos. Notou-se, sim, alguma variabilidade espacial entre as quatro campanhas, com algumas variações nos locais em que os *M. galloprovincialis* apresentam as maiores ou menores concentrações de ALP. O exemplo mais evidente foi o de Tavira, um dos locais que este trabalho constatou como estando sob menor influência de xenoestrogénicos e que, no Verão

de 2007, apresenta dos valores mais elevados de ALP. Situações como esta podem estar relacionadas com fontes pontuais de contaminação, mas não deixam de sugerir a influência de variabilidade inter-anual possivelmente associada ao ciclo reprodutivo. Autores como Blaise *et al.* (1999) constataram que, apesar da resposta do ALP à influência de compostos xenoestrogénicos, as concentrações de ALP em *M. arenaria* variavam ao longo do tempo, com maiores valores nas amêijoas amostradas no período reprodutivo e, juntamente com estudos do ciclo reprodutivo, indicavam que a resposta do ALP também variava com o estado de maturação. Outros autores apontam ainda para uma maior susceptibilidade de determinados estádios gametogénicos, que se podem reflectir no desenvolvimento das gónadas (Quinn *et al.*, 2004; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005).

Dependendo do estado reprodutivo, período do ano, disponibilidade de alimento, entre vários outros factores, a resposta de um biomarcador pode flutuar ao longo do ano, podendo esta variabilidade fazer naturalmente parte do ciclo fisiológico dos organismos (Sheehan & Power, 1999; Viarengo *et al.*, 2007). Assim, torna-se necessária uma maior frequência de amostragem ao longo do ano, e num período de tempo mais longo (cerca de cinco anos), para poder interpretar ocorrências destas à luz dos estados de maturação e mesmo do ciclo de vida dos organismos em estudo.

4.4. Variação sazonal de ALP em *M. galloprovincialis* de VRSA

O local de amostragem de VRSA, na foz do estuário do Guadiana, foi um dos locais onde se considerou a maior exposição dos *M. galloprovincialis* à influência de compostos disruptores endócrinos, não só pelas concentrações de ALP mais elevadas entre locais, como também pela ausência de diferenças significativas entre sexos em três das quatro campanhas e,

inclusivamente, valores significativamente mais elevados nos machos do que nas fêmeas, no Inverno de 2008. Como já foi referido, o estuário do Guadiana foi apontado por alguns autores como estando sob elevada contaminação por compostos xenoestrogénicos associados essencialmente a escorrências (actividades agrícolas e pecuária) e águas residuais (efluentes domésticos e industriais), particularmente não tratadas. Por este motivo, incluíram-se mais dois períodos de amostragem (Outono em 2006 e Primavera de 2007) para se avaliar melhor a variação sazonal de ALP nos mexilhões de VRSA.

Comparando os valores de ALP em ambos os sexos verificou-se que, de um modo geral, as fêmeas de *M. galloprovincialis* apresentaram valores de ALP mais elevados do que os machos, como esperado. No entanto, a significância desta diferença só existiu para o Verão de 2007; no Outono de 2006 e Inverno de 2008, os machos apresentaram inclusivamente valores de ALP significativamente mais elevados que as fêmeas ($p < 0,05$), o que indica a indução da síntese de Vtg e, conseqüentemente, a exposição a compostos de disrupção endócrina.

Na análise sazonal deste local, verificou-se que ambos os sexos apresentaram um aumento das concentrações de ALP desde o Verão de 2005 até ao Outono de 2006, quando se mediram valores mais elevados (máximos nos machos). Na Primavera de 2007 verificou-se uma descida acentuada, determinando-se as concentrações mais baixas, que podem estar associadas a um período de repouso no ciclo reprodutivo. Estes valores podem mesmo representar os níveis basais de vitelogeninas nos mexilhões *M. galloprovincialis* ($\approx 40 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$), o que explicaria a semelhança nas concentrações entre fêmeas e machos, dado que ambos estariam em fase de ausência de síntese desta proteína. Estes valores não são muito diferentes dos encontrados por Pampanin *et al.* (2005) em Veneza, Itália, no final do Inverno, altura em que os *M. galloprovincialis* ainda não se encontravam no ciclo reprodutivo ($\approx 55 - 75 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Então, a descida das concentrações de ALP constatada

no actual trabalho, em relação à Primavera, pode também indicar uma menor influência de contaminantes.

No Verão de 2007 observa-se um novo aumento das concentrações (máximas nas fêmeas), decrescendo no Inverno seguinte (2008) no caso das fêmeas, enquanto para os machos os valores de ALP continuaram a subir. As concentrações mais elevadas observadas no Verão e Outono parecem ser indicativas de um auge da maturação sexual, ao passo que o desfasamento no Inverno de 2008 parece sugerir uma ligeira dessincronia entre os ciclos de maturação dos dois sexos. Alguns autores (Aarab *et al.*, 2004; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Ketata *et al.*, 2008) referem a possibilidade de um atraso da espermatogénese dever-se ao efeito de determinados contaminantes DE a nível do ciclo reprodutivo dos mexilhões.

Estudos sobre o ciclo reprodutivo de *M. galloprovincialis* indicam que este varia grandemente de acordo com a região geográfica, sendo caracterizado por uma ou duas épocas de desova num ano, seguidos de um período de repouso mais ou menos longo (Gangnery *et al.*, 2004). No Estuário de Vigo (noroeste de Espanha) e Sul de África, foram observadas populações com dois períodos de desova, enquanto no delta do Rio Pó (nordeste de Itália), Lagoa de Thau (Sète, sul de França) e em algumas baías da Galiza (noroeste de Espanha), foi descrito apenas um período (Cáceres-Martinez & Figueras, 1998; Van Erkom Schurink & Griffiths, 1991; Ceccherelli & Barboni, 1983; David *et al.*, 2008; Villalba, 1995, respectivamente). Segundo Cáceres-Martinez & Figueras (1998), no estuário de Vigo a gametogénese ocorre no Outono/Inverno e a desova na Primavera, seguida de um período curto de repouso e nova maturação sexual no Verão, culminando com a libertação dos gâmetas no Verão/Outono. Contudo, para outras populações de mexilhões das baías da Galiza (Villalba, 1995) e do sul de França (Gangnery *et al.*, 2004; David *et al.*, 2008), a progressão da gametogénese parece decorrer durante o Outono, com a maturação no Inverno e a desova em dois picos, na Primavera e Verão. Por outro lado, Suarez *et al.* (2005) consideram que o desenvolvimento

gametogénico nos *Mytilus* é um processo dinâmico e contínuo, com processos rápidos e intensos no Verão que causam desovas massivas, ao contrário dos de Inverno.

A evolução sazonal das concentrações de ALP nos mexilhões de VRSA, com valores mais elevados no Verão/Outono e mais baixos na Primavera, poderia ser interpretada como fazendo parte de um ciclo reprodutivo com apenas uma fase de desova entre o final do Verão e o do Inverno, mas a interpretação de Suarez *et al.* (2005) de um processo contínuo parece adequar-se melhor. De facto, no estudo de variação temporal entre Verão e Inverno, os indivíduos encontram-se na sua maioria em fases quase idênticas de desova e pós-desova. Os padrões temporais de desenvolvimento das gónadas desta espécie de mexilhão na costa sul de Portugal devem-se à interação entre factores endógenos e exógenos, podendo variar bastante entre anos, consoante a área geográfica, entre áreas geográficas adjacentes, e até mesmo entre populações de uma mesma área, tal como referido por outros autores (Villalba, 1995; Cáceres-Martinez & Figueras, 1998; Suarez et al 2005).

Conforme se expôs, as situações de Outono – Inverno aparentam ser mais problemáticas, não só em termos de concentrações de ALP mais elevadas, como também pela falta de diferenças entre sexos e até machos com valores mais elevados do que as fêmeas. Isto poderá também dever-se à ligeira dessincronia na maturação sexual, mais atrasada nos machos, conduzindo a maiores concentrações de ALP antes da desova. A situação observada no Outono pode também reflectir um maior impacto antropogénico associado ao final do Verão, e as situações de Inverno podem estar associadas a chuvas e consequentes escorrências que transportam maiores caudais com xenobióticos para os ambientes aquáticos. No estuário do Guadiana, Almeida *et al.* (2007) identificaram contaminantes reconhecidos enquanto disruptores endócrinos, como pesticidas (atrazina, cloroacetanilida), agentes anti-vegetativos (diuron, TBT, DBT), plastificantes (bisfenol A) e hidrocarbonetos (PAHs, fenantreno). Estes autores associam a ocorrência de pesticidas às actividades agrícolas típicas e comuns nas áreas

adjacentes ao estuário, contribuindo para isso toda a agricultura na vizinhança da bacia hidrológica do Guadiana, ao longo deste rio internacional. Em relação aos compostos organoestânicos, Almeida *et al.* (2007) referem uma proveniência relacionada com a utilização de tintas antivegetativas, muito comum até 2003, altura em que foram banidos, mas que têm um elevado tempo de residência no meio marinho.

4.5. Análise comparativa da concentração de ALP com contaminantes

Estando as duas primeiras campanhas de Verão/Inverno inseridas no Projecto BIHOTA, foi possível ter acesso a dados de concentrações de determinados contaminantes, como metais e PAHs, descritos como tendo efeitos de disrupção endócrina nos organismos aquáticos, relativos ao Verão de 2005. Assim, procurou-se estabelecer uma relação entre as suas concentrações e os teores de ALP determinados nos *M. galloprovincialis*.

A análise CCA (Fig. 20), no Verão de 2005, não associou as concentrações de ALP nas fêmeas e nos machos deste Verão a nenhum dos contaminantes testados. Porém, destacou-se o local de Olhão, associado a concentrações mais elevadas de PAHs, onde os valores de ALP também foram elevados nas fêmeas, e Sagres, pelas concentrações relativamente mais elevadas de Cd e onde os teores de ALP também foram maiores.

Em VRSA detectaram-se as maiores concentrações de metais e uma das maiores de PAHs, confirmando a contaminação antropogénica no estuário do Guadiana. No entanto, nesta campanha, não foi aqui que se encontraram maiores valores de ALP, apesar de os de LPO terem sido máximos. Mais uma vez se constata que os compostos que poderão causar oxidação lipídica das membranas não terão capacidades disruptivas, e vice-versa. Lagos destacou-se pelas mais baixas concentrações de contaminantes, bem como mais baixas

concentrações de ALP e LPO, e elevado IC, o que sugere que este local, no Verão de 2005, foi um dos menos afectados a nível de compostos xenobióticos.

É de salientar ainda que o IC e a salinidade variaram inversamente com as concentrações dos contaminantes (Fig. 20), o que pode significar que as maiores entradas de água doce estão a contribuir para o aumento dos níveis de contaminantes, associados às zonas mais estuarinas, como Portimão e VRSA, o que veio influenciar negativamente o estado fisiológico dos organismos.

Bebiano & Machado (1997) encontraram maiores concentrações de metais em *M. galloprovincialis* de áreas directamente influenciadas por entradas de águas doces, incluindo os estuários do Arade e do Guadiana, apesar das maiores concentrações de cádmio em Sagres. Díez *et al.* (2005) também mediram teores elevados de compostos organoestânicos no Arade. Estes locais parecem assim confirmar que são dos mais expostos a disruptores endócrinos.

Estes níveis encontrados quer de metais, quer de PAHS, podem não ser suficientes para poder contribuir decisivamente para as alterações endócrinas observadas; contudo, há um vasto conjunto de outros contaminantes existentes no meio aquático sob a forma de misturas complexas que não foram determinados e que podem também ser significativos para a variação espaço-temporal observada (como os encontrados por Díez *et al.*, 2005 e Almeida *et al.*, 2007).

De entre os compostos xenoestrogénicos, o estradiol (E2) é o estrogénio natural mais potente e biologicamente activo. Os seus derivados sintéticos são actualmente muito utilizados na medicina humana e na pecuária, pelo que a excreção humana e animal é considerada a principal fonte de estrogénios nos ecossistemas aquáticos (Matozzo *et al.*, 2008). Os níveis de estradiol nos bivalves variam ao longo do ano, exibindo uma variação sazonal associada ao ciclo reprodutivo, uma vez que estão envolvidos na regulação de vários processos reprodutivos, como a vitelogénese, via receptores hormonais (ER) (Matsumoto *et al.*, 1997;

Osada *et al.*, 2003). Vários trabalhos, como os de Gagné *et al.* (2001a, b, 2005), mediram a indução de Vtg nas gónadas de mexilhões *E. complanata* após exposição por injeção de concentrações crescentes de E2, verificando que os teores de ALP aumentavam de modo dependente da dose do contaminante. Num mesmo tipo de estudo, Blaise *et al.* (1999), Gagné *et al.* (2002b) com *M. arenaria*, e Osada *et al.* (2003) com vieiras *Patinopecten yessoensis*, também verificaram o aumento de Vtg após injeção de E2. Por outro lado, autores como Riffeser & Hock (2002) e Puinean *et al.* (2006) não conseguiram demonstrar a indução de níveis significativos de Vtg em mexilhões *M. edulis* expostos a E2. Resultados como estes demonstram a importância do estradiol na regulação da vitelogénese dos moluscos bivalves, além da variação destes mecanismos entre diferentes espécies de bivalves, estando ainda por esclarecer se não existirão outras hormonas parcialmente responsáveis pelo controlo hormonal destes organismos (Osada *et al.*, 2003; Matozzo *et al.*, 2008).

O nonilfenol (NP) é um composto xenobiótico tóxico, classificado como disruptor endócrino (EPA, 1997; EDMAR, 2002) e substância prioritária (Decisão nº 2455/2001/CE da Directiva-Quadro da Água), utilizado na produção de antioxidantes, aditivos lubrificantes e surfactantes, com aplicação em produtos de uso industrial, comercial e doméstico. Dada a sua utilização extensiva, este composto entra no meio aquático em quantidades substanciais, onde se acumula e persiste. Entre os impactos conhecidos incluem-se a feminização de organismos aquáticos, decréscimos na fertilidade dos machos, e até mesmo a morte de juvenis, mesmo em concentrações baixas (Azevedo *et al.*, 2001; Sabik *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009). Trabalhos como o de Blaise *et al.* (1999), Gagné *et al.* (2001b), Matozzo & Marin (2005), Quinn *et al.* (2006) e Ricciardi *et al.* (2008), constataram o aumento das concentrações de ALP após exposição a diferentes teores de NP, em *M. arenaria*, *E. complanata*, *T. philippinarum*, *D. polymorpha* e *M. galloprovincialis*, respectivamente. Contudo, nas amêijoas *T. philippinarum*, os machos apresentaram-se mais susceptíveis por

aumento, enquanto nos mexilhões *D. polymorpha*, foram as fêmeas, tendo-se até observado um efeito de inibição da síntese de Vtg na exposição de *M. galloprovincialis* a concentrações mais elevadas de NP. Assim, a acção estrogénica do NP pode depender da dose de exposição, da diferente sensibilidade de cada sexo, da fase do ciclo reprodutivo, e das repercussões de efeitos tóxicos na condição fisiológica dos organismos.

O bisfenol A (BPA) é um conhecido composto estrogénico capaz de induzir alterações no desenvolvimento sexual dos organismos (EPA, 1997; EDMAR, 2002; Gagnaire *et al.*, 2009). Este plastificante é principalmente utilizado como intermediário e aditivo em plásticos e resinas, pelo que também é descarregado em grandes quantidades nos ambientes aquáticos (Oehlmann *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009). Os efeitos do BPA nos níveis de proteínas do tipo-Vtg descritos na literatura são contraditórios: enquanto Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville (2005) não mediram alterações nas concentrações de Vtg em *M. edulis* expostos a este contaminante, Aarab *et al.* (2006), para a mesma concentração de exposição, verificaram a indução da síntese desta proteína em fêmeas da mesma espécie de mexilhão. Apesar de o BPA provocar disrupção do sistema endócrino dos moluscos, os mecanismos subjacentes a esta disrupção não são ainda conhecidos (Gagnaire *et al.*, 2009).

O TBT é um poderoso agente anti-vegetativo que foi largamente utilizado em embarcações até 2003, e cuja utilização foi proibida na maioria dos países devido à elevada toxicidade e capacidade disruptiva do sistema endócrino dos organismos. Destas, destaca-se o fenómeno de *imposex* em muitas espécies de neogastrópodes, caracterizado pelo desenvolvimento de características sexuais masculinas não funcionais em fêmeas, podendo levar à esterilização e morte das populações (EPA, 1997; EDMAR, 2002; Díez *et al.*, 2005; Gagnaire *et al.*, 2009). Em relação à influência deste contaminante na indução da síntese de Vtg, Gagnaire *et al.* (2009) observaram um aumento dos teores de ALP nos gastrópodes *Valvata piscinalis* e ele expostos, ao contrário de Gagné *et al.* (2003 e 2008) que constataram uma diminuição do

mesmo biomarcador em *M. arenaria* expostas a águas portuárias com TBT, e em *M. edulis* de locais contaminados com compostos estânicos, incluindo TBT. Estes autores apontam para efeitos anti-estrogénicos desta substância, relacionados com o impedimento da síntese de estradiol em bivalves, reflectidos na incapacidade de síntese de Vtg, e obstrução da vitelogénese.

É de referir ainda que Díez *et al.* (2005), num período entre 1999 e 2000, determinaram concentrações elevadas de TBT em *M. galloprovincialis* de Lagos, na costa sul de Portugal, local este em que se mediram concentrações mais baixas de ALP no presente trabalho. Assim, não se pode excluir a influência anti-estrogénica deste contaminante, ou outros, nos mexilhões de Lagos, que se consideraram como menos expostos a compostos disruptores endócrinos. No entanto, o facto de se terem observado menores concentrações de ALP, LPO e contaminantes, bem como um elevado IC nos indivíduos deste local, reforça a ideia de que os mexilhões de Lagos, no presente estudo, estiveram menos afectados em termos de contaminação xenoestrogénica.

As respostas em termos de disrupção endócrina de diferentes espécies de moluscos aos vários contaminantes reflectem um conjunto de interacções entre factores bióticos e abióticos que dificultam a compreensão dos efeitos dos compostos xenoestrogénicos nos organismos. Alia-se ainda a falta de conhecimento da fisiologia endócrina dos bivalves e, principalmente, dos mecanismos de regulação hormonal (Osada *et al.*, 2003; Jobling *et al.*, 2003; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Canesi *et al.*, 2007; Lafont & Mathieu, 2007; Matozzo *et al.*, 2008; Gagnaire *et al.*, 2009). É também necessário conhecer as amplitudes de variação natural dos biomarcadores nas populações que habitam uma determinada área geográfica para ultrapassar as dificuldades inerentes a este tipo de estudos de avaliação da presença e efeitos de determinados contaminantes.

4.6. Comparação com outros estudos

Tem vindo a ser exposto neste estudo o modo como vários trabalhos demonstraram o uso potencial do método do ALP enquanto medição indirecta de compostos xenoestrogénicos em moluscos bivalves. É de salientar que não se encontraram dados referentes ao ALP em gónadas de *M. galloprovincialis*, pelo que este trabalho é inovador para esta espécie. Falta então comparar com esses autores a gama/amplitude de variação das concentrações de ALP em espécies semelhantes de mexilhão (género *Mytilus*: *M. galloprovincialis* e *M. edulis*), quer em ambiente natural, quer em exposição em laboratório, tal como se apresenta na Tabela III, apesar de também se apresentarem dados em tecidos diferentes.

Constata-se que os valores de ALP determinados por outros estudos na mesma espécie, noutros locais, se encontram na mesma gama de variação, tanto para machos ($\approx 30 - 90 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$) como para fêmeas ($\approx 35 - 95 \mu\text{gPO}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$). Apenas a exposição a concentrações elevadas de nonilfenol ($100 \mu\text{g/L}$), valores estes muito superiores aos que se têm detectado nas águas costeiras de Portugal (Azevedo *et al.*, 2001), induziu teores de ALP cerca de três vezes mais elevados, como indicado por Ricciardi *et al.* (2008). De facto, estudos de exposição a xenoestrogénios em laboratório podem induzir maiores concentrações de ALP, relativamente ao que se encontra em meio natural. A espécie *M. edulis*, no entanto, apresenta um intervalo de concentrações superior no caso das fêmeas, ao contrário dos machos, que se manifestam na mesma gama determinada em *M. galloprovincialis*.

A comparação de teores de ALP noutras espécies de bivalves não foi aqui apresentada uma vez que existe uma grande variabilidade inter-específica. Os moluscos são um grupo muito diverso e as suas respostas aos disruptores endócrinos podem variar amplamente, mesmo dentro de um *taxon*, pois envolvem factores anatómicos, fisiológicos e metabólicos,

intrínsecos aos organismos, o que pode originar resultados contraditórios ou inconclusivos (Jobling *et al.*, 2003; Ketata *et al.*, 2008).

Consoante a espécie, um determinado biomarcador poderá responder de maneira diferente a um mesmo contaminante, pode até responder de modo discrepante a diferentes concentrações do mesmo composto, além do facto de cada xenobiótico induzir um tipo de resposta diferente. Adicione-se ainda o facto de, no meio ambiente, os organismos estarem expostos a misturas complexas de contaminantes, o que pode ter influências muito acentuadas nas suas respostas (Schlenk, 1999).

Tabela III – Concentrações de ALP ($\mu\text{gPO}_4\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$) determinadas em tecidos de duas espécies de *Mytilus* (*M. galloprovincialis* e *M. edulis*) expostos a diferentes tipos de contaminação (valores aproximados e intervalos), incluindo o actual estudo. *

Espécie (tecido)	ALP ($\mu\text{gPO}_4\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$)	Exposição aos contaminantes/Local	Autor
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (gónadas)	Figueira ♀ 49 – 53; ♂ 51 – 54 Sagres a VRSA: ♀ 35 – 95; ♂ 28 - 91	Zonas próximas de grandes centros urbanos, em áreas de portos, marinas e estuários, comparativamente a uma praia (Figueira) com menos influência antropogénica.	Presente estudo
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (hemolinfa)	1) Controlo ≈ 75 Locais $\approx 50 - 65$ 2) Controlo ♀ ≈ 40 ; ♂ ≈ 5 Locais ♀ $\approx 40 - 75$; ♂ $\approx 15 - 40$	Área urbana de Veneza (Itália) sob a influência de águas residuais 1) Fevereiro 2) Abril	Pampanin <i>et al.</i> 2005
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (glând digestiva)	Controlo ♀ ≈ 20 ; ♂ ≈ 20 1) ♀ ≈ 25 ; ♂ ≈ 45 2) ♀ ≈ 65 ; ♂ ≈ 80 3) ♀ ≈ 340 ; ♂ ≈ 280 4) ♀ ≈ 70 ; ♂ ≈ 50	Exposição a NP: 1) 25 $\mu\text{g/L}$ 2) 50 $\mu\text{g/L}$ 3) 100 $\mu\text{g/L}$ 4) 200 $\mu\text{g/L}$	Ricciardi <i>et al.</i> , 2008
<i>Mytilus edulis</i> (gónadas)	1) Controlo ♀ ≈ 200 ; ♂ ≈ 35 NSO ♀ ≈ 100 ; ♂ ≈ 35 MIX ♀ ≈ 275 ; ♂ ≈ 65 2) Controlo ♀ ≈ 500 ; ♂ ≈ 50 BPA ♀ ≈ 500 ; ♂ ≈ 55	Exposição laboratorial a: 1) NSO e MIX (NSO, alquilfenóis e PAHs) 2) BPA	Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005
<i>Mytilus edulis</i> (gónadas)	Controlo ♀ ≈ 260 ; ♂ ≈ 20 Locais ♀ $\approx 380 - 460$ ♂ $\approx 10 - 50$	Exposição a um gradiente de Cu, perto de uma mina, em Visnes, Noruega	Zorita <i>et al.</i> 2006
<i>Mytilus edulis</i> (gónadas)	1) Controlo ≈ 220 Locais $\approx 180 - 370$ 2) Controlo ≈ 350 Locais $\approx 500 - 750$ 3) Controlo ≈ 440 Locais $\approx 330 - 3400$ 4) Controlo ≈ 1750 Locais $\approx 1000 - 2200$	Locais sob influência de contaminação antropogénica: 1) Vancouver (Canadá) 2) St. Lawrence (Canadá) 3) Halifax (Canada) 4) Sena (França)	Gagné <i>et al.</i> , 2008

* Utilizaram-se trabalhos cujos resultados foram expressos nas mesmas unidade que o presente estudo.

4.7. Considerações Finais

Este trabalho indica que a determinação das proteínas do tipo-Vtg, pelo método do ALP, pode vir a ser utilizada como potencial indicador de efeitos de exposição a contaminantes xenoestrogénicos em mexilhões *M. galloprovincialis*, pois este biomarcador parece responder à actividade causada por disruptores endócrinos presentes na costa sul de Portugal. A técnica do ALP quantifica indirectamente a quantidade de proteínas do tipo-Vtg e já foi significativamente correlacionada com outras técnicas directas, tornando-o uma alternativa rápida, eficiente e menos dispendiosa. Estes critérios são fundamentais aquando da escolha de biomarcadores como ferramentas em estratégias de avaliação de qualidade ambiental.

A exposição a compostos xenoestrogénicos induz a síntese de Vtg tanto nas fêmeas como nos machos, apesar de, no caso dos machos, esta perturbação ser mais notável, além de poder estar associada a uma maior susceptibilidade ao contaminante. Por outro lado, nas fêmeas, o aumento das concentrações de ALP também pode estar associado ao ciclo reprodutivo, mascarando a indução da síntese de Vtg por parte daqueles compostos. Assim, para garantir que o método do ALP possa ser utilizado como biomarcador fiável de disrupção endócrina em mexilhões (fêmeas e machos), deverá ser acompanhado de análises dos estádios de maturação das gónadas, principalmente quando é medido em alturas de desenvolvimento gametogénico. No ambiente, os animais estão sujeitos a importantes flutuações sazonais que influenciam a sua sensibilidade face a xenoestrogénios ambientais, pelo que é importante que estudos futuros se concentrem nas relações entre a indução da Vtg e o ciclo reprodutivo dos animais, considerando que os níveis de Vtg aumentam normalmente no início da gametogénese, sob estímulo de estrogénios endógenos. Um estudo sazonal detalhado do ciclo reprodutivo de *M. galloprovincialis* na região sul de Portugal que englobasse um período temporal a médio/longo prazo, acompanhado pelas variações das concentrações de ALP inerentes aos diferentes

estádios reprodutivos desta espécie, ajudaria a compreender a variação natural deste biomarcador e permitiria um melhor entendimento da sua resposta na presença de compostos de disrupção endócrina. Por outro lado, estudos específicos dos efeitos de determinados contaminantes também podem explicar a acção destes compostos e elucidar as relações de exposição/ indução da Vtg.

Apesar da grande maioria dos estudos consultados considerarem que a indução da vitelogenina é um bom biomarcador de exposição a compostos estrogénicos, alguns resultados podem ser contraditórios. Um melhor conhecimento do sistema endócrino dos invertebrados urge para que se possam retirar elações mais conclusivas, nomeadamente elucidando os mecanismos de regulação hormonal envolvidos na vitelogénese, na gametogénese e, em última instância, na reprodução. A análise genética, principalmente na região promotora do gene da Vtg nos bivalves, poderia fornecer mais informação na identificação da resposta genética que controla a expressão da Vtg nestes invertebrados.

Os mexilhões dos ecossistemas aquáticos da costa sul de Portugal, em particular os de Sagres e dos estuários do Arade e Guadiana, parecem estar sob um moderado impacto de compostos disruptores endócrinos; Lagos, Faro e Tavira foram locais que se apresentaram como menos influenciados por este tipo de substâncias. No entanto, as concentrações de ALP encontradas nestes locais foram uma ordem de grandeza abaixo dos máximos encontrados noutros locais do mundo considerados contaminados por DE. Contudo, na costa sul de Portugal não é de excluir a possibilidade da contaminação antropogénica vir a exceder a sua capacidade natural para controlar os processos gametogénicos, a diferenciação sexual “normal”, e contribuir para o menor sucesso reprodutivo das populações. Um dos desafios futuros passará por investigar se as alterações provocadas por compostos disruptores endócrinos nas gónadas de mexilhões adultos poderão causar efeitos a nível do sucesso reprodutivo e/ou da fertilidade das espécies, influenciando a produção deste tipo de bivalves e a gestão destes recursos biológicos.

5. Referências Bibliográficas

- Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P.-D., Larsen, B. K., Andersen, O.-K., Narbonne, J.F. 2004. Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Marine Environmental Research* 58, 437 – 441.
- Aarab, N., Lemaire-Gony, S., Unruh, E., Hansen, P. D., Larsen, B. K., Andersen, O. K., Narbonne, J. F. 2006. Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology* 78S, S86 – S92.
- Abel, P. D., 1996. *Water Pollution Biology*. 2nd ed., Taylor & Francis Ltd., London, 286pp.
- Alloway, B. I., Ayres, D. C., 1993. *Chemical Principles of Environmental Pollution*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, 291pp.
- Almeida, C., Serôdio, P., Florêncio, M. H. 2007. New strategies to screen for endocrine-disrupting chemicals in the Portuguese marine environment utilizing large volume injection-capillary gas chromatography – mass spectrometry combined with retention time libraries (LVI – GC – MS – RTL). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 2569 – 2583.
- Álvarez-Muñoz, D., Sáez, M., Blasco, J., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E. 2006. Enzymatic activity of acid and alkaline phosphatase and catalase in *Ruditapes philippinarum* as biomarkers of stress caused by anionic (C₁₁-LAS) and non-ionic (NPEO_{2.8}) surfactants. *Ciencias Marinas* 32(2B), 447 – 455.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Métayer, C. 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 90, 425 – 431.
- Atkinson, S., Atkinson, M., Tarrant, A. M. 2003. Estrogens from Sewage in Coastal Marine Environments. *Environmental Health Perspectives* 111 (4), 531 – 535.
- Azevedo, D. A., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D. 2001. Occurrence of Nonylphenol and Bisphenol-A in Surface Waters from Portugal. *Journal of Brazilian Chemical Society* 12 (4), 532 – 537.
- Bayne, B. L., Widdow, J., Moore, M. N., Salkeld, P., Worrall, C. M., Donkin, P. 1982. Some ecological consequences of the physiological and biochemical effects of petroleum compounds on marine mollusc. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 297, 219 – 239.
- Bebianno, M. J. 1995. Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *The Science of the Total Environment* 171, 107 – 115.

-
- Bebianno, M. J., Machado, L. M. 1997. Concentrations of Metals and Metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the South Coast of Portugal. *Marine Pollution Bulletin* 34 (8), 666 – 671.
 - Bebianno, M. J., G eret, F., Hoarau, P., Serafim, M. A., Coelho, M. R., Gnassia – Barelli, M., Rom eo, M. 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. Review. *Biomarkers* 9 (4-5), 305 – 330.
 - Bebianno, M. J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., Ferreira, A. M. 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Environmental International* 33, 550 – 558.
 - BIHOTA, 2005. (POCTI/CTA/48027-2002) Biomarkers in bivalves from hotspots of contamination in the Algarvian Coast. Primeiro Relat rio de Progresso.
 - Birkett, J. W., Lester, J. N. 2003. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 295pp.
 - Bishop, P. L., 1983. *Marine Pollution and its Control*. McGraw-Hill Inc., New York, 357pp.
 - Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D. 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environmental Toxicology* 14, 455 – 465.
 - Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D., Trottier, S. 2002. Molluscan Shellfish Biomarker Study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. *Environmental Toxicology* 17, 170 – 186.
 - Blaise, C., Gagné, F., Salazar, M., Salazar, S., Trottier, S., Hansen, P.-D. 2003. Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent. *Fresenius Environmental Bulletin* 12, 865 – 870.
 - Blasco, J., Gonzalez-Mazo, Sarasquete, C. 1999. Linear alkylbenzene sulphonates (LAS) and bioaccumulation of heavy metals (Cu and Pb) in *Ruditapes philippinarum*. *Toxicological and Environmental Chemistry* 71, 447 – 456.
 - Bocchetti, R., Regoli, F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913 – 921.
 - Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F. 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology* 89, 257 – 266.

-
- Bradford, M. 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248 – 254.
 - Brouseau, D. J. 1983. Aspects of reproduction of the blue mussel, *Mytilus edulis* (Pelecypoda: Mytilidae) in Long Island Sound. *Fishery Bulletin* 81 (4), 733 – 739.
 - Cáceres-Martinez, J., Figueras, A. 1998. Long-term survey on wild and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) reproductive cycles in the Ria de Vigo (NW Spain). *Aquaculture* 162, 141 – 156.
 - Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247, 295 – 311.
 - Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G., Marcomini, A. 2007. Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies. *Aquatic Toxicology* 81, 36 – 44.
 - Ceccherelli, V. U., Barboni, A. 1983. Growth, survival and yield of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. on fixed suspended culture in a bay of the Po River delta. *Aquaculture* 34, 101 – 114.
 - Chesman, B.S., Langston, W.J. 2006. Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? *Biology Letters* 2 (3), 420 – 422.
 - Clark, R. B., 1997. *Marine Pollution*. 4th ed., Clarendon Press, Oxford, 161pp.
 - Cochôa, A. R., Magalhães, A. R. M. 2008. Perdas de sementes de Mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na Baía norte – Ilha de Santa Catarina/SC. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo* 34 (1), 1 – 10.
 - Colborn, T., Saal, F. S., Soto, A. M. 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives* 101, 378 – 384.
 - Comesaña, A. S., Posada, D., Sanjuan, A. 1998. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in northern Africa. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 223, 271 – 283.
 - Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P. 2000. Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 106 – 121.
 - David, A., Dagnino, S., Pichot, Y., Munaron, D., Escande, A., Casellas, C., Fenet, H., Gomez, E. 2008. Temporal study of estrogenic responses of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) extracts applied to reporter cell lines. *Marine Environmental Research* 66, 105 – 107.

-
- Decisão nº 2455/2001/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2001, que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Directiva 2000/60/CE.
 - Depledge, M. H., Billingham, Z. 1999. Ecological Significance of Endocrine Disruption in Marine Invertebrates. *Marine Pollution Bulletin* 39, 32 – 38.
 - Deudero, S., Box, A., Tejada, S., Tintoré, J. 2009. Stable isotopes and metal contamination in caged marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* (doi:10.1016/j.marpolbul.2009.02.011).
 - Díez, S., Lacorte, S., Vianna, P., Barceló, D., Bayona, J. M. 2005. Survey of organotin compounds in rivers and coastal environments in Portugal 1999-2000. *Environmental Pollution* 136, 525 – 536.
 - Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.-C., Babut, M. Vasseur, P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39 (2), 93 – 110.
 - EC (European Commission) 1999. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. Community Strategy for Endocrine Disrupters a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. COM 706 final. Brussels, 31pp.
 - EDMAR. 2002. Endocrine Disruption in the Marine Environment (EDMAR). Allen, Y. (ed.) *CEFAS Burnham Laboratory*, 67pp.
 - EPA. 1997. Special report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. *Office of Research and Development* EPA/630/R-96/012, Washington D.C, 111pp.
 - Erdelmeier, I.; Gerard-Monnier, D.; Yadan, J. C.; Acudiere, J. 1998. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*. 11, 1184 – 1194
 - Falkenstein, E., Tillman, H.-C., Christ, M., Feuring, M., Wehling, M. 2000. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews* 52, 513 – 555.
 - FAO, 2005-2009 by Figueras, A. In FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis, acedido no dia 15/04/2009.
 - Fent, K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205, 223 – 240.

-
- Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Escriche, I., Serra, J. A. 2009. Comparison of physic-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. *Food Chemistry* 112, 295 – 302.
 - Gagnaire, B.; Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., Dévier, M.-H., Garric, J. 2009. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquatic Toxicology* (doi:10.1016/j.aquatox.2009.01.012).
 - Gagné, F., Blaise, C. 1998. Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 44, 83 – 91.
 - Gagné, F., Blaise, C. 2003. Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 136, 117 – 125.
 - Gagné, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G. I., Sabik, H. 2001 (a). Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution* 115, 97 – 106.
 - Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S., Hansen, P. D. 2001 (b). Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 128, 213 – 225.
 - Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P., Salazar, M. 2002 (a). Biomarker Study of a Municipal Effluent Dispersion Plume in Two Species of Freshwater Mussels. *Environmental Toxicology* 17, 149 – 159.
 - Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S. 2002 (b). Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Marine Environmental Research* 53, 295 – 310.
 - Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S., Viglino, L. 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 134, 189 – 198.
 - Gagné, F., Blaise, C., Hellou, J. 2004. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 138, 33 – 44.
 - Gagné, F., André, C., Blaise, C. 2005. Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 β . *Fresenius Environmental Bulletin* 14 (10), 861 – 866.
-

-
- Gagné, F., Blaise, C., Fournier, M., Hansen, P. D. 2006. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143, 179 – 186.
 - Gagné, F., Burgeot, T., Hellou, J., St-Jean, S., Farcy, É., Blaise, C. 2008. Spatial variations in biomarkers of *Mytilus edulis* mussels at four polluted regions spanning the Northern Hemisphere. *Environmental Research* 107, 201 – 217.
 - Galvão, M. S. N., Henriques, M. B., Pereira, O. M., Marques, H. L. A. 2006. Ciclo Reprodutivo e Infestação Parasitária de Mexilhões *Perna perna*. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo* 32 (1), 59 – 71.
 - Gangnery, A., Bacher, C., Buestel, D. 2004. Application of a population dynamics model to the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, reared in Thau Lagoon (France). *Aquaculture* 229, 289 – 313.
 - Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.-C., Chaudière, J. 1998. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindone with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Resoxidation. *Chemical Research in Toxicology* 11, 1176 – 1183.
 - Gomes, T., Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M. J. Incidence of intersex in male clams *Scrobicularia plana* in the Guadiana Estuary (Portugal). *Ecotoxicology, In Press*.
 - Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L. 1992. Physiological processes and the regulation of production. In Gosling, E. (Ed.) *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Cultures*. Elsevier, Amsterdam, pp171 – 222.
 - Honkoop, P. J. C., Bayne, B. L., Underwood, A. J., Svensson, S. 2003. Appropriate experimental design for transplanting mussels (*Mytilus* sp.) in analyses of environmental stress: an example in Sydney Harbour (Australia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 297, 253 – 268.
 - INSAAR, 2002 – 2009. Inventário Nacional de Sistemas de Abastecimento de Água e de Águas Residuais. INAG – Instituto da Água, IP (http://insaar.inag.pt/index2_noflash.htm, acessado no dia 15/04/2009).
 - Islam, M. S., Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48, 624 – 649.
 - James, M. O., Kleinow, K. 1994. Trophic Transfer of Chemicals in the Aquatic Environment. In Malins, D. C., Ostrander, G. K. (Eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 1 – 35.
-

-
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P., Tyler, C. R. 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 65, 205 – 220.
 - Kennish, J., 2001. *Practical Handbook of Marine Science*. 3rd ed., CCR Press, Boca Raton, 876pp.
 - Ketata, I., Denier, X., Hamza-Chaffai, A., Minier, C. 2008. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147, 261 – 270.
 - Kim, Y., Ashton-Alcox, K.A., Powell, E.N. 2006. Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs: Update. Silver Spring, MD. *NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 27*, 76pp.
 - Kime, D. E., Nash, J. P., Scott, A. P. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177, 345 – 352.
 - Koop, J., Cornette, F., Simonne, C. 2005. A comparison of growth and biochemical composition *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) and *Mytilus edulis* (L.) on the West coast of Cotentin, Normandy, France 1999-2000. *Aquaculture International* 13 (4), 327 – 340.
 - Lafont, R., Mathieu, M. 2007. Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16, 109 – 130.
 - Lam, P. K. S., Gray, J. S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46, 182 – 186.
 - Landrum, P. F., Harkey, G. A., Kukkonen, J., 1996. Evaluation of Organic Contaminant Exposure in Aquatic Organisms: the significance of bioconcentration and bioaccumulation. *In: Newman, M. C., Jagoe, C. H. (Eds.). Ecotoxicology: a hierarchical treatment*. CRC Press, Boca Raton, pp85 – 132.
 - Langston, W. J., Bebianno, M. J., Burt, G. R., 1998. Metal handling strategies in molluscs. *In: Langston, W. J., Bebianno, M. J. (Eds.). Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman & Hall Ltd., London, pp220 – 283.
 - Lee, M.-K., Cho, B.-Y., Lee, S.-J., Kang, J.-Y., Jeong, H. D., Huh, S. H., Huh, M.-D. 2001. Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. *Aquaculture* 201, 199 – 209.
 - Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., Mori, K. 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development* 33 (1), 87 – 93.
 - Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265 – 275.
 - Manahan, S. E., 1992. *Toxicological Chemistry*. 2nd ed., Lewis Publishers Inc., Michigan, 449pp.
-

- Marin, M. G., Matozzo, V. 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin* 48, 835 – 839.
- Maroco, J. 2003. *Análise Estatística com utilização do SPSS*. 2ª ed., Edições Silabo Lda., Lisboa, 508pp.
- Matozzo, V., Marin, M. G. 2005. Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environmental Research* 97, 43 – 49.
- Matozzo, V., Marin, M. G. 2007. First evidence of altered vitellogenin-like protein levels in clam *Tapes philippinarum* and in cockle *Cerastoderma glaucum* from the Lagoon of Venice. *Marine Pollution Bulletin* 55, 494 – 504.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., Blaise, C. 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environmental International*, 34, 531 – 545.
- Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y., Mori, K. 1997. Gonadal Estrogen Profile and Immunohistochemical Localization of Steroidogenic Enzymes in the Oyster and Scallop during Sexual Maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 118(4), 811 – 817.
- Matsumoto, T., Yamano, K., Kitamura, M., Hara, A. 2008. Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 149, 293 – 298.
- Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Amado, L. L. Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., Chaves, I. S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146, 221 – 234.
- Morcillo, Y., Porte, C. 2000. Evidence of endocrine disruption in clams – *Ruditapes decussatus* – transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environmental Pollution* 107, 47 – 52.
- Moschino, V. Marin, M. G. 2006. Seasonal changes in physiological responses and evaluation of “well-being” in the Venus clam *Chamelea gallina* from the Northern Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 145, 433 – 440.
- Oehlmann, J., Oetken, M., Schulte-Oehlmann, U. 2008. A critical evaluation of the environment risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environmental Research* 108, 140 – 149.
- Oliveira, M. Maria, V. L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M., Santos, M. A. 2009. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defense and

- damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* – An integrated biomarker approach. *Environmental Pollution* 157, 959 – 967.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M. P. 2005. Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49, 1 – 10.
 - Osada, M., Takamura, T., Sato, Mori, K. 2003. Vitellogenin Synthesis in the Ovary of Scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by Estradiol-17 β and the Central Nervous System. *Journal of Experimental Zoology* 299A, 172 – 179.
 - Pampanin, D. M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G., Nasci, C. 2005. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). *Environmental Pollution* 136, 103 – 107.
 - Peakall, D. B. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157 – 160.
 - Phillips, D. J. H., Segar, D., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Marine Pollution Bulletin*, 17 (1): 10 – 17.
 - Phillips, D. J. H., 1993. Bioaccumulation. In: Calow, P. (Ed.). *Handbook of Ecotoxicology, volume one*. Blackwell Scientific Publications, Cambridge, pp378 – 396.
 - Phillips, D. J. H., Rainbow, P. S., 1994. *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Chapman & Hall, Oxford, 371pp.
 - Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. 2007. Natural and synthetic endocrine compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environmental International* 33, 929 – 936.
 - Porte, C., Janer, G., Lorusso, L. C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M. P., Fosse, M. C., Canesi, L. 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143, 303 – 315.
 - Puinean, A. M., Labadie, P., Hill, E. M., Osada, M., Kishida, M., Nakao, R., Novillo, A., Callard, I. P., Rotchell, J. M. 2006. Laboratory exposure to 17 β -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 79, 376 – 383.
 - Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C. 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology* 66, 279 – 292.

-
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., Costello, M. J., Wilson, J. G., Mothersill, C. 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and the potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 142, 118 – 127.
 - Rayyan, A., Chintiroglou, C. C. 2003. *Steinhausia mytilovum* in cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Thermaikos Gulf (northern Aegean Sea, Greece). *Diseases of Aquatic Organisms* 57 (3), 271 – 273.
 - Ricciardi, F., Matozzo, V., Marin, M. G. 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. *Marine Pollution Bulletin* 57, 365 – 372.
 - Riffeser, M., Hock, B. 2002. Vitellogenin levels in mussel hemolymph – a suitable biomarker for the exposure to estrogens? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 132, 75 – 84.
 - Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A. 2006. Rapid endocrine disruption: Environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 102, 163 – 169.
 - Sabik, H., Gagné, F., Blaise, C., Marcogliese, D. J., Jeannot, R. 2003. Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere* 51, 349 – 356.
 - Sadiq, M., 1992. *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*. Marcel Dekker Inc., New York, 389pp.
 - Sanjuan, A., Comesaña, A. S., De Carlos, A. 1996. Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the S.W. european *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 198, 89 – 100.
 - Schlenk, D. 1999. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. *Marine Pollution Bulletin* 39, 48 – 53.
 - Sheehan, D., Power, A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123(3), 193 – 199.
 - Shelley, C. C., Glazebrook, J. S., Turak, E., Winsor, L., Denton, G. R. W. 1988. Trematode (Digenea: *Bucephalidae*) infection in the burrowing clam *Tridacna crocea* from the Great Barrier Reef. *Diseases of Aquatic Organisms* 4, 143 – 147.
 - SNIRH, 1995 – 2009. Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos. INAG – Instituto da Água, IP (<http://snirh.pt/>, acessado no dia 15/04/2009).
-

- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J. N. 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environmental International* 34, 1033 – 1049.
- Stanton, M. G. 1968. Colorimetric Determination of Inorganic Phosphate in the Presence of Biological Material and Adenosine Triphosphate. *Analytical Biochemistry* 22, 27 – 34.
- Stegeman, J. J., Hahn, M. E. 1994. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: Current Perspectives on Forms, Functions, and Regulation of Cytochrome P450 in Aquatic Species. In Malins, D. C., Ostrander, G. K. (Eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp87 – 204.
- Suarez, M. P., Alvarez, C., San Juan, F. 2005. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the Estuary of Vigo. *Journal of Shellfisheries Research* 24 (2), 531 – 540.
- Sumpter, J. P. 1998. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicology Letters* 102 – 103, 337 – 342.
- Ter Braak, C. J. F., 1995. Ordination. In: Jongman, R. H. G., Ter Braak, C. J. F., Van Togerem, O. F. R. (Eds). *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, 91 – 173pp.
- Van Erkom Schurink, C., Griffiths, C.L. 1991. A comparison of reproductive cycles and reproductive output in four southern African mussel species. *Marine Ecology Progress Series* 76 (2), 123– 134.
- Versonnen, B. J., Goemans, G. Belpaire, C., Janssen, C. R. 2004. Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution* 128, 363 – 371.
- Viarengo, A., Canesi, L. 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94 (2-3), 225 – 243.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146, 281 – 300.
- Villalba, A. 1995. Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 130, 269 – 277.
- Villalba A, Mourelle, S. G., Carballal, M. J., López, C. 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 31, 127 – 139.

- Walne, P.R., 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture* 8, 371 – 381.
- World Health Organization (WHO). 2002. Chapter 3: Endocrinology and Endocrine Toxicology. *In* Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., Van Der Kraak, G. (Eds.) *IPCS Global Assessment on the State-Of-The-Science of Endocrine Disruptors*. WHO/PCS/EDC/02.2, pp11 – 32.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., Cajaraville, M. P. 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology* 78S, S109 – S116.
- Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M., Marigómez, I., Cajaraville, M. P. 2007. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organism. *Environmental Pollution* 148, 236 – 250.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Apraiz, I., Cancio, I., Orbea, A., Soto, M., Marigómez, I., Cajaraville, M. P. 2008. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. *Environmental Pollution* 153, 157 – 168.