

Elna Iliana Lima Fernandes

**Avaliação da ecotoxicidade da ciclofosfamida em
mexilhões *Mytillus galloprovincialis* e comparação com a sua
citotoxicidade em linhas celulares humanas**



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2017

Elna Iliana Lima Fernandes

**Avaliação da ecotoxicidade da ciclofosfamida em
mexilhões *Mytilus galloprovincialis* e comparação com a sua
citotoxicidade em linhas celulares humanas**

**Mestrado em Oncobiologia – Mecanismos
moleculares do cancro**

**Trabalho efetuado sob a supervisão de:
Professora Doutora Maria João Bebianno e
Professor Doutor Álvaro Tavares**



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2017

“Avaliação da ecotoxicidade da ciclofosfamida em mexilhões *Mytillus galloprovincialis* e comparação com a sua citotoxicidade em linhas celulares humanas”

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

©Elna Iliana Lima Fernandes

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, ajudaram-me a realizar a minha dissertação e a vencer mais uma etapa. Sem esse suporte nada disto seria possível.

Professora Maria João Bebianno (Centro de Investigação Marinha e Ambiental-CIMA, Faculdade de ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve), orientadora da minha dissertação, pela oportunidade de trabalhar com o seu grupo de investigação “Ecotoxicologia e Química Ambiental”, por todo o suporte, aconselhamento científico, encorajamento e tempo disponibilizado ao longo deste ano.

Professor Álvaro Tavares (Centro de Investigação Biomédica, Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, Universidade do Algarve), orientador da minha dissertação, pela oportunidade de trabalhar com o seu grupo de investigação “Laboratório de Ciclo Celular e Biologia do Cancro” e, por todo o suporte, aconselhamento científico, encorajamento e tempo disponibilizado ao longo deste ano.

Professora Cláudia Florindo (Centro de Investigação Biomédica, Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, Universidade do Algarve), pelo suporte e assistência na realização da experiência *in vitro*.

Tainá Fonseca (CIMA, Universidade do Algarve), por toda a simpatia, paciência, disponibilidade, aconselhamento científico, orientação e tempo disponibilizado no laboratório para a aprendizagem das técnicas fundamentais para a realização de todo o procedimento experimental necessário para a dissertação.

Tânia Carriço pela ajuda indispensável, disponibilidade, companheirismo e amizade ao longo de todos os bons e maus momentos vividos ao longo deste ano.

A todos os restantes do grupo de Ecotoxicologia e Química Ambiental (Nélia Mestre, Sarit O’ Donovan, Serena Abel, Brian Cantante e Joanna Melissa), por toda ajuda disponibilizada, e pelos bons momentos ao longo deste ano.

As minhas amigas Simone Graça e Sara Santos pela ajuda na revisão da escrita da dissertação e por todos os momentos mais do que especiais vividos, não só ao longo deste ano mas ao longo de toda a nossa vida. Obrigada pelo carinho, e pela grande amizade.

A todos os meus amigos de Cabo Verde (Cristy, Ava, Zé, Luís, Mélanie, Heliana e Lara), minha família de coração, que sempre estiveram ao meu lado apesar da distância. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas e pelo carinho de sempre.

Ao meu padastro, pelo suporte, amizade e companheirismo ao longo de todo o meu percurso académico e não só.

A minha mãe (Octávia Fernandes) por tudo, principalmente por ter vivido os meus sonhos comigo e por estar presente em todos os momentos e, a quem dedico esta dissertação.

Resumo Geral

O aumento da incidência de cancro a nível mundial resultou na maior produção, consumo e libertação para o ambiente aquático de fármacos entre os quais os citotóxicos. Estes fármacos têm um modo de ação que não é totalmente direcionado às células cancerígenas, sendo tóxico para as células saudáveis que se dividem rapidamente através da alquilação do seu ADN. No ambiente aquático, estes fármacos são ingeridos por organismos não-alvo como bivalves ou peixes. Esses organismos compartilham receptores e mecanismos de resposta semelhantes aos dos humanos devido a conservação de biomoléculas durante a evolução pelo que, esses fármacos podem também induzir toxicidade nestas espécies quando ingeridos mesmo não se tratando de organismos alvo. Os mexilhões são bivalves que apresentam elevada capacidade de filtrar grandes volumes de água e, têm sido utilizados como organismo modelo para avaliar a presença destes compostos no meio aquático e em particular no meio marinho.

Neste trabalho analisaram-se os efeitos ecotoxicológicos *in vitro* e *in vivo* da ciclofosfamida (fármaco citotóxico) nos mexilhões marinhos *Mytilus galloprovincialis*. A avaliação da toxicidade induzida pela ciclofosfamida foi feita através da quantificação de biomarcadores como o stress oxidativo, enzimas de biotransformação, atividade neuronal, peroxidação lipídica (LPO), viabilidade celular e genotoxicidade. A citotoxicidade provocada pela ciclofosfamida em hemócitos de mexilhões foi comparada com a citotoxicidade provocada em linhas celulares humanas. Verificou-se que a exposição crónica a ciclofosfamida provocou nos mexilhões citotoxicidade, danos no ADN e alterações na homeostase celular. Tais resultados demonstram que de facto, a presença desses fármacos no ambiente aquático causa impactos sobre a fauna que podem ser irreversíveis.

Palavras chaves: Cancro, fármacos anticancerígenos , ciclofosfamida, contaminantes, ecotoxicologia, *Mytilus galloprovincialis*.

Abstract

The increased incidence of cancer worldwide has resulted in increased production, consumption and release into the aquatic environment of drugs including cytotoxics. These drugs have a mode of action that is not fully targeted to cancer cells so, they are toxic to healthy cells that divide rapidly through the alkylation of their DNA. In the aquatic environment, these drugs are ingested by non-target organisms such as fish or bivalves. These organisms share receptors and response mechanisms similar to those of humans due to the conservation of biomolecules during evolution, so that these drugs can also induce toxicity in these species when ingested even if they are not target organisms. Mussels are bivalves that have high capacity to filter large volumes of water and have been used as a model organism to evaluate the presence of these compounds in the aquatic environment and in particular in the marine environment.

In this work we analyzed the *in vitro* and *in vivo* ecotoxicological effects of cyclophosphamide (cytotoxic drug) on marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. The evaluation of the toxicity induced by cyclophosphamide was made through the quantification of biomarkers such as oxidative stress, biotransformation enzymes, neuronal activity, lipid peroxidation (LPO), cellular viability and genotoxicity. Cytotoxicity caused by cyclophosphamide in mussel haemocytes was compared to cytotoxicity induced in human cell lines. Chronic exposure to cyclophosphamide has been shown to cause cytotoxicity, DNA damage and changes in cellular homeostasis in mussels. These results demonstrate that in fact, the presence of these drugs in the aquatic environment causes impacts on the fauna that may be irreversible.

Keywords: Cancer, anticancer drugs, cyclophosphamide, contaminants, ecotoxicology, *Mytilus galloprovincialis*.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo Geral.....	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	x
Abreviaturas	xi
1-Introdução geral	1
1.1-Cancro como flagelo do século	1
1.2- Fármacos quimioterapêuticos	4
1.2.1- Agentes alquilantes	7
1.3- Ciclofosfamida	9
1.3.1- Farmacocinética e biotransformação	10
1.3.2- Metabolismo e ativação da Ciclofosfamida	12
1.3.2- Toxicidade.....	14
1.4-Fármacos libertados para o ambiente aquático	15
4.1-Libertação de quimioterapêuticos para o ambiente aquático	17
1.5- Efeito toxicológico da ciclofosfamida em organismos aquáticos.....	18
1.6- Utilização de biomarcadores na medição de poluentes em organismos aquáticos	20
1.6.1- Stress oxidativo.....	21
1.6.2-Enzimas de biotransformação	22
1.6.3-Neurotoxicidade	23
1.6.4- Peroxidação lipídica.....	24
1.6.5- Viabilidade celular	26
1.6.6- Estabilidade da membrana lisossomal	27
1.6.7- Genotoxicidade.....	28
1.7-Moluscos bivalves como bioindicadores	28
1.8- Análise <i>in vitro</i>	31
1.9- Objetivo do trabalho	32
2 - Materiais e Métodos	32
2.1- Preparação da solução de ciclofosfamida	32
2.2- Ensaio <i>in vitro</i> com linhas celulares humanas	33
2.3- Ensaio <i>ex vivo</i> com <i>M. galloprovincialis</i>	34
2.3.1 – Recolha de <i>M. galloprovincialis</i>	34
2.3.2- Extração da hemolinfa.....	35

2.3.3- Viabilidade celular das células de <i>M. galloprovincialis</i>	35
2.4- Ensaio <i>in vivo</i> com <i>M. galloprovincialis</i>	37
2.4.1- Extração da hemolinfa	38
2.4.2- Tratamento das amostras de mexilhão	40
2.5- Análises bioquímicas nos tecidos dos mexilhões expostos a ciclofosfamida	41
2.5.1 - Quantificação da concentração das proteínas totais	42
2.5.2- Quantificação da atividade da GPx	42
2.5.3- Quantificação da atividade da GST	42
2.5.4- Quantificação da atividade da AChE	43
2.5.5- Quantificação da LPO	43
2.6- Análise estatística	44
3- Resultados	45
3.1- Viabilidade celular em linhas celulares humanas expostas a ciclofosfamida	45
3.2- Viabilidade celular em hemócitos de <i>M. galloprovincialis</i> expostos a ciclofosfamida	47
3.3- Genotoxicidade provocada pela ciclofosfamida em hemócitos de <i>M. galloprovincialis</i>	53
3.4- Stress oxidativo provocado pela ciclofosfamida nas brânquias e glândula digestiva de <i>M. galloprovincialis</i>	55
3.5- Biotransformação provocada pela ciclofosfamida nas brânquias e glândula digestiva de <i>M. galloprovincialis</i>	57
3.6- Neurotoxicidade provocada pela ciclofosfamida nas brânquias de <i>M. galloprovincialis</i>	59
3.7- LPO provocada pela ciclofosfamida nas brânquias e glândulas digestivas de <i>M. galloprovincialis</i>	60
3.8- Análise de componentes principais (PCA)	62
4- Discução	66
4.1- Ensaio <i>in vitro</i> em linhas celulares humanas expostas a ciclofosfamida	66
4.2- Ensaio <i>ex vivo</i> em hemócitos de <i>M. galloprovincialis</i> expostos a ciclofosfamida	67
4.3- Ensaio <i>in vivo</i> em <i>M. galloprovincialis</i> expostos a ciclofosfamida	68
5- Conclusões	73
6- Perspetivas futuras	75
Referência	76

Índice de figuras

Figura 1.1: Tipos de cancro e respetiva mortalidade estimada. (Diferença entre homens e mulheres).....	2
Figura 1.2: Distribuição das diferentes classes de quimioterapêuticos pelas fases do ciclo celular.....	6
Figura 1.3: Ação dos agentes alquilantes nas bases azotadas do ADN.....	8
Figura 1.4: Produtos do metabolismo da ciclofosfamida.....	12
Figura 1.5: Ação citotóxica da mostarda de azoto através da formação de ligações cruzadas no ADN.....	14
Figura 1.6: Exemplos de fontes de resíduos líquidos hospitalares de um sistema urbano: 1) Efluentes hospitalares e domésticos; 2/3) Efluentes de águas residuais/ETAR; 4) introdução no rio.....	17
Figura 1.7: Alguns mecanismos resultantes da produção de ROS. SOD (Superóxido dismutase)/ CAT (Catalase) - enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa contra as ROS. LPO (Peroxidação lipídica).....	21
Figura 1.8: Oxidação da GSH em GSSG catalizada pela peroxidase GPx. GR- Glutathione redutase; NADPH- Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina.....	22
Figura 1.9: Ação exercida pela GST durante o processo de bio transformação de xenobióticos.....	23
Figura 1.10: Processo de LPO e a formação de seus produtos finais. MDA (Malondialdeído).....	26
Figura 1.11: Espécie <i>Mytilus galloprovincialis</i> utilizado neste estudo. (Representação em tamanho real).....	29
Figura 2.1: Local da recolha dos mexilhões (Ria Formosa - Faro).....	35

Figura 2.2: Sistema de exposição <i>in vivo</i> do mexilhão <i>M. galloprovincialis</i>	37
Figura 2.3- Camara de eletroforese utilizada no ensaio cometa. 1) Polo negativo; 2) Polo positivo.....	40
Figura 2.4- Parte interna do <i>Mytilus galloprovincialis</i> usado neste estudo. (1) Músculo adutor; (2) brânquias; (3) glândula digestiva; (4) gónadas.....	41
Figura 3.1: Viabilidade celular obtida através do ensaio do vermelho neutro em linhas celulares humanas expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida (A). O gráfico B contém a mesma informação que o gráfico A, e é apresentado com intuito de uma melhor compreensão da variação da viabilidade celular entre as linhas celulares.....	46
Figura 3.2: Viabilidade celular determinada usando vermelho neutro em hemócitos de mexilhões expostos a diferentes concentrações de ciclofosfamida em dias diferentes. A) Resultados do primeiro grupo de mexilhões expostos a ciclofosfamida. B) Resultados do segundo grupo de mexilhões expostos a ciclofosfamida. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os hemócitos expostos e não expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$)...	49
Figura 3.3: Viabilidade celular em mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}). A) Viabilidade celular com vermelho neutro; B) Viabilidade celular com TB. Asteriscos indicam diferenças significativas entre hemócitos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.....	52
Figura 3.4: Imagens de hemócitos de mexilhões obtidos através do ensaio do cometa após os diferentes tempos de exposição (0, 3, 7 e 14 dias). CT- Controlo. CP- Exposto a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}).....	54
Figura 3.5: Efeito genotóxico em mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}). Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre hemócitos expostos e não expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.....	55
Figura 3.6: Atividade da GPX em tecidos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}). (A) Quantificação da atividade da GPx nas brânquias e (B)	

na glândula digestiva de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado durante a exposição. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.....56

Figura 3.7: Atividade da GST em tecidos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). (A) Quantificação da atividade da GST nas brânquias. B) Quantificação da atividade da GST na glândula digestiva. Asteriscos indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.....58

Figura 3.8: Atividade da AChE nas brânquias de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). Asteriscos indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.....59

Figura 3.9: Determinação da LPO a partir da quantificação do MDA. (A) Determinação da LPO nas brânquias e (B) glândula digestiva de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). Asteriscos indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.....61

Figura 3.10: Análise dos componentes principais (PCA) nos hemócitos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). CT (Controlo) e CP (expostos a ciclofosfamida) nos respetivos dias de amostragem (0, 3, 7 e 14).....62

Figura 3.7: Análise dos componentes principais (PCA) nas brânquias de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (100 ng L⁻¹). CT (Controlo) e CP (expostos a ciclofosfamida) nos respetivos dias de amostragem (0, 3, 7 e 14).....64

Figura 3.8: Análise dos componentes principais (PCA) na glândula digestiva de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). CT (Controlo) e CP (expostos a ciclofosfamida) nos respetivos dias de amostragem (0, 3, 7 e 14).....65

Índice de tabelas

Tabela 1.1: Exemplos de fármacos rotineiramente utilizados em quimioterapia.....	5
Tabela 1.2: Concentrações ambientais de alguns fármacos consumidos mundialmente.	16
Tabela 1.3: Concentrações de anticancerígenos medidos em efluentes/influentes e em águas superficiais.....	18
Tabela 1.4: Propriedades físico-químicas da ciclofosfamida.....	19
Tabela 2.1: Propriedades químicas da Ciclofosfamida utilizada.....	32
Tabela 3.1: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em linhas celulares (Hela) expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida.....	47
Tabela 3.2: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em linhas celulares (RPE) expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida.....	47
Tabela 3.3: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em hemócitos de mexilhões expostos a diferentes concentrações de ciclofosfamida (Dia 1).....	50
Tabela 3.4: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em hemócitos de mexilhões expostos a diferentes concentrações de ciclofosfamida (Dia 2).....	50
Tabela 3.5: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular obtidos através do ensaio do verlemho neutro em hemócitos de mexilhões expostos a ciclofosfamida (1000 ng L ⁻¹).....	53

Abreviaturas

4 (OHCP)	4- Hidrixiciclofosfamida
5- Fu	5- Fluorouracil
AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH	Aldeído desidrogenase
ANOVA	Análise da variância bidirecional
ARN	Ácido ribonucleico
ATC	Acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4- dinitrobenzeno
cm	Centímetros
-COOH	Grupo carboxilo
CP	Ciclofosfamida
DAPI	4,6- diamino-2- fenilindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTNB	5,5'- ditio- bis (2- nitrobenzóico)
DTT	Ditiotritol

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
FDA	<i>Food and drugs administration</i>
g	Gramas
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide oxidized
GST	Glutathione-S- Transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
hTERT	Telomerase humana
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilogramas
Km	Quilómetros
L	Litros
LMA	<i>Low Melting Point Agarose~</i>
LPO	Peroxidação lipídica

m ²	Metros quadrados
MAPK	<i>Mitrogen ACtivated Protein Kinase</i>
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
ml	Militros
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de Mercúrio
MN	Micronúcleos
MRP	Proteínas de Resistência Múltipla
N	Azoto
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida de Adenina
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
ng	Nanogramas
NH ₂	Grupo amino
nm	Nanómetros
NMA	<i>Normal Melting Point Agarose</i>
NaN ₃	Azida de sódio
O	Oxigénio
O ₂ ⁻	Radical Superóxido

OH•	Radical hidroxilo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise dos componentes principais
PKC	Proteína Cinase C
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPE	Células do Epitélio Pigmentado da Retina
rpm	Rotações por minuto
S	Enxofre
-SH	Grupo sulfidrilo
SOD	Superóxido dismutase
TB	Azul de tripano
v/v	Volume/Volume
µg	Microgramas

1-Introdução geral

1.1-Cancro como flagelo do século

Nos dias que correm, o cancro é uma das doenças mais preocupantes e, uma quantidade exorbitante de recursos são dedicados a investigar o tratamento e, a eventual cura daquela que se tornou a doença do século (Ferrando-Climent et al., 2014).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o cancro causa recentemente um maior número de mortes em comparação com todas as doenças cardiovasculares e respiratórias (Ferlay et al., 2015). O contínuo crescimento da população e o aumento da esperança média de vida indicam um aumento dos casos de cancro nas próximas décadas, particularmente em países de baixo e médio desenvolvimento (Torre et al., 2015) com mais de 20 milhões (57%) de novos casos de cancro esperados anualmente até 2025 (Ferlay et al., 2015). Fatores ambientais relacionados com o estilo de vida (*i.e.* dieta; estresse; tabaco) e crescente contato com poluentes também interferem no aumento exponencial de casos de cancro. Os tipos de cancro mais comumente diagnosticados entre homens e mulheres e as suas respectivas percentagens de mortalidade são indicados na Figura 1.1, sendo o cancro do pulmão aquele com maior taxa de mortalidade estimada para ambos os sexos.

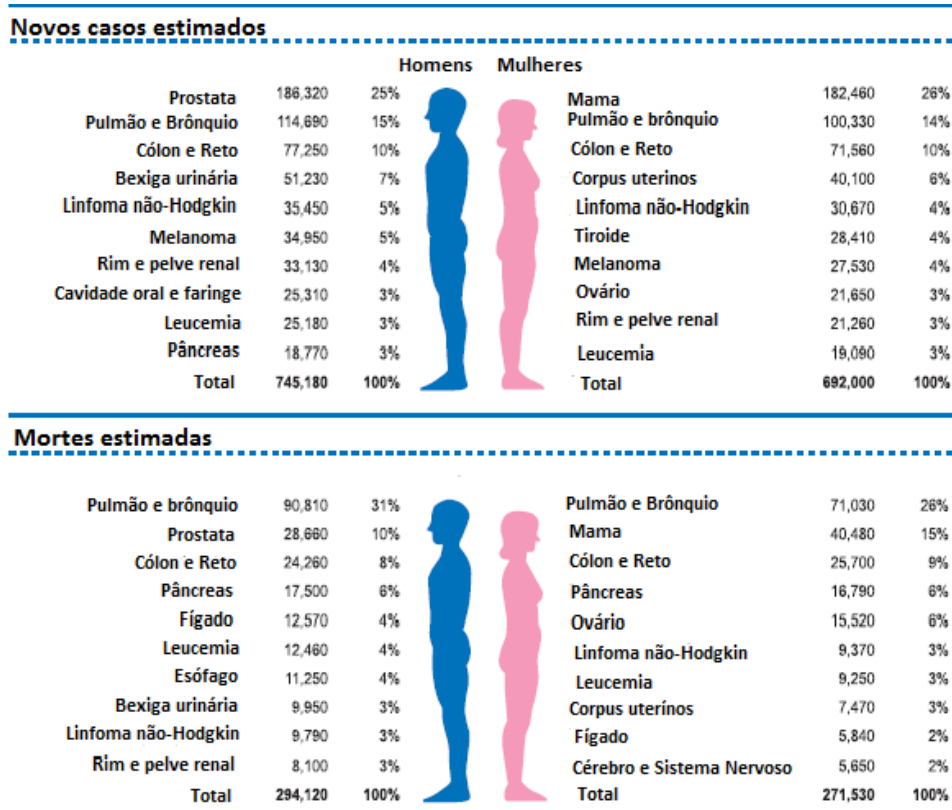


Figura 1.9: Tipos de cancro e respetiva mortalidade estimada (Diferença entre homens e mulheres). Adaptado de Jemal et al. (2008).

Muitas formas de tratamento têm sido desenvolvidas para fazer frente às elevadas taxas de mortalidade provocadas pelo cancro. A cirurgia consiste numa alternativa com finalidade curativa quando se trata de pequenos cancros sólidos (*e.g.* cancro da mama; cancro do trato gastrointestinal; hepatopancreatobiliar) ou usada para cuidados paliativos, muitas vezes combinados com quimioterapia ou radioterapia em casos de cancros maiores ou metastáticos (Reed, 2009).

Ao longo dos anos, outras formas de terapia (mais sofisticadas) foram desenvolvidas com o objetivo de tratar os doentes com maior precisão. Alguns exemplos dessas terapias são: radioterapia, quimioterapia, imunoterapia (Fernando & Kumar, 2015; Owadally & Staffurth, 2015). A radioterapia pode ser administrada de três maneiras: radioterapia de feixe externo que utiliza fótons, elétrons ou prótons, radioisótopos implantados diretamente sobre o tecido tumoral (braquiterapia), e radioisótopos injetados.

A absorção de radiação nos tecidos alvos provoca a ionização de moléculas ou átomos que reagem com outros componentes celulares levando à quebra de ligações químicas e à formação de radicais livres que são compostos quimicamente instáveis. Estes radicais livres geralmente reagem com o ADN levando à quebra das suas cadeias (*i.e.* single/double strand break) (Owadally & Staffurth, 2015). Uma vez que as células cancerígenas proliferam a uma maior velocidade, os danos provocados pela radiação ao ADN não são reparados a tempo e, eventualmente, tais células entram em processo apoptótico (Owadally & Staffurth, 2015). Células normais que se encontram nas proximidades do tecido irradiado acabam por sofrer esses mesmos danos, mas entretanto são geralmente capazes de repará-los (Owadally & Staffurth, 2015).

A imunoterapia, por outro lado, usa o sistema imunológico para “atacar” os antígenos tumorais. Isto acontece porque muitos tumores são imunogénicos e provocam uma resposta imunitária no hospedeiro. Mas isto normalmente não é suficiente para superar a tolerância do sistema imunológico do hospedeiro. Assim, a imunoterapia utiliza vários métodos para aumentar e melhorar as respostas imunológicas do hospedeiro, tais como o uso de citocinas imunoterapêuticas não específicas, vacinas contra tumores, imunoterapia adotiva e o uso de anticorpos monoclonais contra uma grande variedade de antígenos tumorais (Fernando & Kumar, 2015).

Na maioria das vezes, o tratamento do cancro envolve uma ou mais cirurgias, radioterapia e até mesmo terapia sistémica. Em cancros metastáticos por exemplo, a terapia sistémica é a principal modalidade terapêutica, uma vez que a entrega através da corrente sanguínea facilita o acesso a locais disseminados de cancro. Terapias sistémicas incluem terapia hormonal, terapia direcionada e quimioterapia (Fernando & Jones, 2015; Fernando & Kumar, 2015).

Contudo, apesar dos tratamentos anticancerígenos terem sofrido avanços significativos nas últimas décadas e, de serem cada vez mais eficazes e específicos para cada paciente a taxa de mortalidade devido ao cancro apenas diminuiu 1%. A elevada taxa de mortalidade deve-se muitas vezes ao facto de que a maioria dos fármacos utilizados não são direcionados aos promotores do cancro (fatores de crescimento, proteínas) mas sim a moléculas comuns tanto às células tumorais como às normais tais como o ADN (Owadally & Staffurth, 2015). Com o objetivo de diminuir a elevada taxa

de mortalidade, recorre-se cada vez mais ao uso de fármacos anticancerígenos cada vez mais inovadores e mais específicos para as células cancerígenas (Ferrando-Climent et al., 2014). Para adquirirem essa especificidade às células cancerígenas e desempenharem a ação desejada, muitos desses fármacos sofrem alterações químicas no próprio organismo dos pacientes.

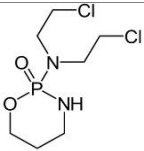
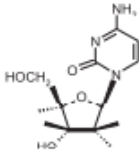
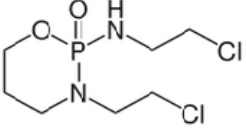
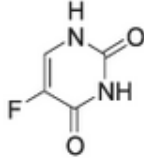
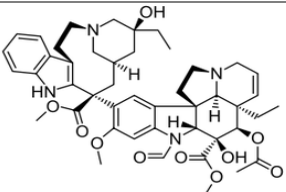
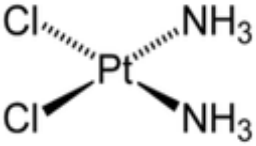
1.2- Fármacos quimioterapêuticos

A quimioterapia pode ser descrita como terapia citotóxica, refere-se ao uso de fármacos para matar ou inibir o crescimento de células, com maior efeito nas que se caracterizam por proliferarem rapidamente nomeadamente, as cancerígenas (Booker et al., 2014).

Existe atualmente, um grupo abrangente de quimioterapêuticos com diferentes modos de ação nas células (Martins & de Oliveira, 2009). Mais de cinquenta fármacos citotóxicos são usados rotineiramente na quimioterapia. A procura de tratamento quimioterapêutico continua a aumentar de ano para ano. A tendência é também de se utilizar doses cada vez mais elevadas e mais eficazes devido aos avanços das ciências médicas que permitiram controlar melhor os efeitos colaterais destes fármacos (Johnson et al., 2008).

Alguns dos fármacos utilizados na quimioterapia encontram-se na Tabela 1.1.

Tabela 1.3: Exemplos de fármacos rotineiramente utilizados em quimioterapia. Adaptado de Kosjek & Heath (2011).

Nome	Fórmula química	Estrutura química
Ciclofosfamida	$C_7H_{17}Cl_2N_2O_2P$	
Citarabina	$C_9H_{13}N_3O_5$	
Ifosfamida	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2$	
5-Fluorouracil	$C_4H_3FN_2O_2$	
Vincristina	$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$	
Cisplatina	$H_6Cl_2N_2Pt$	

Os agentes quimioterapêuticos exercem os seus efeitos através da interrupção do ciclo celular por um ou mais processos. Causam a apoptose celular por interação direta com o ADN ou por se ligarem à proteínas-chave necessárias para a divisão celular (Fernando & Jones, 2015). Contudo, também podem ser citotóxicos para células saudáveis, com normal proliferação, particularmente aquelas com uma capacidade de renovação elevada, tais como as células da medula óssea e das membranas das mucosas (Fernando & Jones, 2015). Existem outros quimioterapêuticos (citostáticos) que não matam as células cancerígenas mas sim, atuam na interrupção da replicação / divisão das

células cancerígenas e ligam-se as células numa fase específica do seu ciclo celular (Booker et al., 2014).

Os quimioterapêuticos são por isso classificados através do seu modo de ação no ciclo celular, ou pelas suas propriedades bioquímicas.

A classificação pela sua especificidade no ciclo celular é útil porque tem influência na forma como os fármacos são programados e combinados para que possam exercer o efeito máximo pretendido no tratamento (Page & Takimoto, 1993). É importante que as células cancerígenas sejam expostas ao fármaco escolhido durante a fase específica na qual este atua (Page & Takimoto, 1993). Os quimioterapêuticos específicos de cada fase do ciclo celular geralmente têm um limiar para o efeito dose-resposta. Esse limiar, ao ser ultrapassado não aumenta a ocorrência da morte celular (Fernando & Jones, 2015). Quanto à especificidade para as fases do ciclo celular as diversas classes de quimioterapêuticos agrupam-se tal como se mostra na Figura 1.2.



Figura 1.10: Distribuição das diferentes classes de quimioterapêuticos pelas fases do ciclo celular. Adaptado de Fernando & Jones (2015).

Quanto às propriedades bioquímicas, os quimioterapêuticos subdividem-se em:

a) Agentes Alquilantes: Comprometem a função da célula através da formação de ligações covalentes com os grupos amino, carboxilo, sulfidrilo e fosfato em moléculas

biologicamente importantes tais como o ADN e ARN, bem como também proteínas. Alteram a sua estrutura e interrompem a sua função. Os agentes alquilantes são classificados de acordo com as suas estruturas químicas e mecanismos de ligação covalente. Esta classe de fármacos incluem as mostardas de azoto, complexos de platina, entre outros (Fernando & Jones, 2015). O azoto rico em eletrões na posição 7 (N7) da Guanina no ADN é particularmente suscetível à alquilação (Page & Takimoto, 1993).

b) Anti-metabolitos: São análogos estruturais de metabolitos de ocorrência natural envolvidos na síntese de ADN e ARN. Ou seja, podem substituir um metabolito que é normalmente incorporado ao ADN ou ARN ou, podem competir pelo sítio catalítico de uma enzima chave. Exemplos de anti-metabolitos são análogos de pirimidinas (Gencitabina) e os anti-folatos (Fernando & Jones, 2015).

c) Antibióticos anti-tumorais: Intercalam o ADN em sequências específicas, criando radicais livres que causam quebras nas cadeias de ADN. Exemplos desses antibióticos incluem as Antraciclinas que são produtos do fungo *Streptomyces* (Fernando & Jones, 2015).

d) Inibidores da topoisomerase: Topoisomerasas são enzimas que controlam a estrutura 3D do ADN. As topoisomerasas I e II são enzimas responsáveis pelo desenrolamento do ADN durante o seu processo de replicação (Fernando & Jones, 2015).

e) Fármacos de ligação a tubulina que incluem os Vinca alcaloides e os Taxanos. Os Vinca alcaloides ligam-se a tubulina e impedem a formação do microtúbulo, que é importante durante a mitose, mas também para a forma celular e transporte intracelular. Os Taxanos impedem a desmontagem dos microtúbulos, inibindo assim a sua normal funcionalidade (Fernando & Jones, 2015).

1.2.1- Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes começaram a ser utilizados no tratamento do cancro a partir do século XX devido a descoberta dos efeitos causados pelo gás mostarda durante a primeira guerra mundial. O gás penetra nas células destruindo-as rapidamente (Martins & de Oliveira, 2009).

Os agentes alquilantes reagem com os átomos de azotos (N) do anel e átomos de oxigénio das bases de ADN para gerar uma variedade de adutos covalentes que vão desde grupos metilo simples até alquilações complexas (Figura 1.3) (Fu et al., 2012). Devido à elevada reatividade nucleofílica da posição N7 da guanina no ADN, a maioria dos agentes metilantes monofuncionais induzem esta metilação em 60-80% das lesões de alquilação total no ADN (Fu et al., 2012).

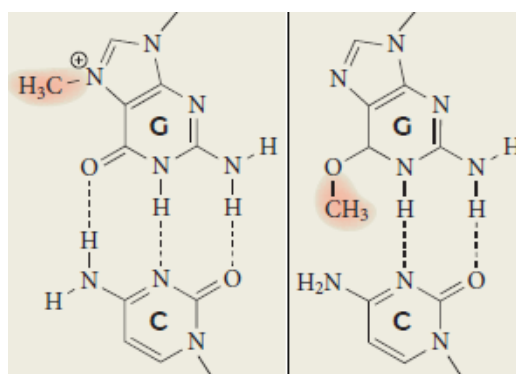


Figura 1.11: Ação dos agentes alquilantes nas bases azotadas do ADN. Adaptado de Fu et al. (2012)

Os alquilantes dependem da proliferação celular para desempenharem a sua atividade mas, não são específicos para nenhuma fase do ciclo. Eles apresentam uma relação dose-resposta e, normalmente a dose limiar é limitada pela toxicidade que causam nos tecidos normais. Estes agentes são utilizados em regimes de quimioterapia de dose elevada em cancros quimiossensíveis (Fernando & Jones, 2015; Page & Takimoto, 1993).

As mostardas de azoto, que incluem fármacos como a mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida e clorambucil são vesicantes locais poderosos. Como tal, podem causar variados problemas tais como a necrose de tecido local, fibrose pulmonar e cistite hemorrágica. A maioria destes compostos, ao entrarem em contacto com os organismos alvo, passam por um conjunto de transformações químicas (metabolização) para que possam desempenhar a função pretendida. Os metabolitos destes compostos são altamente reativos em solução aquosa, em que uma porção alquilante ativa liga-se ao ADN. O sistema hematopoiético já provou ser especialmente suscetível a estes compostos

pelo que a dose limiar tem que ser bem definida a fim de evitar a toxicidade (Page & Takimoto, 1993).

1.3- Ciclofosfamida

Ciclofosfamida (CP) (N, N-bis (2-cloroetil) tetra-hidro-2H-1,3,2-oxafosforino-2-amina, 2-óxido mono-hidratado) é também conhecida comercialmente como Endoxan ou Citoxan. A ciclofosfamida e o agente alquilante derivado da mostarda de azoto, ifosfamida, foram desenvolvidos por Norbert Brock e, consiste num anel de fosforamida ligado a uma fração bifuncional contendo dois grupos (cloroetilo) (Brock, 1996). Os primeiros ensaios clínicos foram publicados no final da década de 1950. Em 1959 tornou-se o oitavo agente anticancerígeno citotóxico a ser aprovado pela FDA (*i.e* Food and Drugs Administration) (Brock, 1989).

A ciclofosfamida foi utilizada primariamente como um quimioterapêutico anticancerígeno no tratamento de uma ampla gama de cancros incluindo linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, variados tipos de leucemia, mieloma múltiplo, neuroblastomas, adenocarcinomas do ovário e certas neoplasias malignas do pulmão (McCarroll et al., 2008). Entre 1000 compostos selecionados e antibióticos testados contra aproximadamente 33 tumores, a ciclofosfamida foi a molécula mais efetiva (Emadi et al., 2009). Pode ser administrada a pacientes por via oral (100 a 200 mg/kg, diariamente) ou intravenosamente (600-1000 mg/m², a cada 3-4 semanas) (McCarroll et al., 2008). É também utilizada como agente imunossupressor no tratamento de artrite (Hales, 1982), lúpus eritematoso sistémico, glomerulonefrite, pneumonia intersticial crónica, hepatite crónica, esclerose múltipla entre outras doenças, bem como no transplante de órgãos (Anderson et al., 1995).

A síntese da ciclofosfamida teve como finalidade modificar a estrutura química da mostarda de azoto e, gerar uma pró-droga quimicamente inativa que pudesse ser metabolizada no seu composto ativo com ação direcionada às células cancerígenas (Emadi et al., 2009). A sua aplicação em quimioterapia deu-se através do pressuposto de que a elevada atividade de fosfamidase em células cancerígenas iria ativar o fármaco através da clivagem da sua ligação fósforo-azoto e assim, conferir seletividade e

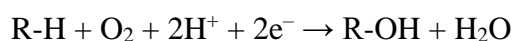
especificidade às células neoplásicas (Graham, 1991). Assim, a ciclofosfamida foi um dos primeiros agentes racionalmente concebidos para atingir seletivamente as células cancerígenas. Contudo, a ativação baseada na atividade da fosfamidase mostrou-se imprecisa e demonstrou exercer efeitos tóxicos sobre as células normais (Emadi et al., 2009).

1.3.1- Farmacocinética e biotransformação

Os fármacos quimioterapêuticos podem ser administrados por via oral, intramuscular ou intravenosa. São posteriormente absorvidos pelo corpo através do sistema digestivo, do trato respiratório ou da pele. Uma vez absorvidos, difundem-se através da membrana por transporte ativo e circulam na corrente sanguínea e no sistema linfático. Contudo, a maioria dos fármacos quimioterapêuticos são lipofílicos, logo não são prontamente distribuídos ou suspensos no soro. Para tal, precisam ser metabolizados e alterados quanto às suas características físico-químicas. A metabolização ocorre principalmente no fígado para se tornarem hidrofílicos e, poderem ser excretados na urina e nas fezes, evitando a sua acumulação (Kranendonk, 2016).

O metabolismo de fármacos é o conjunto de todas as vias metabólicas que modificam a estrutura química de xenobióticos que são compostos estranhos a um organismo bioquímico normal, como é o caso de drogas e venenos (Jakoby, 1990).

O metabolismo é caracterizado por três fases distintas. Na primeira fase (Fase I), enzimas como as oxidases do citocromo P-450 introduzem grupos reativos ou polares nos compostos xenobióticos, especialmente por hidroxilação (Guengerich, 2001; Jakoby, 1990). Este complexo enzimático atua através da incorporação de um átomo de oxigênio em hidrocarbonetos não ativados (R-H) (Equação.1.1), o que resulta tanto na introdução de grupos hidroxilo (OH•) como na desalquilação de grupos Azoto (N), Oxigênio (O) e Enxofre (S) dos substratos. O mecanismo de reação das oxidases do citocromo P-450 realiza-se através da redução do oxigênio ligado ao citocromo produzindo uma molécula de água e espécies altamente reativas (R-OH) (Guengerich, 2001).



(Equação.1.1)

Estes compostos são depois conjugados a compostos polares em reações que caracterizam a Fase II do metabolismo. Estas reações são catalisadas por enzimas, tais como a Glutathione-S-Transferase (GST), a Glutathione Peroxidase (GPx) e as Sulfotransferases. Então, na Fase II, os metabolitos ativados na Fase I são conjugados com espécies tais como glutathione (GSH), sulfato, glicina ou ácido glucurônico. As reações de conjugação ocorrem nos grupos carboxilo ($^-\text{COOH}$), OH^\bullet , amino (NH_2) e sulfidrílo (^-SH) dos respectivos metabolitos. Os produtos da reação de conjugação têm maior peso molecular e, tendem a ser menos ativos do que os seus substratos, ao contrário das reações de Fase I que frequentemente produzem metabolitos ativos. A adição de grupos aniônicos (*e.g.* GSH) desintoxica eletrófilos reativos e, produz mais metabolitos polares que não são capazes de difundir através das membranas e, portanto, podem ser ativamente transportados (Homolya et al., 2003).

Após reações de Fase II, os conjugados e os seus metabolitos podem ser excretados a partir de células na Fase III do metabolismo. Os intermediários produzidos nas diversas fases do metabolismo para a desintoxicação podem eles próprios ser muito reativos e, portanto tóxicos (Jakoby, 1990).

Os grupos aniônicos adquiridos na fase anterior atuam como marcadores de afinidade para uma variedade de transportadores membranares da família de proteínas de resistência múltipla (MRP). Estas proteínas são membros da família de transportadores de ligação a Adenosina trifosfato (ATP) e podem catalisar o transporte dependente de ATP de uma enorme variedade de aniões hidrofóbicos (Homolya et al., 2003). Deste modo, elas agem para remover os produtos de Fase II para o meio extracelular, onde podem ser ainda metabolizados ou diretamente excretados.

De ressaltar também que os metabolitos produzidos durante o processo de desintoxicação são normalmente excretados pela urina. Contudo, além dos metabolitos, são também encontrados muitas vezes, na urina, compostos parentais que não foram metabolizados (Emadi et al., 2009; Ferrando-Climent et al., 2014).

1.3.2- Metabolismo e ativação da Ciclofosfamida

A ativação da ciclofosfamida dá-se predominantemente no fígado (Weber & Waxman, 1993). A Figura 1.4 representa a ativação da ciclofosfamida catalisada pelo sistema de oxidases do citocromo P-450. O primeiro passo na ativação da ciclofosfamida é a hidroxilação do carbono da posição 4 no anel de fosforamida, por oxidases do citocromo P-450, para a formação do intermediário instável 4-hidroxíciclofosfamida (4-OHCP) (Anderson et al., 1995; Hales, 1982), o qual coexiste com o seu tautómero aldofosfamida (Emadi et al., 2009). Estes precursores de transporte instáveis difundem-se livremente para as células, onde sofrem β -eliminação espontânea (*i.e.* perda de partes da molécula reagente) resultando na produção da acroleína e mostarda de fosforamida (Anderson et al., 1995; Emadi et al., 2009).

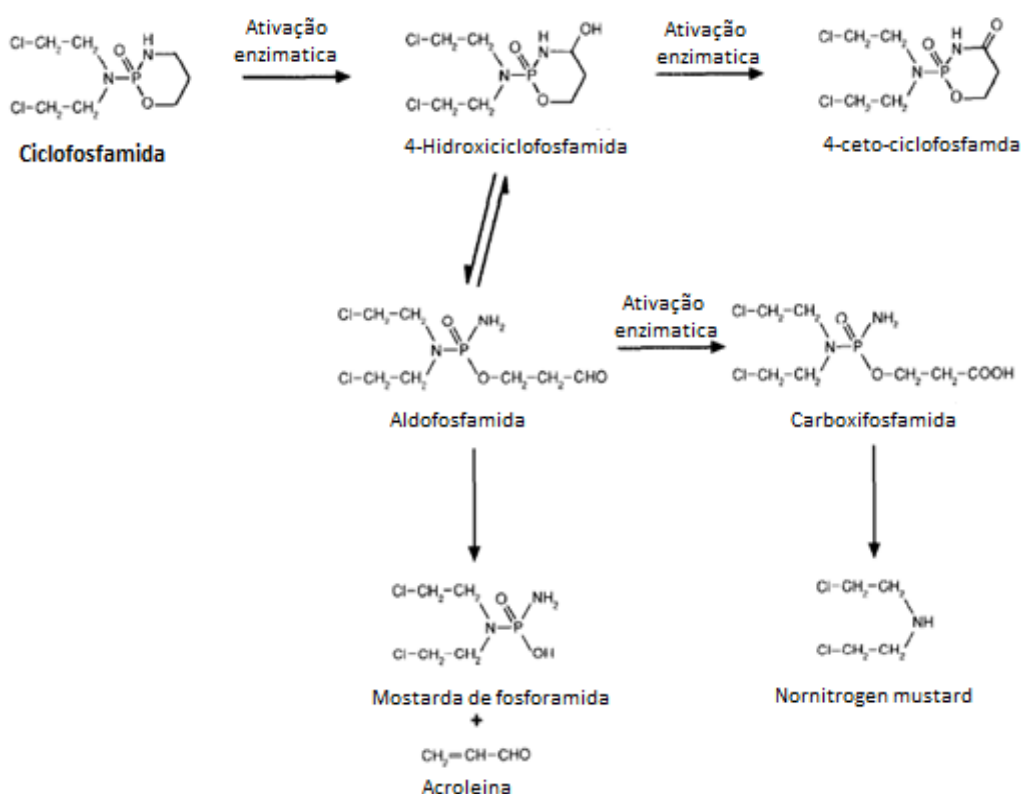


Figura 1.12: Produtos do metabolismo da ciclofosfamida. Adaptado de Anderson et al. (1995).

A 4-OHCP e a aldofosfamida podem ser ainda oxidadas pela aldeído desidrogenase (ALDH) ligada ao Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (NAD) para produzirem 4-ceto-ciclofosfamida e carboxifosfamida. A retirada do hidrogénio adjacente ao aldeído por uma base é um passo necessário para a decomposição de aldofosfamida. A carboxifosfamida e os seus produtos de degradação são os principais metabolitos encontrados na urina. Contudo, 83% de ciclofosfamida é encontrada na forma parental (Fent et al., 2006; Johnson et al., 2008). A carboxifosfamida não é propriamente tóxica, mas pode dar origem a *normitrogen mustard*, um potente agente alquilante, formado pela clivagem enzimática do resíduo de fosfamida da carboxifosfamida (Anderson et al., 1995). As reações de *normitrogen mustards* com nucleótidos e nucleosídeos é muito semelhante à reação da ciclofosfamida (Anderson et al., 1995). Acredita-se que a especificidade terapêutica seletiva da ciclofosfamida para as células cancerígenas é devida à estabilidade da 4-O-HCP/ aldofosfamida ao pH fisiológico. Funciona como molécula de transporte para a fosforamida reativa e, também devido a níveis mais baixos do ALDH em células cancerígenas em comparação com as células normais, o que resulta numa oxidação mais lenta da 4-OHCP para a 4-ceto-ciclofosfamida não tóxica. A expressão de ALDH é o principal determinante da sensibilidade das células (cancerígenas e normais) à ciclofosfamida (Emadi et al., 2009).

A mostarda de fosforamida é o agente alquilante ativo que induz aductos no ADN. Tem um tempo de meia-vida de 40 minutos no organismo (Anderson et al. 1995) e a sua ação citotóxica está intimamente relacionada com a reatividade dos grupos cloroetilo ligados ao átomo de azoto central. Sob condições fisiológicas, as mostardas de azoto sofrem ciclização intramolecular através da eliminação do cloreto para formar um intermediário reativo de aziridínio que é facilmente atacado por vários nucleófilos, como os resíduos de guanina (Figura 1.5) (Emadi et al., 2009). A mostarda de fosforamida forma mono-aductos que substituem o N7 da Guanina quando reagem com a guanosina, a desoxiguanosina e a guanosina-S-monofosfato (P. Brookes & Lawley, 1961). A mostarda fosforamida reage com a guanosina-5'-monofosfato e forma três tipos de aductos (Vu, 1981).

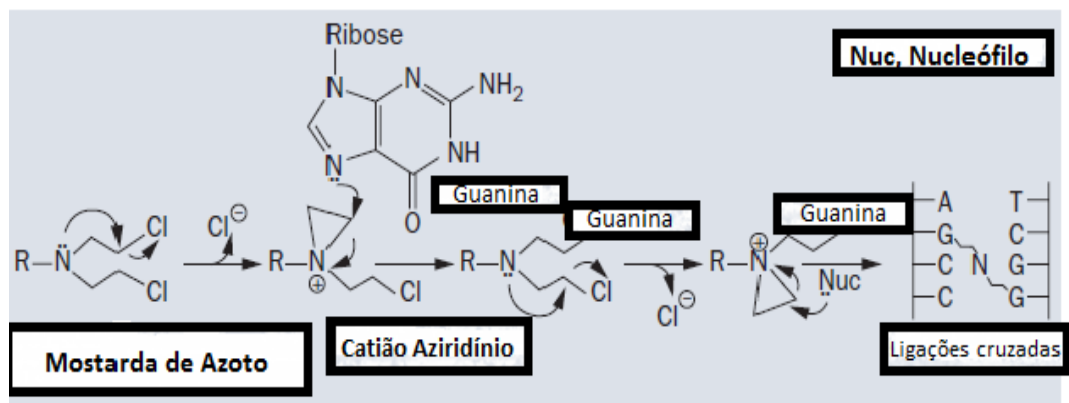


Figura 1.13: Ação citotóxica da mostarda de azoto através da formação de ligações cruzadas no ADN. Adaptado de Emadi et al. (2009).

As ligações cruzadas são capazes de bloquear a replicação do ADN e, são assim consideradas responsáveis pela ação citotóxica deste composto (Anderson et al., 1995).

1.3.2- Toxicidade

A ativação da ciclofosfamida também é responsável por desencadear efeitos tóxicos tais como o desenvolvimento do segundo cancro, má formação fetal de entre outros efeitos (Hales, 1981). Outro fator importante de toxicidade diz respeito á dose administrada da ciclofosfamida que, quando em excesso também é responsável pela supressão da medula óssea, toxicidade cardíaca e gonadal, cistite hemorrágica e carcinogénese (Emadi et al., 2009).

Um dos produtos metabólicos finais, a acroleína, pode apresentar efeitos tóxicos pois, ela induz stress oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), que provocam danos ao ADN de células normais e, conseqüente toxicidade em vários órgãos. Entra rapidamente nas células e, ativa ROS intracelulares e a formação de óxido nítrico levando a formação de peroxinitrito o qual, reage com lípidos, proteínas e ADN dentro das células resultando no dano dos mesmos (Tripathi & Jena, 2009). A ação da acroleína pode contribuir para a cistite hemorrágica da bexiga (Hales, 1982; Weber & Waxman, 1993). Outros sítios importantes de toxicidade são o pulmão e o ovário (Ataya et al., 1990; Patel, 1990).

1.4-Fármacos libertados para o ambiente aquático

Cerca de 3000 substâncias diferentes são utilizadas na medicina humana na União Europeia e, uma parte dos resíduos resultantes do consumo desses fármacos são libertados para o ambiente (Fent et al., 2006). De facto, resíduos de fármacos oriundos de unidades de prestação de cuidados de saúde pública ou privada, incluindo os cuidados domiciliários, podem constituir um importante problema ambiental e de saúde pública quando não tratados devidamente. Existem empresas especializadas na triagem de resíduos hospitalares sólidos e líquidos exatamente no local da sua produção e, são classificados de acordo com risco biológico que oferecem. Os resíduos hospitalares sólidos considerados perigosos são normalmente incinerados enquanto que os líquidos são contentorizados e tratados por empresas especializadas no seu tratamento. Esta operação é bastante delicada pois, dela depende a redução dos riscos para a saúde e para o ambiente. Contudo, por diversas razões, não é possível atingir 100% de eficácia no que toca ao tratamento desses resíduos (Direção-Geral da Saúde, 1972). Os resíduos líquidos que, não são devidamente tratados nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) acabam por ser libertados no ambiente (Christen et al., 2010).

O aumento do consumo de fármacos, juntamente com o recente desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis levaram à identificação de produtos farmacêuticos no ambiente sendo atualmente considerados como sendo contaminantes emergentes no ambiente (Martin-Diaz et al., 2009). Estes fármacos foram concebidos para terem um modo de ação específico, e muitos demonstram uma persistência no ambiente devido a sua constante libertação (Tabela 1.2) (Christen et al., 2010).

O crescimento populacional, a urbanização, o envelhecimento das populações, a prestação mais eficaz de serviços de saúde contribuem ainda mais para o aumento do consumo de fármacos e para a libertação destas substâncias em águas interiores e costeiras urbanas (Franzellitti et al., 2015). Por isso quantidades significativas de contaminantes emergentes são transportados para áreas costeiras através de estuários e, alguns efluentes das estações de tratamento de águas residuais são descarregados diretamente na água do mar (Fenet et al., 2014; Jiang et al., 2014).

Na última década, compostos farmacêuticos foram detetados em baixas concentrações em muitos países, em efluentes de tratamento de águas residuais, águas

subterrâneas, águas superficiais e água do mar (Fent et al., 2006). As concentrações medidas são geralmente da ordem dos $\text{ng}/\mu\text{g L}^{-1}$ em que as maiores concentrações são encontradas nas ETAR, mas como a remoção destes compostos não é completa estes compostos têm sido encontrados em rios, lagos e água do mar (Fent et al., 2006; Kolpin et al., 2002). Alguns fármacos encontrados no ambiente aquático estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.4: Concentrações ambientais de alguns fármacos consumidos mundialmente

Fármacos	Efluentes ($\mu\text{g/L}$)	ETAR ($\mu\text{g/L}$)	Máxima remoção (%)	Referências
Analgésicos e Anti-Inflamatórios				
Ácido acetilsalicílico	3,2	0,6	81	(Ternes et al., 1999)
Ácido salicílico	57	0,05	99	(Metcalf et al., 2003a)
Ibuprofeno	2-3	0,6-0,8	53-79	(Tauxe-Wuersch et al., 2005)
Anticancerígenos				
Ifosfamida	0,007-0,029	0,010-0,043	0	(Kummer et al., 1997)
Tamoxifeno	0,15	0,20	0	(Roberts & Thomas, 2005)

Em suma, na última década a comunidade científica tem vindo a desenvolver uma melhor compreensão das consequências biológicas que esses resíduos causam aos ecossistemas aquáticos e, tornou-se uma prioridade de investigação, dado o aumento do conhecimento sobre a ocorrência e distribuição generalizada destes contaminantes em todo o mundo (Toufexi et al. 2013).

4.1-Libertação de quimioterapêuticos para o ambiente aquático

A gestão integrada dos resíduos hospitalares produzidos nas unidades de prestação de cuidados de saúde reside no seu tratamento correto. Contudo, há, na maior parte das vezes grandes dificuldades em atingir 100% de eficácia, devido a razões de exequibilidade prática (Direção-Geral da Saúde, 1972). Sendo assim partes desses resíduos incluindo os metabolitos e fármacos na sua forma parental excretados pelos pacientes tratados com quimioterapia não são devidamente eliminados sendo, posteriormente detetados nos efluentes (Figura 1.6). Ainda há que ter em conta que uma parte dos pacientes (57%) fazem a quimioterapia em ambulatório (O'Neill & Twelves, 2002) a fim de evitar a hospitalização (Borras et al., 2001) e, os produtos da excreção não recebem nenhum tratamento especializado e, são encaminhados diretamente para os efluentes urbanos e depois para as estações de tratamento de águas residuais onde não são completamente removidos (Christen et al., 2010).

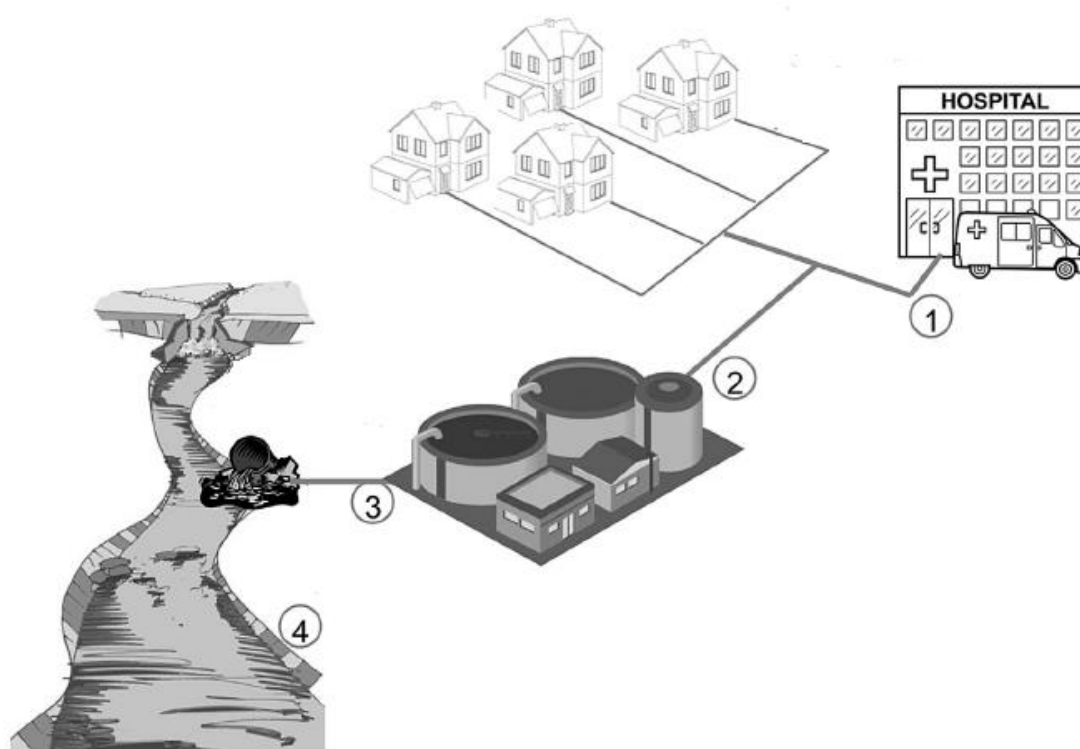


Figura 1.14: Exemplos de fontes de resíduos líquidos hospitalares de um sistema urbano: 1) Efluentes hospitalares e domésticos; 2/3) Efluentes de águas residuais/ETAR; 4) introdução no rio. Adaptado de Ferrando-Climent et al. (2014).

A problemática na remoção completa destes fármacos é muitas vezes esperada, pois a maior parte dos fármacos citotóxicos têm baixa pressão de vapor e, por isso, a probabilidade de se volatilizarem é muito baixa. Após serem metabolizados (hidroxilação), os quimioterapêuticos tornam-se mais hidrofílicos com o objetivo de serem excretados pela urina. Por se tornarem hidrofílicos, não são facilmente absorvidos pela lama e, são altamente solúveis porque apresentam valores de log Kow (a proporção da sua concentração em octanol e sua concentração na fase aquosa muito) reduzidos (< 1). De ressaltar ainda que, algumas das moléculas constituintes dos quimioterapêuticos contêm átomos de halogéneo que são conhecidos por serem um problema à biodegradação. Deste modo, estes fármacos passarão inalterados pelas ETAR (Fent et al., 2006; Kosjek & Heath, 2011; Rowney et al., 2009).

A Tabela 1.3 indica as diferentes concentrações de alguns anticancerígenos antes e depois de passarem por ETARs. As concentrações encontradas em águas superficiais deve-se a remoção incompleta.

Tabela 1.3: Concentrações de anticancerígenos medidos em efluentes/ETAR e em águas superficiais.

Fármaco	Efluentes hospitalares (ng/L)	Entrada da ETAR(ng/L)	Saida da ETAR (ng/L)	Águas superficiais (ng/L)	Referências
Ciclofosfamida	<2-4500	<6-143	<6<20	2,2-10,1	(Buerge et al., 2006)
Ifosfamida	<2-10,647	<0,3-13,100	1,2-2900	<0,5-41	(Valcarcel et al., 2011)
Gencitabina	<0,9-38	9,3	7,0	2,4	(Martin et al., 2011)

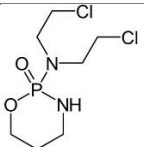
1.5- Efeito toxicológico da ciclofosfamida em organismos aquáticos

A ciclofosfamida foi concebida por ter uma atividade biológica em moléculas específicas e, muitos alvos terapêuticos (células e biomoléculas) são evolutivamente conservados em organismos aquáticos (Fent et al., 2006; Martin-Diaz et al., 2009). Assim

torna necessária a identificação de propriedades químicas associadas a interações celulares/ moleculares que provocam respostas adversas em organismos aquáticos a concentrações ambientalmente relevantes (Franzellitti et al., 2015; Schmitt et al., 2009).

Níveis de ciclofosfamida superiores a 100 ng L⁻¹ foram detetados em efluentes urbanos que recebem resíduos hospitalares (Ferrando-Climent et al., 2014; Kümmerer et al., 1997; Meyer, 1997). Na Tabela 1.4 encontram-se algumas propriedades físico-químicas da ciclofosfamida que explicam que o porque da sua remoção nas ETAR não ser completa (Booker et al., 2014).

Tabela 1.4:Propriedades físico-químicas da ciclofosfamida. Adaptado de Rowney et al. (2009).

Fármaco	Estrutura	Administração	Solubilidade em água (g/L) 19-25°C log Kow	Pressão de vapor (mmHg) a 25°C
Ciclofosfamida		>75% oral e intravenosa	0,1-0,5	4,45 E -05

Estudos toxicológicos em organismos aquáticos têm sido feitos utilizando uma gama de fármacos (Gacic et al., 2014; Gonzalez-Rey & Bebianno, 2014; Gonzalez-Rey et al., 2014). Contudo, fármacos anticancerígenos têm recebido menor atenção mas, caracterizam-se por terem uma elevada potência farmacológica e possuírem muitas propriedades que podem induzir alterações genéticas e do ciclo celular subtis na fauna (Ferrando-Climent et al., 2014)

Estes contaminantes, mesmo em concentrações baixas, entram em contacto com diversos organismos marinhos não-alvo (Jiang et al., 2014). Provocam em muitos organismos marinhos um conjunto de alterações citotóxicas que podem provocar, a longo prazo, alterações no ecossistema (Nazar et al., 2008). Estudos de biomonitorização utilizando vários fármacos como por exemplo a fluoxetina e o propranolol (fármacos antidepressivos e anti-hipertensivos respectivamente) foram realizados em bivalves

(organismos marinhos não-alvo). O compartimento lisossomal dos organismos expostos aos fármacos foi negativamente afetado e, houve bioacumulação desses fármacos nas glândulas digestivas desses animais (Franzellitti et al., 2015).

A ciclofosfamida, por sua vez, foi projetada para danificar o ADN (*single/double strand break*) e consequente morte celular. O potencial é o mesmo para os organismos não-alvo devido ao seu modo de ação. Praticamente todos os organismos eucarióticos são vulneráveis a danos quando de uma exposição crônica mesmo a níveis baixos (ng L^{-1}) (Kosjek & Heath, 2011). Mater et al. (2014) avaliaram os efeitos (viabilidade celular e genotoxicidade) causados devido a exposição a curto prazo (24-72 horas) de algas e bactérias à quimioterapêuticos (administrados separadamente ou em misturas de quimioterapêuticos) incluindo a ciclofosfamida a diferentes concentrações entre $\text{ng/}\mu\text{g L}^{-1}$. Danos no ADN só foram observados quando da exposição de ambas as espécies à doses crescentes de misturas de quimioterapêuticos.

Biomarcadores como o dano oxidativo foram avaliados em espécies aquáticas quando da exposição a ciclofosfamida (Buerge et al., 2006). Esses resultados realçam a necessidade da aplicação de estudos ecotoxicológicos utilizando os quimioterapêuticos.

1.6- Utilização de biomarcadores na medição de poluentes em organismos aquáticos

Biomarcadores caracterizam-se por serem medidas efetuadas nos líquidos, células ou tecidos biológicos que indicam, a presença de contaminantes ou a magnitude da resposta dos organismos aos seus efeitos (Gonzalez-Rey & Bebianno, 2012; Regoli & Principato, 1995; Vidal-Liñán & Bellas, 2013).

O principal objetivo de se usarem biomarcadores é a identificação precoce (antes que um impacto irreversível aconteça) de possíveis efeitos tóxicos relativamente ao tempo de exposição a xenobióticos e a respetiva concentração a que os organismos estiveram expostos (Van der Oost et al., 2003).

Biomarcadores para avaliar a neurotoxicidade, genotoxicidade e a indução de danos celulares e oxidativos são frequentemente utilizados na monitorização do impacto ecotoxicológico de vários poluentes em ambientes aquáticos (Nazar et al., 2008).

1.6.1- Stress oxidativo

Organismos vivos, em condições fisiológicas normais, geralmente apresentam um equilíbrio redox (oxidação- redução) determinado pela produção de ROS e pelas propriedades antioxidantes das células, que impedem o stress oxidativo.

O stress oxidativo é definido como o conjunto de efeitos prejudiciais devidos a ROS, tais como a formação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e OH^{\bullet} (Giulio et al., 1989). As células estão constantemente a sofrer um certo grau de oxidação, quer por anaerobiose, mutagénese espontânea ou mecanismos de autodefesa (Bejma & Li, 1999). Consequentemente, os organismos desenvolveram não só os sistemas de defesa antioxidante para protege-los contra os ROS, como também sistemas de reparação que impedem a acumulação de moléculas oxidativamente danificadas. Esses sistemas são constituídos por um conjunto de enzimas antioxidantes capazes de catalisar a primeira linha de defesa contra os ROS (Halliwell & Chirico, 1993) (Figura 1.7).

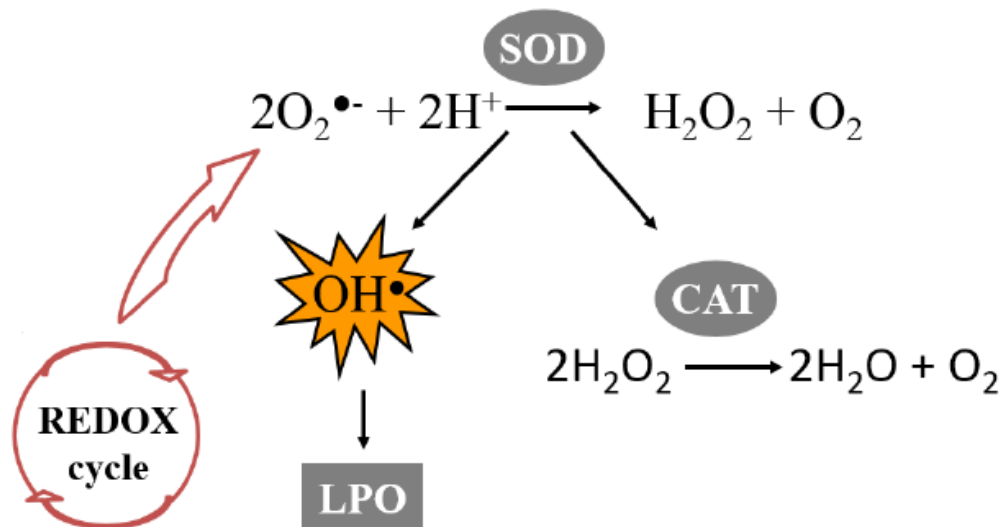


Figura 1.7: Alguns mecanismos resultantes da produção de ROS. SOD (Superóxido dismutase)/ CAT (Catalase) - enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa contra as ROS. LPO (Peroxidação lipídica). Adaptado de Niki et al. (2005).

A GPx por exemplo, é responsável pela eliminação de peroxidases incluindo o H_2O_2 impedindo sua acumulação. O processo de eliminação do H_2O_2 catalisado pela peroxidase GPx necessita de outras moléculas redutoras tais como a SOD e a Glutathione Redutase

(GR) (Figura 1.8). A GPx auxilia na conversão de H₂O₂ em H₂O, envolvendo uma oxidação concomitante de glutathiona reduzida (GSH) em sua forma dissulfeto oxidada (GSSG) (Worthinton & Rosemeyer, 1974).

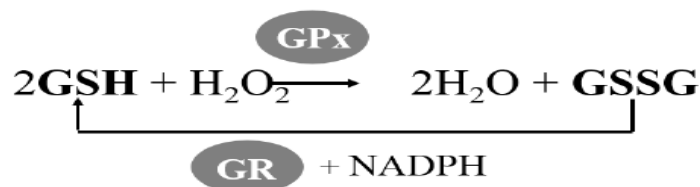


Figura 1.8: Oxidação da GSH em GSSG catalizada pela peroxidase GPx. GR- Glutathiona redutase; NADPH- Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina.

A enzima GR, como o próprio nome sugere, está envolvida na transformação do GSSG na forma reduzida GSH usando o NADPH como cofator. A GSH pode atuar diretamente para neutralizar moléculas oxidantes e também como um cofator usado pela GST, aumentando a solubilidade dos compostos xenobióticos em água (Egaas et al., 1995).

No entanto, muitos xenobióticos intensificam a produção de ROS e, diminuem a atividade antioxidante dos organismos, conduzindo a alterações no equilíbrio redox (Stankiewicz et al., 2002).

1.6.2-Enzimas de biotransformação

Muitos poluentes, ou os metabolitos que deles derivam, podem induzir stress oxidativo, aumentando a produção de ROS e, perturbando a homeostase do organismo. Estes poluentes podem ser desintoxicados, e os efeitos de ROS minimizados, através da atividade de várias enzimas e cofatores (Giulio et al., 1989). Contudo, variações nas taxas de atividade de enzimas de biotransformação são biomarcadores extremamente sensíveis e os xenobióticos provaram causar alterações nestas enzimas (Van der Oost et al., 2003).

A GST é classificada como um enzima de biotransformação. Atua na fase II da desintoxicação. Catalisa o processo de conjugação de compostos xenobióticos ou dos seus

metabolitos com um ligando endógeno (Van der Oost et al., 2003). Mais concretamente conjuga o grupo tiol da GSH com os xenobióticos eletrofilicos e, assim, protege as células contra os efeitos mutagénicos, carcinogénicos (Burton & Ingold, 1981) e, facilita a excreção de produtos tóxicos através da adição de um grupo mais polar como a GSH à molécula (Figura 1.9).

A GST desempenha uma função fundamental na defesa contra danos oxidativos e produtos peroxidativos de ADN (Van der Oost et al., 2003).

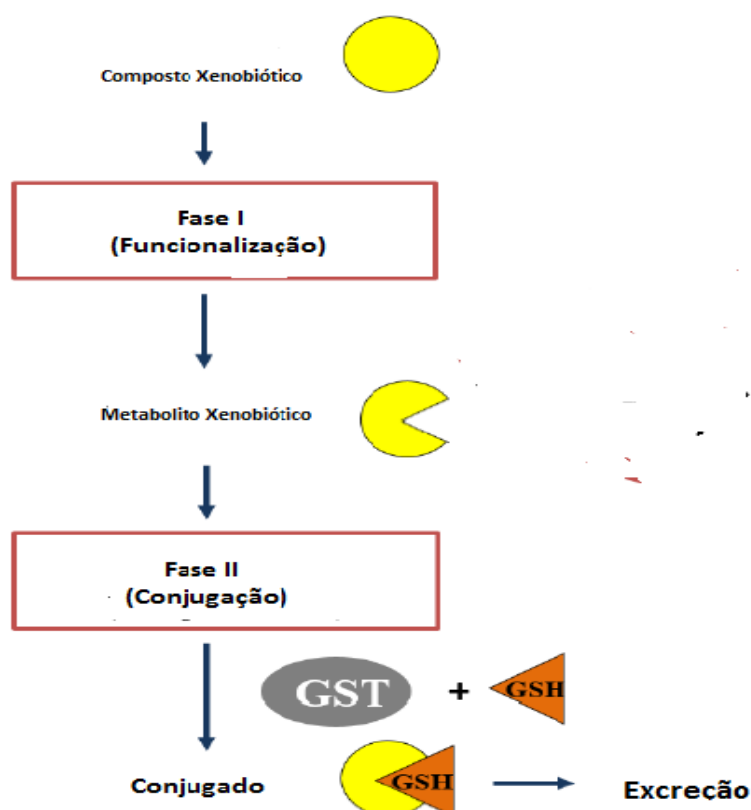


Figura 1.9: Ação exercida pela GST durante o processo de bio transformação de xenobióticos.

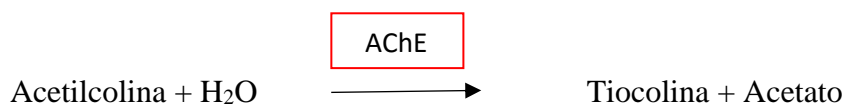
1.6.3-Neurotoxicidade

A Acetilcolinesterase (AChE) é um importante biomarcador da função neuronal, envolvida na inibição da acetilcolina nas terminações nervosas através da hidrólise da mesma em colina e ácido acético, o que previne a ação contínua dos nervos, e funcionamento adequado dos sistemas sensoriais e neuromusculares (Cajaraville et al.,

2000; Payne et al., 1996). Existe predominantemente no tecido cerebral, mas também, por exemplo, nos músculos, fígado e sangue (Solé et al., 2008).

A inibição da atividade da AChE conduz à acumulação de acetilcolina, à hiperestimulação dos recetores nicotínicos e muscarínicos e à perturbações na neurotransmissão. Esse conjunto de alterações causa inúmeras anomalias que eventualmente podem conduzir a morte (Bruinink et al., 2002).

A AChE tem uma atividade catalítica elevada. Degrada cerca de 25000 moléculas de acetilcolina por segundo, aproximando-se da velocidade de uma reação controlada por difusão (Colovic et al., 2013). A reação catalizada pela AChE está representada no esquema que se segue (Equação.1.2).

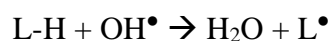


(Equação.1.2)

Devido à sua alta sensibilidade a contaminantes orgânicos frequentemente presentes em ecossistemas, a medida da atividade de AChE tem sido amplamente utilizada em estudos de monitorização da poluição como um biomarcador de efeito (Van der Oost et al., 2003).

1.6.4- Peroxidação lipídica

O metabolismo do oxigênio nas mitocôndrias origina uma grande quantidade de ROS. Esses radicais altamente reativos, como OH^\bullet , frequentemente interagem com moléculas biológicas incluindo lípidos, sequestram o hidrogênio destas e induzem à peroxidação lipídica (LPO) (Equação. 1.3) (Winston & Di Giulio, 1991).



(Equação.1.3)

O sequestro de elétrons nos lípidos das membranas celulares por radicais livres é uma das principais perturbações bioquímicas utilizadas como biomarcador de dano oxidativo (Niki et al., 2005). As lesões celulares resultantes do dano oxidativo também dependem do grau de dano que ocorre, por quanto tempo e a natureza do sistema onde foi induzido tal dano (Halliwell & Chirico, 1993).

A exposição à xenobióticos normalmente desencadeiam a produção excessiva de ROS. Esse excesso impede o sistema antioxidante de neutralizar todas essas espécies reativas resultando na acumulação de danos celulares nomeadamente a LPO (Halliwell & Chirico, 1993; Van der Oost et al., 2003). Os produtos finais resultantes da LPO geralmente consistem em aldeídos, acetona e malondialdeído (MDA) formados através da decomposição de certos produtos de peroxidação lipídica (De Zwart et al., 1997) (Figura 1.10).

Ácidos gordos polinsaturados

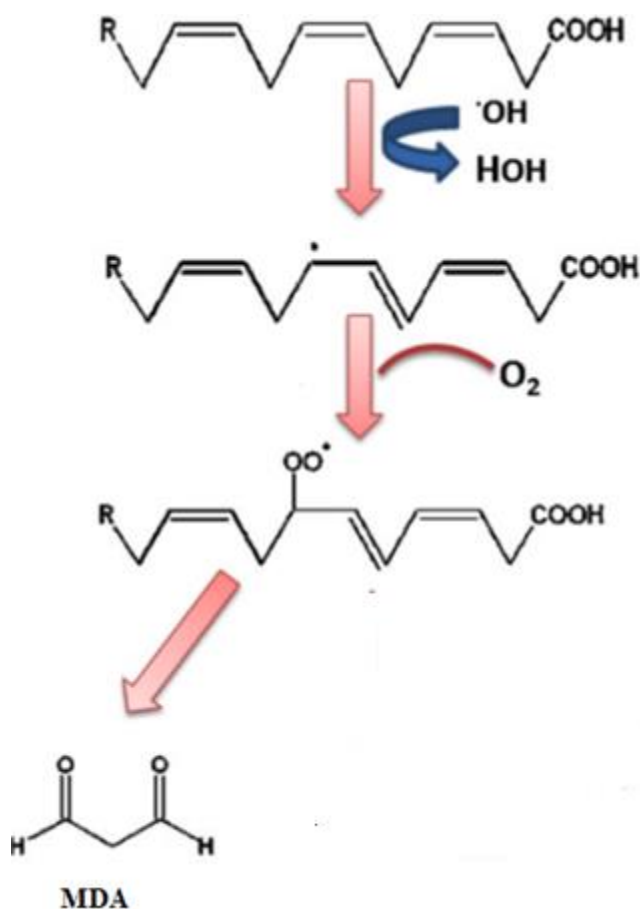


Figura 1.10: Processo de LPO e a formação de seus produtos finais. MDA (Malondialdeído).

1.6.5- Viabilidade celular

A estimativa rápida e precisa da viabilidade celular é vital para uma cultura bem sucedida de células e tecidos e também para a avaliação das propriedades citotóxicas ou toxicológicas de compostos utilizados experimentalmente (Altman et al., 1993).

O ensaio com o corante azul de tripano (TB) é o teste mais utilizado para avaliar a viabilidade celular. O corante tem a capacidade de penetrar nas membranas de células não-viáveis e deixá-las com uma coloração azul quando observadas ao microscópio enquanto que, as células viáveis mantêm-se intocadas pelo corante. Isto acontece porque

as células não-viáveis não possuem uma membrana celular funcional pelo que permitem a entrada do corante dentro das células e assim torna-se possível distinguir as não-viáveis (com coloração azul) das viáveis. Contudo, a utilidade deste procedimento é limitada uma vez que o número de células com coloração azul aumenta após a adição do corante, exigindo que as células sejam contadas num curto espaço de tempo (3-5 minutos) (Tennant, 1964).

1.6.6- Estabilidade da membrana lisossomal

O compartimento lisossomal é constituído pelos lisossomas primários, vesículas auto/ heterofágicas, lisossomas secundários (fagossomas) e os corpúsculos residuais. Os lisossomas são organelos citoplasmáticos de membrana única que contêm mais de 40 classes diferentes de enzimas hidrolíticas (tais como proteases, nucleases, lipases, etc) com atividades ótimas a um pH ácido. Estas enzimas são capazes de hidrolisar essencialmente todas as moléculas biológicas, desde proteínas, ácidos nucleicos e nucleótidos a açúcares complexos e lípidos (Nazar et al., 2008).

Os lisossomas estão envolvidos nos mecanismos de defesa celular e na proteção contra os agentes tóxicos. Por vezes, durante os mecanismos de defesa contra os xenobióticos, ocorrem algumas modificações físico-químicas que levam a perda da integridade das membranas dos diversos componentes lisossomais podendo levar a consequente morte celular dos mesmos (Nazar et al., 2008).

Para analisar as modificações que ocorrem na membrana lisossomal aquando da exposição a xenobióticos, utiliza-se o ensaio de retenção do vermelho neutro. Baseia-se na retenção de vermelho neutro, um corante catiónico anfifílico e fraco, que permeia livremente a membrana celular. Uma vez sequestrado pela membrana lisossómica, o corante permanece retido dentro das células por protonização acumulando-se nesses organelos. O grau de captura deste marcador lisossómico depende do pH do lisossoma, bem como da eficiência da sua bomba de prótons associada à membrana (Repetto et al., 2008). Este ensaio reflete o efluxo do corante no citosol após danos na membrana e, possivelmente, comprometimento da bomba de iões H^+ . Qualquer comprometimento deste transporte ativo irá resultar numa redução da retenção do vermelho neutro dentro

dos lisossomas (Lowe et al., 1992). Portanto, o princípio da técnica consiste no fato de que os lisossomas de células saudáveis retêm maiores quantidades de vermelho neutro do que as células danificadas devido a ação de contaminantes os quais reduzem a estabilidade da membrana lisossomal.

1.6.7- Genotoxicidade

A avaliação dos danos ao ADN devido a exposição a xenobióticos é de extrema relevância devido à importância do ADN na manutenção da homeostase celular e na transmissão de informação genética entre as várias gerações (Gacic et al., 2014). Os biomarcadores mais comumente usados incluem medidas de danos ao ADN, tais como quebras no próprio ADN, micronúcleos (MN), aberrações cromossômicas e trocas de cromátidas irmãs (Rekhadevi et al., 2007). Para avaliar os danos que ocorrem no ADN usam-se normalmente as células do sistema sanguíneo (Gacic et al., 2014; Pavlica et al., 2001).

O ensaio cometa oferece vantagens consideráveis em relação a outros métodos citogenéticos para detecção de danos no ADN, como as aberrações cromossômicas e trocas de cromátidas irmãs uma vez que as células em análise não precisam ser mitoticamente ativas (Horváthová et al., 1998; Slameňová et al., 1997). Contudo, a associação entre o ensaio do cometa e os testes citogenotóxicos, principalmente com o teste do micronúcleo (MN) é indicada como uma mais-valia para uma análise mais realista dos efeitos genotóxicos uma vez que o ensaio do cometa alcalino permite a identificação de ruturas da cadeia de ADN (simples e duplas) e, o ensaio de MN determina os danos cromossômicos como por exemplo rutura do ADN e segregação anormal (Pavlica et al., 2000; Rocha et al., 2014).

1.7-Moluscos bivalves como bioindicadores

Os moluscos bivalves têm sido utilizados mundialmente como espécies sentinela em programas de monitorização de avaliação da qualidade ambiental (Gacic et al., 2014; Regoli & Principato, 1995). Entre os bivalves, os mexilhões do género *Mytilus*,

especialmente a espécie mediterrânea *Mytilus galloprovincialis* são o principal modelo de estudo que tem sido utilizado (Figura 1.11) (Cajaraville et al., 2000; Katsumiti et al., 2014; Maren Ortiz-Zarragoitia, 2010).



Figura 1.11: Espécie *Mytilus galloprovincialis* utilizado neste estudo. (Representação em tamanho real).

Os mexilhões filtram grandes volumes de água contendo materiais suspensos e coloides de que se alimentam. Contaminantes dissolvidos e adsorvidos a essas partículas acabam por ser ingeridos conjuntamente. Tais animais possuem baixa capacidade de metabolizar compostos xenobióticos e, tendem a acumulá-los em níveis elevados (Maren Ortiz-Zarragoitia, 2010).

Os mexilhões são relativamente tolerantes a altos níveis de poluentes pelo que tendem a demonstrar respostas de adaptação biológica (Gómez-Mendikute et al., 2005). São indicadores adequados dos níveis de contaminação e dos seus efeitos no ambiente marinho (Ortiz-Zarragoitia, 2010) pois podem acumular inúmeros poluentes através das brânquias (substâncias dissolvidas) e, através do trato digestivo (substâncias adsorvidas em partículas) (Franzellitti et al., 2015).

Os bivalves filtram as partículas em suspensão usando as brânquias. Os filamentos branquiais são constituídos por células epiteliais ciliadas e não ciliadas. As partículas de alimento aprisionadas pelas brânquias são movidas para os palpos labiais e pela boca, assim, entrando na glândula digestiva, onde ocorre a digestão extracelular e intracelular,

respetivamente (Canesi et al., 2012; Gómez-Mendikute et al., 2005). A glândula digestiva do mexilhão é um tecido de escolha para detetar sinais precoces da exposição a vários tóxicos, uma vez que a acumulação de contaminantes e o metabolismo de compostos hidrofóbicos atingem o seu pico neste órgão. A glândula digestiva é indicada para se analisar os efeitos farmacêuticos, tal como sugerido em resultados anteriores nos parâmetros terapêuticos e toxicológicos e no potencial de bioacumulação do órgão. Os compostos farmacêuticos tendem, preferencialmente, a acumularem-se na glândula digestiva de mexilhões expostos onde o medicamento afeta significativamente alguns parâmetros lisossômicos (Franzellitti et al., 2015).

Os nutrientes, após atingirem as glândulas digestivas são transferidos para o sistema circulatório representado pela hemolinfa a partir da qual são levados para os diferentes tecidos. As células responsáveis pelo transporte são os hemócitos os quais desempenham as funções do sistema imunitário em bivalves juntamente com fatores solúveis da hemolinfa, que operam de forma coordenada para proteger dos microrganismos invasores (Ruiz et al., 2015).

Os hemócitos do *Mytilus* assemelham-se à estrutura e função da linhagem de monócitos/macrófagos dos mamíferos. São responsáveis pela imunidade mediada por células através da fagocitose e, várias reações citotóxicas (tais como libertação de peptídeo antimicrobiano e produção de oxirradicais). O soro de hemolinfa contém fatores humorais de defesa como as letinas solúveis, as enzimas hidrolíticas e os peptídeos antimicrobianos (Canesi et al., 2012).

Apesar dos hemócitos dos bivalves serem muito heterogêneos, em *Mytilus spp.* os hemócitos granulares apresentam-se como o tipo celular dominante. Eles são caracterizados por terem uma baixa relação núcleo/citoplasma, elevada atividade fagocitária e capacidade de produção de oxirradical (García-García et al., 2008). Nestas células, tal como nos imunócitos dos mamíferos, a resposta imune é modulada pelo estado de ativação de algumas vias de sinalização rápidas que envolvem o recetor de tirosina, como a via do MAPK, (-i.e *Mitogen Activated Protein Kinase*), em particular as MAPK ativadas pelo estresse tais como o p38 e a (Proteína Cinase C) PKC (Canesi et al., 2012). Os hemócitos por estarem envolvidos na primeira linha de defesa são bastante úteis para

avaliar a genotoxicidade e a morte celular provocada pela exposição a diversos contaminantes (Canesi et al., 2012; Gacic et al., 2014; Katsumiti et al., 2014)

A avaliação toxicológica em mexilhões tem sido feita utilizando diferentes contaminantes como nanopartículas e diversos tipos de fármacos (anti-inflamatórios, antiepiléticos, anticancerígenos) (Gacic et al., 2014; Gonzatez-Rey et al., 2012; Martin-Diaz et al., 2009; Rocha et al., 2014). Efeitos genotóxicos foram verificados em mexilhões de água doce expostos a concentrações ambientais relevantes ($52 \mu\text{g L}^{-1}$) do anti-metabolito 5-fluorouracil (5-Fu), o qual induziu aumento significativo de danos no ADN (Gacic et al., 2014).

1.8- Análise *in vitro*

Os biomarcadores utilizados nos estudos ecotoxicológicos para aceder aos sinais de alerta precoce da presença de contaminantes em ambientes aquáticos são ferramentas importantes para avaliar os efeitos tóxicos em organismos aquáticos. A acumulação de contaminantes nos tecidos dos mexilhões permite aceder a estudos de toxicidade *in vivo* bastante realísticos (Almeida et al., 2013; Canesi et al., 2012; M Gonzalez-Rey & Bebianno, 2014; Regoli & Principato, 1995; Rocha et al., 2014). Contudo, estudos *in vitro* em células de organismos aquáticos (organismos não-alvo) expostos a contaminantes ambientais são ainda pouco comuns mesmo possuindo inúmeras vantagens. Como vantagens, as técnicas *in vitro* são úteis para detetar e entender mecanismos de toxicidade de vários compostos e, comparar organismos diferentes (organismos alvo e não-alvo) a nível celular em condições semelhantes de exposição. Além disso, eles representam uma ferramenta rápida, de baixo custo e, uma redução no uso de animais em experiências laboratoriais.

Apesar das vantagens das técnicas *in vitro* em relação às técnicas *in vivo*, existem algumas limitações. Uma das principais limitações é a falta de concordância com a situação *in vivo* em relação ao metabolismo dos xenobióticos. Pelo que, uma avaliação completa e melhorada do metabolismo de xenobióticos requer tanto a abordagem *in vitro* como a abordagem *in vivo* (Coecke et al., 2006).

1.9- Objetivo do trabalho

Este trabalho tem como objetivo geral a avaliação do potencial impacto ecotoxicológico do fármaco anticancerígeno ciclofosfamida na espécie mexilhão marinho *Mytilus galloprovincialis*, e comparar os resultados com os efeitos causados em linhas celulares humanas.

a) Análise *in vivo* dos eventuais efeitos toxicológicos que as concentrações de ciclofosfamida encontradas no ambiente aquático podem causar em diferentes tecidos e células da espécie acima mencionada.

b) Comparar os efeitos toxicológicos provocados por essas concentrações de ciclofosfamida em células (hemócitos) de *M. galloprovincialis* (organismo não-alvo) com os efeitos causados em diferentes linhas celulares humanas (organismo alvo).

2 - Materiais e Métodos

2.1- Preparação da solução de ciclofosfamida

O padrão analítico de ciclofosfamida (CAS C0768) utilizado nas experiências foi obtido através da Sigma (Portugal). Algumas das propriedades químicas da ciclofosfamida utilizada estão descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Propriedades químicas da Ciclofosfamida utilizada.

Fórmula química	C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P · H₂O
Peso molecular	279,10
Ponto de fusão	49°C - 51°C
Log Kow	0,63

A solução padrão do fármaco foi preparada em água ultrapura (Milli-Q) (5 mg L⁻¹), seguida de sucessivas diluições em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM) (constituído por sais orgânicos, aminoácidos e vitaminas, pH 7,4), para a exposição de hemócitos de *M. galloprovincialis* (experiência *ex vivo*) e linhagens celulares humanas (cancerígenas e imortalizada) (experiência *in vitro*).

As concentrações das soluções usadas na exposição *ex vivo* em células de mexilhões e na exposição *in vitro* em linhas celulares humanas basearam-se em níveis ambientais previamente determinados no ambiente aquático (*i.e.* efluentes e águas superficiais), nomeadamente 1000 ng L⁻¹, 500 ng L⁻¹, 250 ng L⁻¹, 100 ng L⁻¹ e 50 ng L⁻¹. Durante o trabalho experimental, a manipulação do fármaco e respetivas soluções foi realizada em cabine de fluxo, com uso de equipamento de proteção individual (bata impermeável descartável, luvas).

Para a exposição *in vivo* preparou-se uma solução padrão (20 mg L⁻¹) de ciclofosfamida em água ultrapura (Milli-Q).

2.2- Ensaio *in vitro* com linhas celulares humanas

A viabilidade celular foi acedida através do ensaio do vermelho neutro. Baseia-se na retenção do corante vermelho neutro que, atravessa livremente a membrana celular. O princípio da técnica consiste no fato de que os lisossomas de células saudáveis retêm maiores quantidades de vermelho neutro do que as células danificadas devido a ação de contaminantes os quais reduzem a estabilidade da membrana lisossômica.

Usaram-se duas linhas celulares (uma imortalizada e outra cancerígena) provenientes do grupo ATCC e, que foram mantidas congeladas em laboratório. Uma linha de células do epitélio pigmentado da retina (RPE) caracterizada pela expressão ectópica do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), que confere imortalidade replicativa através da manutenção do tamanho dos telómeros sem causar alterações neoplásicas às células (Yang et al., 1999). A linha celular cancerígena utilizada pertence a células HeLa derivada de células do cancro cervical (Patel et al., 2009).

As duas linhas celulares foram descongeladas e mantidas em meio de cultura DMEM. Quando se obteve o número de células necessárias, o meio de cultura foi retirado seguido de lavagem das células com PBS. As células foram soltas por tripsinização e a

contagem das células foi efetuada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. O volume total foi posteriormente ajustado com DMEM para se inocular 100 µl de suspensão celular (2×10^4 células) em microplaca. As amostras foram incubadas durante 24 horas, a 36 °C, para a adesão das células ao fundo das microplacas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido, seguido de adição da solução de DMEM no grupo controlo, e DMEM contendo ciclofosfamida nas diferentes concentrações para o tratamento sob exposição. As células foram incubadas a 36°C, durante 24 horas. Após o período de exposição, removeu-se o meio e adicionou-se 50 µl de solução de vermelho neutro previamente diluída (0,4 %; pH 7) a partir da solução padrão (SIGMA N7005). As microplacas contendo as células e o corante foram incubadas durante 1 hora a 36°C. De seguida o corante foi removido e as células lavadas com PBS, com posterior incubação em solução constituída por ácido acético e etanol (1/1), durante 20 minutos, a 36°C. O sobrenadante foi transferido para novas microplacas e, a absorvância lida a 550 nm em leitor de microplacas (infinite M200Pro, TECAN®).

2.3- Ensaio ex vivo com *M. galloprovincialis*

2.3.1 – Recolha de *M. galloprovincialis*

Mexilhões *M. galloprovincialis* (n=60), com comprimentos de concha entre 4,5 e 5,5 cm, foram recolhidos na Ria Formosa (Ilha de Faro, Sul de Portugal, Figura 2.1). A Ria Formosa é uma lagoa rasa de 55 km de comprimento, formada por ilhas. Durante cada ciclo de maré há uma troca de 50 à 75% de água com o Oceano Atlântico (Almeida et al., 2013). Após a recolha os animais foram acondicionados em caixas térmicas para imediato transporte dos organismos vivos para o laboratório.

Os animais foram aclimatados durante 48 horas, em tanques de vidro contendo 20 litros de água do mar (salinidade 34) numa proporção de 1 animal 0,33 L⁻¹, sob arejamento constante.



Figura 2.1: Local da recolha dos mexilhões (Ria Formosa - Faro).

2.3.2- Extração da hemolinfa

Para os procedimentos da viabilidade celular realizados, recolheu-se 0,5 ml de hemolinfa do músculo adutor posterior dos mexilhões (n=3 animais por tratamento) (ver Figura 2.4), com auxílio de uma seringa (0,5 ml) adaptada a agulha hipodérmica (25G), em condições assépticas em câmara de fluxo vertical (Gómez-Mendikute & Cajaraville, 2003).

2.3.3- Viabilidade celular das células de *M. galloprovincialis*

Cerca de 10 μl da hemolinfa retirada de cada organismo foi diluída numa solução de anti-agregação no momento da análise (NaCl 171 mM, EDTA 24 mM, Tris 0,2 M e HCl 0,15% v/v) (Katsumiti et al., 2014). A utilização da solução de anti-agregação reduz a agregação natural dos hemócitos e facilita, portanto, a contagem dos mesmos. O volume de solução utilizada variou de modo a igualar a densidade de hemócitos entre as amostras (200 células μL^{-1}). À suspensão celular foi adicionado o corante TB (diluição 1:2) (Corning, 25-900Cl).

2.3.3.1- Ensaio com corante azul de tripano

O procedimento para o ensaio com o corante TB foi adaptado do protocolo de Altman et al. (1993). O TB é amplamente utilizado na avaliação de citotoxicidade, uma vez que penetra no citoplasma das células não-viáveis devido à perda de seletividade da membrana, o que lhes confere uma coloração azul. As células vivas, por sua vez, mantêm as propriedades funcionais da membrana e não sofrem coloração. Assim sendo, o número relativo de células viáveis e não-viáveis é obtido pela contagem de células em microscópio ótico, com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Equação. 2.1):

$$\%células\ vivas = \frac{n^{\circ}\ celulas\ vivas}{n^{\circ}\ celulas\ totais} \times 100$$

(Equação.2.1)

2.3.3.2- Retenção do corante Vermelho Neutro

Após a contagem das células com o auxílio do TB, preparou-se uma nova suspensão celular (hemolinfa diluída em solução de anti-agregação) de modo a obter-se $2 \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$ de solução. Aplicou-se 100 μl da suspensão celular em cada poço (6 replicados) da microplaca (96 poços, fundo plano). Em seguida, as microplacas foram centrifugadas a 270 g, durante 10 minutos, a 4°C, para favorecer a adesão das células ao fundo. O sobrenadante foi removido, seguido de adição de 100 μl do meio de cultura DMEM contendo diferentes concentrações de ciclofosfamida. As células foram incubadas a 18°C, durante 24 horas. Após o período de exposição, removeu-se o meio e adicionou-se 50 μl de solução de vermelho neutro previamente diluída (0,4 %; pH 7) a partir da solução padrão (SIGMA N7005).

As microplacas contendo as células e o corante foram incubadas durante 1 hora a 18°C. De seguida foram centrifugadas a 1200 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O corante foi removido e as células lavadas com PBS, com posterior incubação em solução constituída por ácido acético e etanol (1/1), durante 20 minutos, a 18°C. O sobrenadante foi, de seguida, transferido para outras microplacas de 96 poços (fundo arredondado) e

centrifugado a 1200 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi transferido para novas microplacas e, a absorvância lida a 550 nm em leitor de microplacas (infinite M200Pro, TECAN®).

O procedimento para a viabilidade celular utilizando o corante vermelho neutro foi adaptado de Katsumiti et al. (2014) e Olabarrieta et al. (2001).

2.4- Ensaio *in vivo* com *M. galloprovincialis*

Para o ensaio *in vivo* foram recolhidos, na Ria Formosa, cerca de 300 mexilhões da espécie *M. galloprovincialis*. No laboratório os organismos foram separados por 4 aquários de 20 litros contendo água salgada proveniente da Ria Formosa (74 animais por aquário), os quais foram mantidos em arejamento constante ao longo de toda a experiência (Figura 2.2).



Figura 2.2: Sistema de exposição *in vivo* do mexilhão *M. galloprovincialis*.

Os animais foram aclimatados durante 7 dias, com troca de água diária seguida de alimentação com algas (20% *Tetraselmis chuii*). A salinidade e o pH foram medidos durante toda a experiência (salinidade: 37±38; pH: 7,62).

Após o período de aclimação, os 4 aquários contendo os mexilhões foram divididos em dois grupos. Em 2 aquários os mexilhões foram mantidos somente em água do mar (controle) e nos outros 2 foram adicionados 1000 µL de solução perfazendo um

volume final de 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida em cada tanque. A solução inicial de ciclofosfamida foi previamente preparada tal como descrito em 2.1.

O ensaio teve a duração de 14 dias tendo a água do mar sido trocada de dois em dois dias e a contaminação repostada. Durante os 14 dias, foi registrada a morte de apenas um mexilhão no aquário contendo ciclofosfamida, após três dias de exposição.

Após 0, 3, 7 e 14 dias de exposição recolheram-se mexilhões (n=80 por dia de amostragem) dos tanques não contaminados e contaminados com ciclofosfamida para serem utilizados nas diferentes análises.

2.4.1- Extração da hemolinfa

Após cada dia de recolha foi retirado do músculo adutor de cada animal (n=32), cerca de 0,5 ml de hemolinfa de cada mexilhão com auxílio de uma seringa (0,5 ml) adaptada a agulha hipodérmica (25G), destinando-se uma alíquota para determinar a genotoxicidade através do ensaio do cometa e a outra para avaliar a viabilidade celular com TB e vermelho neutro.

2.4.1.1-Ensaio de viabilidade celular com TB e vermelho neutro

Para a viabilidade celular, usou-se a hemolinfa recolhida nos respetivos tempos de amostragem. O isolamento dos hemócitos baseou-se na modificação do protocolo de Gomez-Mendikute & Cajaraville (2003). A seguir a viabilidade celular com TB foi analisada de acordo com o procedimento descrito em 2.2.3.1. Após a contagem das células com o TB, preparou-se uma nova suspensão celular à semelhança do descrito em 2.2.3.2. O procedimento para a viabilidade celular com o vermelho neutro baseou-se na modificação do protocolo retirado de Olabarrieta et al. (2001).

Centrifugou-se as microplacas durante 10 minutos, de seguida retirou-se o sobrenadante e adicionou-se, em cada poço, 50 µl de vermelho neutro. As microplacas foram deixadas a incubar a 18°C durante 1 hora para que o corante pudesse penetrar na

membrana das células. De seguida retirou-se o corante e lavou-se as células com PBS as vezes necessárias para que o excesso do corante fosse removido e, com pequenas centrifugações (3 minutos) entre cada lavagem para evitar ao máximo a perda de células durante este processo. Após as lavagens, colocou-se uma solução de extração composta por ácido acético e etanol e, deixou-se incubar por 20 minutos a 18°C. Depois passou-se o sobrenadante para outras microplacas, centrifugou-se por mais 10 minutos e, o sobrenadante foi novamente colocado em novas microplacas e de seguida as absorvâncias foram lidas à 550 nm após 10 segundos de agitação num leitor de microplacas (infinite M200Pro da TECAN).

2.4.1.2- Ensaio do cometa

O protocolo para o ensaio cometa foi adaptado do protocolo de Singh et al. (1988). As lâminas e as lamelas utilizadas em cada tempo de amostragem foram colocadas numa mistura de álcool e éter (1:1) 2 dias antes de cada ensaio e, transferidas para acondicionamento em álcool etílico 24 horas antes da extração dos hemócitos. De seguida foram retiradas do álcool e secaram-se até ao momento do ensaio. Inicialmente as lâminas foram revestidas por Normal Melting Point Agarose (NMA) (0,65% de agarose), colocadas na estufa durante 25 minutos para que a camada de agarose pudesse secar.

500 µl de hemolinfa foi centrifugada a 3000 rpm durante 3 minutos, com eliminação do sobrenadante. Ressuspendeu-se o resíduo em 140 µl de Low Melting Point Agarose (LMA) (0,65% de agarose). A suspensão celular foi então dividida em duas aliquotas por lâmina (70 µl de suspensão em cada poço da lâmina) e, os poços foram cobertos com lamelas. Por fim, foram colocadas a 4°C durante 20 minutos para que a camada de LMA pudesse secar. Depois de secas, retirou-se as lamelas cuidadosamente para que a camada de LMA em cada poço ficasse intacta e, as lâminas foram imersas na solução de lise preparada anteriormente e, colocadas novamente a 4°C durante 1 hora. Após este tempo, retirou-se o excesso de lise cuidadosamente com água Milli-Q e as lâminas foram colocadas na camara de eletroforese de acordo com a Figura 2.3.

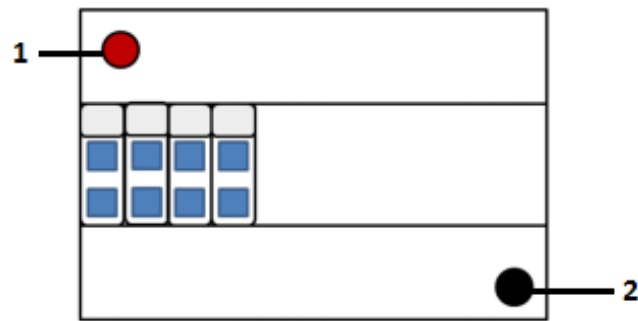


Figura 2.3- Câmara de eletroforese utilizada no ensaio cometa. 1) Polo negativo; 2) Polo positivo.

O princípio da eletroforese consiste no facto do ADN, por ser carregado negativamente, irá emigrar do polo negativo (vermelho) para o polo positivo (preto). A eletroforese durou 5 minutos e, de seguida as lâminas foram imersas em solução de neutralização (Tris 0,4 mM) durante 15 minutos e, em água Milli-Q durante mais 15 minutos. Por fim removeu-se, cuidadosamente, o excesso de água e deixou-se as lâminas secar durante 48 h em câmara escura para que depois fossem adicionadas 20 μ l de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole). O corante DAPI emite fluorescência azul após a ligação às regiões Adenina-Timina do ADN em que as concentrações mais elevadas entrarão em uma célula viva.

A presença de cometas foi analisada no microscópio óptico fluorescente (Axiovert S100) com uma câmara fotográfica (Sony) acoplada ao microscópio. As imagens captadas com o microscópio e a camera fotográfica foram analisadas no programa Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd). O programa marca as 50 células escolhidas aleatoriamente em cada lâmina e o parâmetro que se extrai deste processo é a quantidade de ADN na cauda do cometa. Os resultados são posteriormente expressos como média e respectivo desvio padrão.

2.4.2-Tratamento das amostras de mexilhão

Após cada um dos tempos de amostragem, os organismos foram recolhidos do respetivo tratamento (CT: controlo; CP: expostos a ciclofosfamida; n=48) e os tecidos dissecados para a separação de brânquias, glândula digestiva e manto, as quais foram

imediatamente congeladas em azoto líquido, e em seguida acondicionadas a -80°C até a realização das análises bioquímicas. A Figura 2.4 ilustra o interior de um mexilhão e os respectivos tecidos usados.

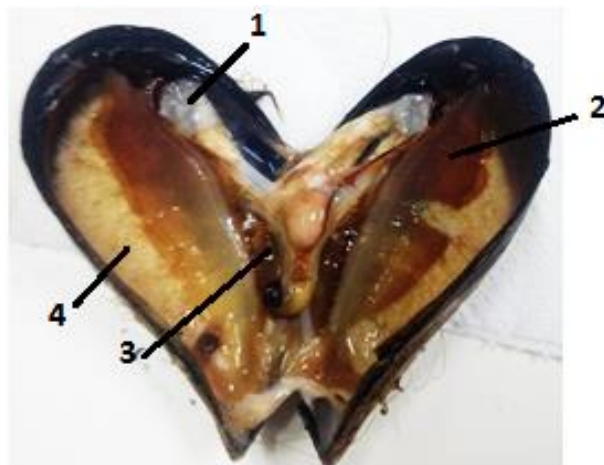


Figura 2.4- Parte interna do *Mytilus galloprovincialis* usado neste estudo. (1) Músculo adutor; (2) brânquias; (3) glândula digestiva; (4) gónadas.

2.5- Análises bioquímicas nos tecidos dos mexilhões expostos a ciclofosfamida

Os tecidos (brânquias e glândulas digestiva) dos mexilhões recolhidos nos dias das respetivas amostragens e conservadas a -80°C foram descongelados e pesados em tubos Falcon (15 mL). De seguida adicionou-se as soluções tampão referentes a cada tratamento: enzimas de biotransformação (GST e GPx) (Tris- Sucrose composto por Sucrose 0,5M, Tris 20 mM, KCl 0,5M, DTT 1mM, EDTA 1mM, pH 7,6); AChE (Tris-HCl, pH 8,0 e Triton 0,1%) e LPO (Tris-HCl 0,02M, pH 8,6 e uma solução de hidroxitolueno butilado (BHT)). Os tecidos foram homogeneizados com a ajuda de um homogeneizador (Ultra-Turax T 25) e, em seguida centrifugados (o tempo e a velocidade de centrifugação variaram consoante os tratamentos e, de acordo com o descrito nos protocolos respetivos). Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram fracionados em duas alíquotas uma para análise de cada tratamento e outra para determinação da concentração das proteínas totais.

2.5.1 - Quantificação da concentração das proteínas totais

A quantificação do teor em proteínas totais foi realizada nas brânquias e nas glândulas digestivas através do método de Bradford, que envolve a ligação do corante azul de Coomassie G-250 às proteínas (Bradford, 1976). Em condições ácidas o corante está na sua forma protonada (vermelha). Contudo quando se liga às proteínas é convertido na sua forma não protonada (azul) e, a absorvância medida a 595nm em leitor de microplacas (infinite M200Pro, TECAN). Para as medições utilizou-se albumina de soro de bovino como padrão em diferentes concentrações (0, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0 mg.ml⁻¹). As concentrações das proteínas estão expressas em mg.g⁻¹.

2.5.2- Quantificação da atividade da GPx

A GPx catalisa a redução de H₂O₂ em H₂O. A atividade é medida indiretamente através da reação acoplada com a GR. A GSSG (forma oxidada) produzida após a redução da H₂O₂ pela GPx retorna a sua forma reduzida (GSH) pela ação da GR e do NADPH (Paglia & Valantine, 1967). As amostras (brânquias e glândulas digestiva) homogeneizadas anteriormente foram colocadas em triplicado na microplaca (40 µl). De seguida adicionou-se em cada poço 200 µl de uma solução composta por GSH, NADPH, GR e tampão de GPx composto por (fosfato de potássio 50 mM, EDTA 0,1mM, NaN₃ 0,15 mM; pH 7,6). As microplacas foram incubadas a 28°C durante 2 minutos e, depois adicionou-se 50 µl de hidroperóxido de cumeno 1mM. A oxidação do NADPH em NADP é acompanhada por uma redução na absorvância a 340 nm. A concentração da GPx está expressa em nmol.mim.mg⁻¹ proteínas.

2.5.3- Quantificação da atividade da GST

Enzimas da família da GST catalisam a conjugação do grupo tiol da GSH com xenobióticos eletrofílicos como por exemplo o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (McFarland et al., 1999).

As amostras (brânquias e glândulas digestiva) foram pipetadas em triplicado (25 µl por poço) juntamente com uma solução contendo CDNB, GST e GSH (200 µl por poço) em que todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich. A atividade da GST tem um aumento na absorvância a 340 nm. A leitura das absorvâncias foram feitas com a ajuda dum leitor de microplacas (infinite M200Pro da TECAN). As concentrações da GST estão expressas em nmol CDNB min⁻¹mg⁻¹ proteínas.

2.5.4- Quantificação da atividade da AChE

A AChE é um importante biomarcador respeitante a neurotoxicidade provocada pela exposição a diversos produtos químicos. A inibição de AChE causa problemas a neurotransmissão (Colovic et al., 2003).

Para a quantificação da AChE usou-se as brânquias homogeneizadas anterioremente. A cada uma das amostras (brânquias) foram colocadas em triplicado (50 µl) numa microplaca e foram adicionadas em todos os poços as soluções de 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (200 µl) e acetilcolina (ATC) (50 µl) (substratos da reação) obtidos da Sigma-Aldrich e, preparadas no momento da análise. A tiocolina, produzida a partir da hidrólise de acetilcolina por AChE, reage não enzimaticamente com DTNB, libertando o composto 5-mercaptop-2-nitrobenzoato (amarelo). A absorvância deste produto é medido a 405 nm, em leitor de microplacas da (infinite M200Pro da Tecan®). As concentrações de AChE estão expressas em nmol ATC min⁻¹mg proteína⁻¹.

2.5.5- Quantificação da LPO

A LPO foi determinada nas brânquias e glândulas digestiva, a partir da quantificação do produto final malondialdeído (MDA) resultante da interação do OH[•] com lípidos.

Foram preparados padrões com diferentes concentrações (0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 µM) e, depois as respetivas amostras (brânquias e glândulas digestivas). Aos padrões e às amostras (200 µl) foram adicionados 650 µl de 1-metil-felilindone (R1) e 150 µl de ácido metanossulfónico (R2) (15,4 M) previamente preparados e obtidos também da

Sigma-Aldrich. De seguida foram incubadas durante 60 minutos a 45°C (banho-maria), centrifugadas a 15000 g durante 10 minutos e por fim, a mistura contendo as amostras e os reagentes foram colocadas em microplaca (150 µl em cada poço), e a absorvância lida a 566 nm em leitor de microplacas (infinite M200Pro da TECAN). As concentrações dos produtos finais da LPO estão expressas em nmol mg⁻¹ proteína.

2.6- Análise estatística

Todos os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett, $p > 0,05$). Testes paramétricos (ANOVA) foram aplicados quando esses pressupostos foram comprovados.

Os dados obtidos dos ensaios *ex vivo* e *in vitro* foram testados usando a análise de variância unidirecional (ANOVA). Os procedimentos de comparação múltipla foram conduzidos, usando o teste de Tukey. Também foram aplicados os testes de normalidade e homogeneidade pelo teste de Bartlett. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$ e as análises foram realizadas com GraphpadPrims 5.0.

Os dados obtidos dos ensaios *in vivo* foram testados usando a análise de variância bidirecional (ANOVA). A significância estatística foi definida em $p < 0,05$ e as análises foram realizadas com GraphpadPrims 5.0.

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para avaliar a relação entre as atividades de enzimas antioxidantes e de biotransformação, atividade de AChE e níveis de LPO nas brânquias e glândula digestiva de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida e, em cada tempo de exposição. Os cálculos foram realizados usando XLStat2009®.

3- Resultados

3.1- Viabilidade celular em linhas celulares humanas expostas a ciclofosfamida

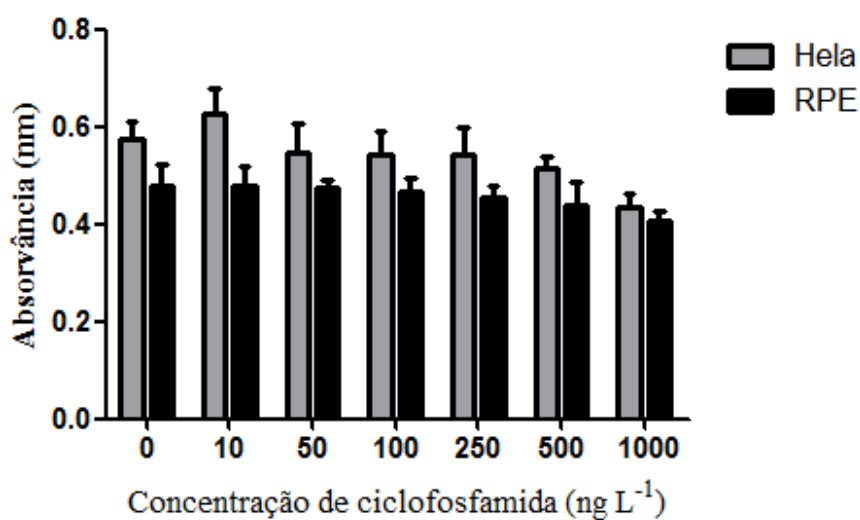
Para o ensaio de viabilidade *in vitro*, usaram-se duas linhas celulares humanas. Uma linha de células do epitélio pigmentado da retina (RPE), caracterizada pela expressão ectópica do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), que lhe confere imortalidade replicativa através da manutenção do tamanho dos telómeros sem conferir características malignas (cancerígenas) às células (Yang et al., 1999). A outra linha celular utilizada foi uma linha cancerígena, Hela, derivada de células do cancro cervical, pelo que apresenta características neoplásicas (Patel et al., 2009).

As linhas celulares foram expostas a concentrações de ciclofosfamida determinadas no ambiente aquático (10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng L⁻¹) de modo a comparar a citotoxicidade causada pela ciclofosfamida em linhas celulares humanas (e que possuem características diferentes entre si) e, posteriormente com células de outra espécie (mexilhões). A citotoxicidade provocada pela ciclofosfamida foi medida pelo ensaio de viabilidade celular com o corante vermelho neutro. Este corante é sequestrado pela membrana lisossômica e, permanece retido dentro das células viáveis por protonização acumulando-se nesses organelos. Por outro lado, nas células não viáveis a membrana lisossômica não tem a capacidade de sequestrar o corante, logo não é acumulado o que resulta numa redução da absorvância em comparação às células viáveis.

Após a realização do ensaio com o vermelho neutro pode observar-se (Figura 3.1) que, o aumento da concentração de ciclofosfamida culminou numa pequena redução da viabilidade celular indicada pela redução dos valores de absorvância em ambas as linhas celulares comparativamente ao controlo. Na linha celular Hela, a redução da viabilidade celular variou entre 5% à 25% desde a concentração de ciclofosfamida utilizada (50 ng L⁻¹) até a maior concentração (1000 ng L⁻¹) (Tabela 3.1). Na RPE, a viabilidade celular variou entre 0% à 15% no intervalo de concentrações utilizadas (Tabela 3.2). Contudo essa redução não aparece como significativa em nenhuma das concentrações testadas segundo o tratamento estatístico ($p > 0,05$). Na concentração de ciclofosfamida mais baixa testada (10 ng L⁻¹) observou-se mesmo um ligeiro aumento, não significativo, na absorvância (a viabilidade celular aumentou 9% em relação ao controlo) na linha Hela ($p > 0,05$) o que poderá ser devido a alguma variação biológica (variação no número de

células). Na linha cancerígena Hela, a toxicidade causada pela ciclofosfamida foi sempre menor (maiores valores de absorvância) do que aquela causada na linha “normal” RPE o que indica que as células Hela, células neoplásicas, apresentam uma maior resistência ao fármaco.

A



B

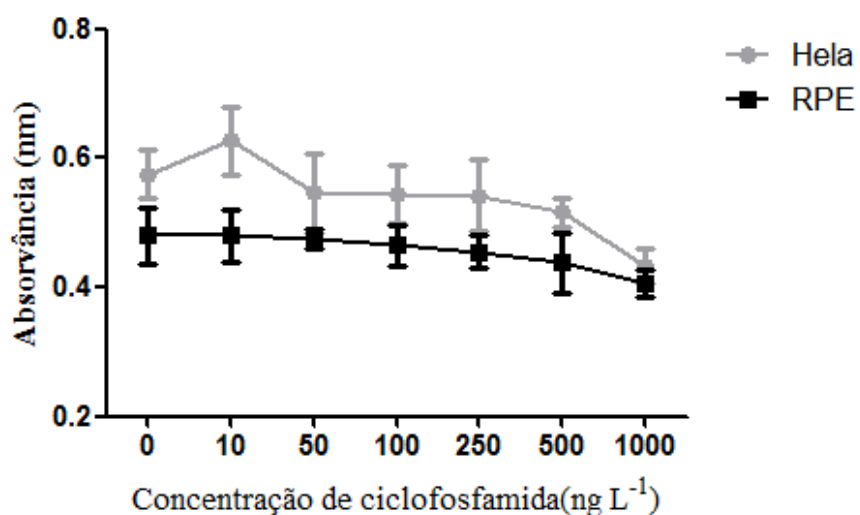


Figura 3.1: Viabilidade celular obtida através do ensaio do vermelho neutro em linhas celulares humanas expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida (A). O gráfico B contém a mesma informação que o gráfico A, e é apresentado com intuito de uma melhor compreensão da variação da viabilidade celular entre as linhas celulares.

Tabela 3.1: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em linhas celulares (Hela) expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida.

Concentração (ngL⁻¹)	Absorvância	Viabilidade celular (%)
0	0,575	100
10	0,627	109
50	0,546	95
100	0,545	94,8
250	0,541	94
500	0,517	90
1000	0,432	75,13

Tabela 3.2: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em linhas celulares (RPE) expostas a diferentes concentrações de ciclofosfamida.

Concentração (ngL⁻¹)	Absorvância	Viabilidade celular (%)
0	0,479	100
10	0,479	100
50	0,476	99,4
100	0,466	97,3
250	0,454	94,85
500	0,437	91,2
1000	0,406	84,8

3.2- Viabilidade celular em hemócitos de *M. galloprovincialis* expostos a ciclofosfamida

A ciclofosfamida (agente alquilante), por estar presente no ambiente aquático, entra em contacto com organismos não-alvo como é o caso dos mexilhões e, pode atuar sobre as células destes animais causando morte celular.

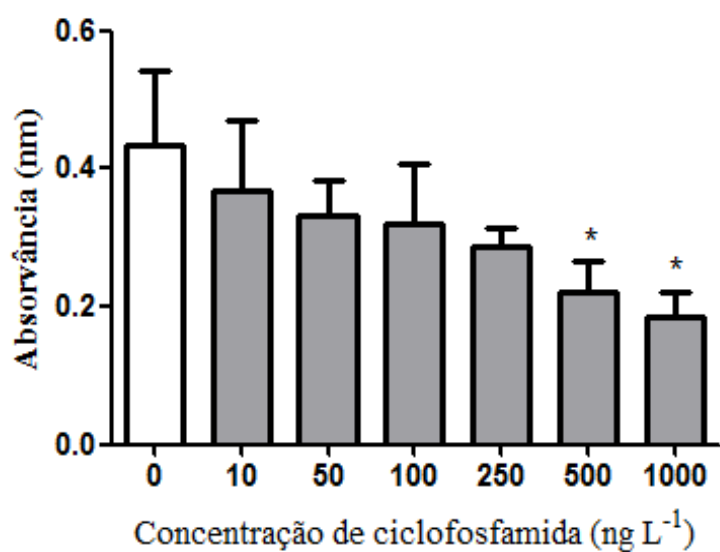
Para avaliar a toxicidade causada pela ciclofosfamida sobre hemócitos de mexilhões recorreu-se ao ensaio com o corante vermelho neutro à semelhança das linhas celulares humanas (ver 3.1). Para a toxicidade em hemócitos usou-se a abordagem *ex vivo* e *in vivo* pois permite uma avaliação completa e melhorada do metabolismo da ciclofosfamida.

Os hemócitos foram expostos a concentrações de ciclofosfamida determinadas no ambiente (10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng L⁻¹). O ensaio foi realizado duas vezes, com animais diferentes com o intuito de analisar a variabilidade dessa exposição. Os resultados das duas exposições foram semelhantes para todas as concentrações testadas.

Na Figura 3.2 apresenta-se a variabilidade celular analisada usando vermelho neutro em 2 dias de exposição a diferentes concentrações de ciclofosfamida. Todas as concentrações testadas provocaram uma redução na viabilidade celular como se pode ver na figura.

A viabilidade celular (indicada pela redução da absorvância) nos hemócitos dos mexilhões diminuiu em todas as concentrações testadas (a viabilidade celular nas concentrações testadas variou entre 15,4 à 57,6% comparativamente ao controlo no dia 1 e, entre 0,4 à 60,75% no dia 2) (Tabela 3.3 e 3.4). Contudo, nos mexilhões expostos às concentrações mais baixas (10, 50, 100, 250) a redução da viabilidade não foi significativa no primeiro dia de exposição (a redução variou entre 15,4 à 34% respetivamente) (Figura 3.2A) ($p > 0,05$). Enquanto que nos mexilhões expostos às concentrações mais elevadas (500 e 1000 ng L⁻¹) a redução da viabilidade celular é significativa (48,9 à 57,6%) ($p < 0,05$). No segundo grupo de mexilhões expostos a ciclofosfamida (Figura 3.2B) a viabilidade celular também diminuiu existindo diferenças significativas nos hemócitos dos mexilhões expostos às concentrações na gama de concentrações de 100 à 1000 ng L⁻¹ (nestas concentrações a viabilidade celular variou entre 20,65 à 60,75%) (Figura 3.2B) ($p < 0,05$).

A



B

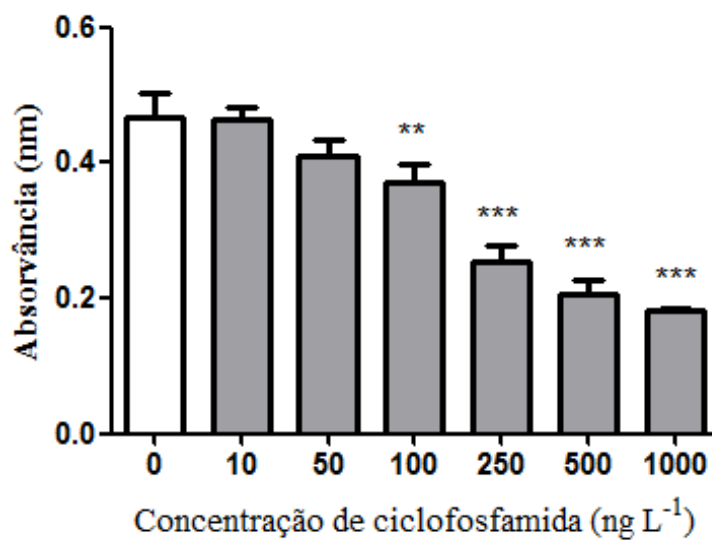


Figura 3.2: Viabilidade celular determinada usando vermelho neutro em hemócitos de mexilhões expostos a diferentes concentrações de ciclofosfamida em dias diferentes. A) Resultados do primeiro grupo de mexilhões expostos a ciclofosfamida. B) Resultados do segundo grupo de mexilhões expostos a ciclofosfamida. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os hemócitos expostos e não expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$)

Tabela 3.3: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em hemócitos de mexilhões expostos a diferentes concentrações de ciclofosfamida (Dia 1).

Concentração (ngL⁻¹)	Absorvância	Viabilidade celular (%)
0	0,4339	100
10	0,367	84,6
50	0,3317	76,5
100	0,3195	73,6
250	0,2863	65,98
500	0,2214	51,1
1000	0,184	42,4

Tabela 3.4: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular em hemócitos de mexilhões expostos a diferentes concentrações de ciclofosfamida (Dia 2).

Concentração (ngL⁻¹)	Absorvância	Viabilidade celular (%)
0	0,4663	100
10	0,464	99,6
50	0,4098	87,9
100	0,37	79,35
250	0,2529	54,24
500	0,2062	44,22
1000	0,183	39,25

No ensaio *in vivo*, os mexilhões foram expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida durante 14 dias. A viabilidade celular foi analisada com vermelho neutro e com TB nos diferentes dias de amostragem.

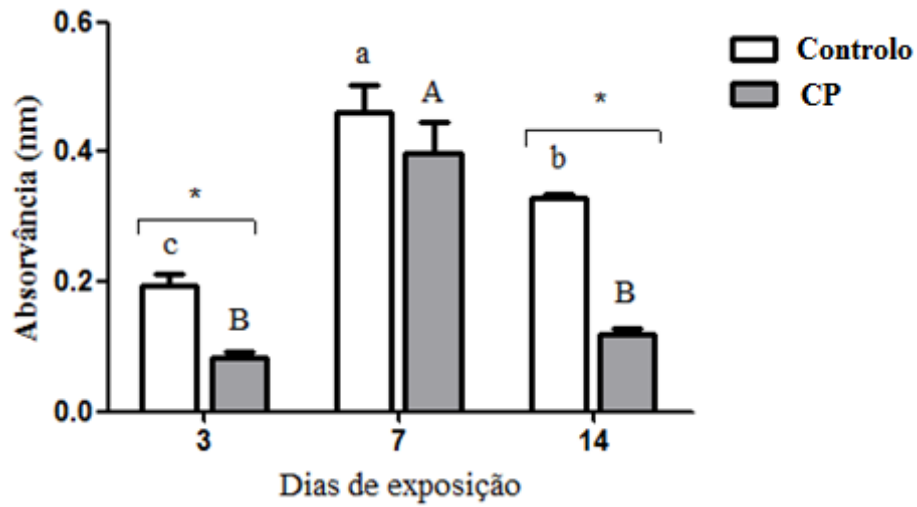
O ensaio com vermelho neutro demonstrou uma redução na viabilidade celular (redução dos valores de absorvância) nas células expostas a ciclofosfamida em

comparação ao controlo em todos os tempos de amostragem (a redução da viabilidade celular entre os mexilhões não expostos e os expostos a ciclofosfamida foi de 57,6% no terceiro dia de exposição, no sétimo dia de exposição a redução da viabilidade entre mexilhões expostos e não expostos foi de 13,05% e no último dia de exposição a redução foi de 63,73%) (Tabela 3.5) . Portanto, a redução na viabilidade só foi significativa após 3 ($p < 0,05$) e 14 dias de exposição ($p < 0,05$) (Figura 3.3A) .

O ensaio com TB demonstrou que a exposição dos mexilhões a ciclofosfamida provocou uma redução na viabilidade celular em comparação ao controlo em todos os tempos de amostragem. Contudo a redução só foi significativa ($p < 0,05$) após 7 e 14 dias de exposição (Figura 3.3B).

Os 2 ensaios de viabilidade comprovaram que, mesmo em concentrações baixas (ng L^{-1}), a exposição crónica implica maior toxicidade para os hemócitos dos mexilhões.

A



B

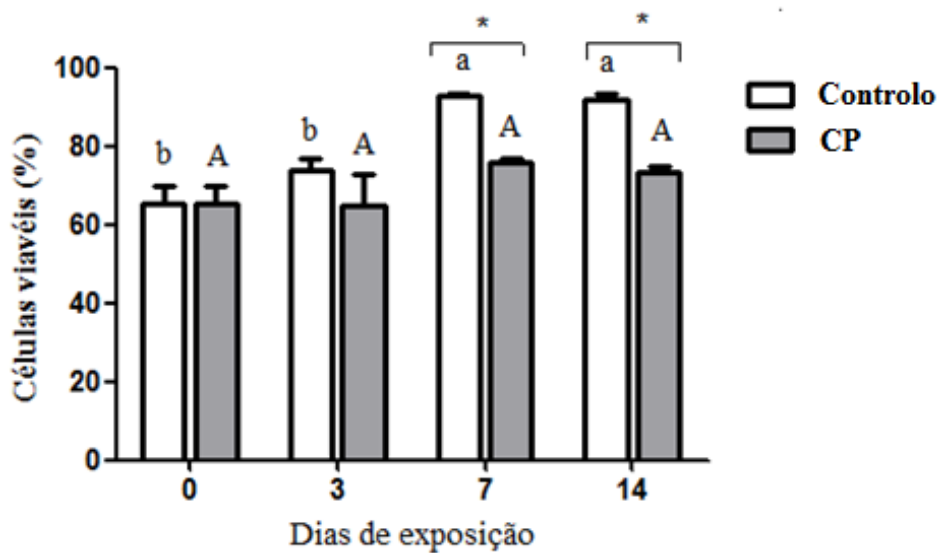


Figura 3.3: Viabilidade celular em mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}). A) Viabilidade celular com vermelho neutro; B) Viabilidade celular com TB. Asteriscos indicam diferenças significativas entre hemócitos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.

Tabela 3.5: Valores de absorvância e percentagem de viabilidade celular obtidos através do ensaio do verlemho neutro em hemócitos de mexilhões expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹).

Concentração (ngL⁻¹)	Absorvância	Viabilidade celular (%)
3	0,1954	100
CP3	0,0829	42,4
7	0,4596	100
CP7	0,3996	86,95
14	0,3298	100
CP14	0,1196	36,26

3.3- Genotoxicidade provocada pela ciclofosfamida em hemócitos de *M. galloprovincialis*

A ciclofosfamida foi concebida com o objetivo de alquilar o ADN de células cancerígenas contudo, em organismos não-alvo pode também exercer a mesma ação. A genotoxicidade foi analisada com o objetivo de verificar se a ciclofosfamida também atua sobre o ADN de mexilhões (organismo não-alvo) durante os 14 dias de exposição ao fármaco.

Os efeitos genotóxicos da ciclofosfamida em mexilhões foram analisados pelo ensaio do cometa e expressos em percentagem (%) de ADN presente na cauda de cada cometa (Figura 3.4). Os hemócitos dos mexilhões não expostos apresentaram danos mínimos ao longo do período de exposição enquanto que os danos ao ADN (maior percentagem de ADN presente na cauda dos cometas) foram mais elevados e significativamente diferentes em todos os hemócitos de mexilhões expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$) (Figura 3.5). Estes resultados confirmam que a ciclofosfamida é genotóxica para as células dos mexilhões.

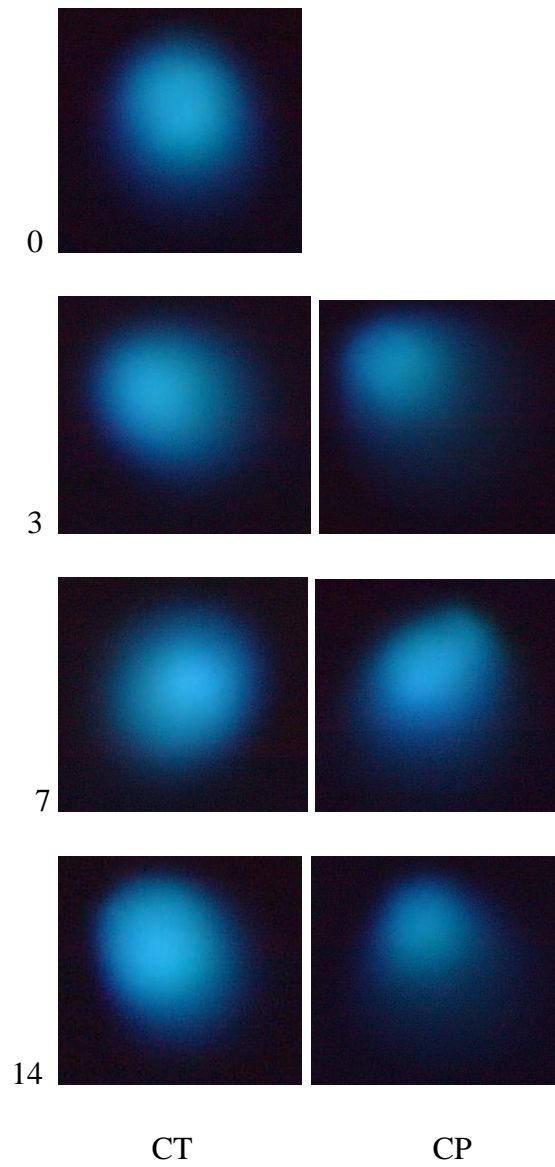


Figura 3.4: Imagens de hemócitos de mexilhões obtidos através do ensaio do cometa após os diferentes tempos de exposição (0, 3, 7 e 14 dias). CT- Controle. CP- Exposto a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}).

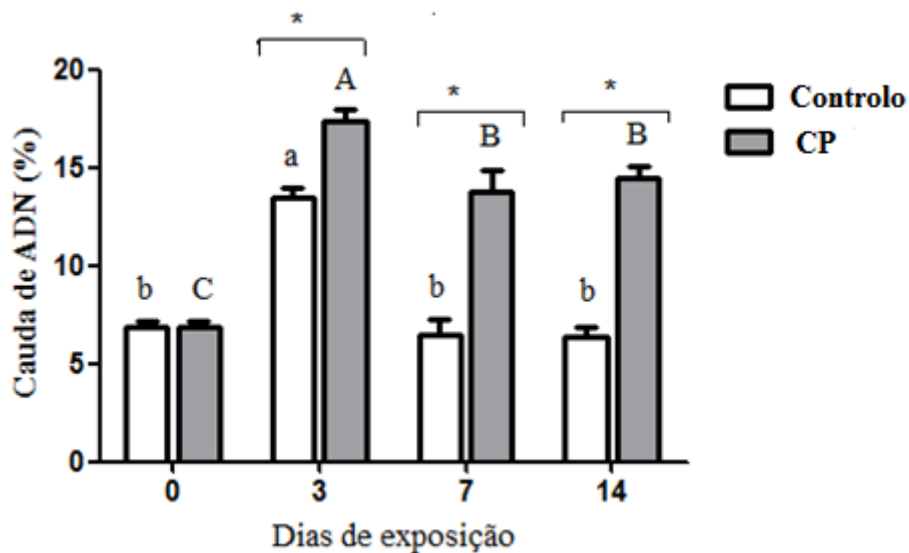


Figura 3.5: Efeito genotóxico em mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre hemócitos expostos e não expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.

3.4- Stress oxidativo provocado pela ciclofosfamida nas brânquias e glândula digestiva de *M. galloprovincialis*

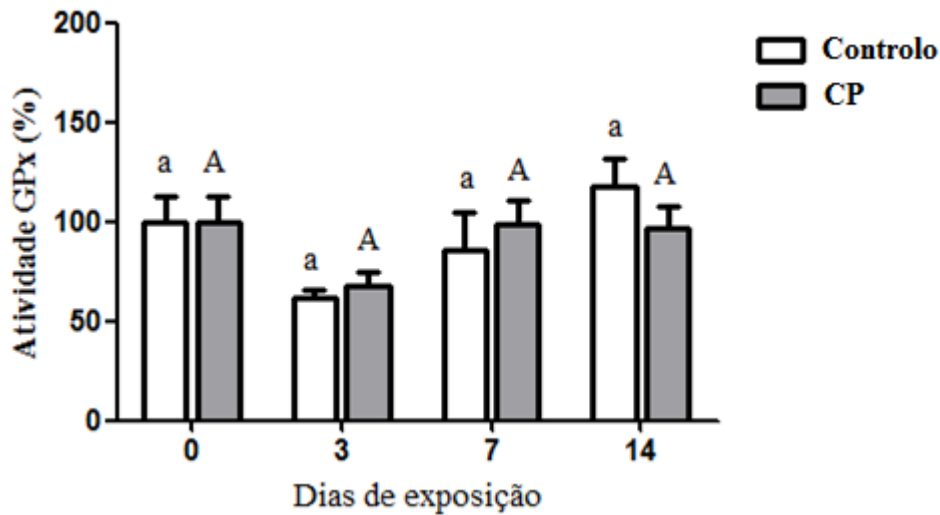
A bioacumulação de alguns contaminantes implica a produção de ROS e consequente aumento/diminuição da atividade de enzimas antioxidantes. A GPx desempenha um importante papel na resposta antioxidante evitando a bioacumulação de H₂O₂ nas células.

A quantificação da atividade da GPx (%) em alguns tecidos de mexilhões (brânquias e glândulas digestivas) expostos e não expostos a ciclofosfamida permite concluir, que neste organismo, a ciclofosfamida também é capaz de intensificar a produção de ROS e de diminuir/aumentar a produção de ROS.

Nas brânquias, a atividade da GPx não se alterou durante o período de exposição (Figura 3.6A) ($p > 0,05$). Isto indica que neste tecido, a ciclofosfamida não teve capacidade de induzir a produção de uma quantidade de ROS que justificasse uma maior atividade desta enzima antioxidante ou, que a quantidade de ROS produzida fosse de tal modo elevada para inibir a atividade da GPx. Na glândula digestiva dos mexilhões

expostos a ciclofosfamida a atividade da GPx aumentou significativamente até 7 dias de exposição em comparação com a glândula digestiva dos mexilhões não expostos a ciclofosfamida (Figura 3.6B) ($p < 0,05$). Isto sugere que a desintoxicação de hidroperóxidos possivelmente associados ao aumento de ROS na glândula digestiva originados pela exposição a ciclofosfamida.

A



B

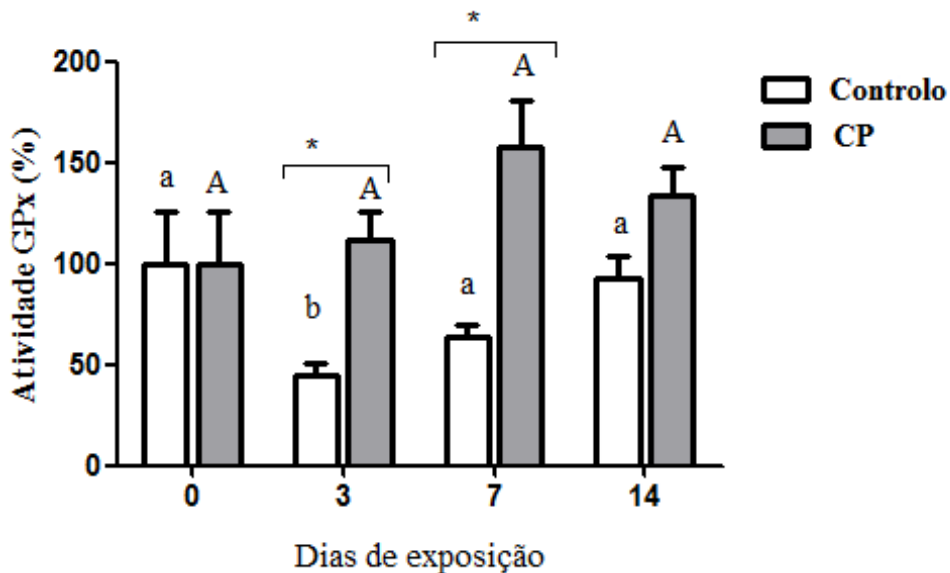


Figura 3.6: Atividade da GPx em tecidos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). (A) Quantificação da atividade da GPx nas brânquias e (B) na glândula digestiva. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado durante a exposição. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.

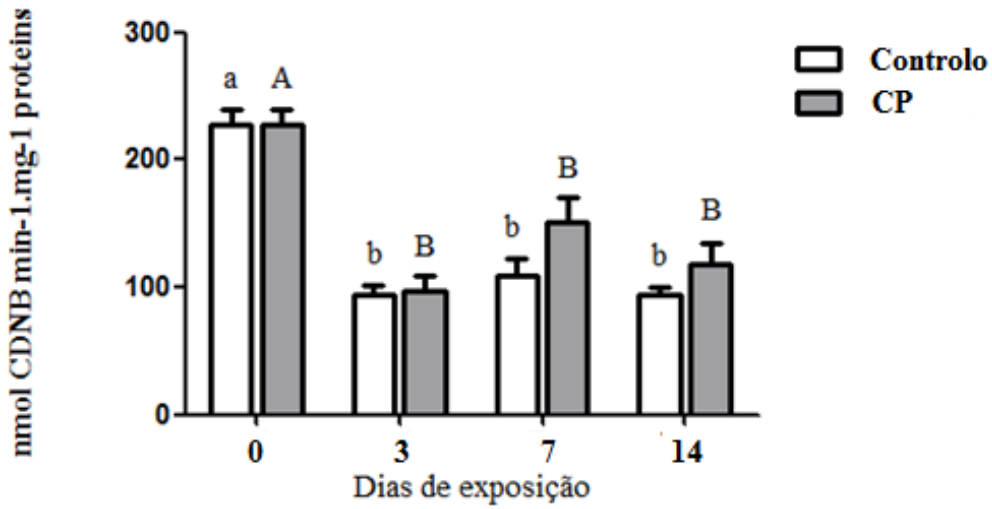
3.5- Biotransformação provocada pela ciclofosfamida nas brânquias e glândula digestiva de *M. galloprovincialis*

GSTs são enzimas multifuncionais envolvidas na desintoxicação celular de compostos eletrofílicos reativos e respostas imunes inatas nos mexilhões.

A quantificação da concentração da GST em alguns tecidos de mexilhões (brânquias e glândula digestiva) expostos e não expostos a ciclofosfamida tem como objetivo verificar se neste organismo a ciclofosfamida também é capaz de desencadear o metabolismo e consequente desintoxicação mediada por esta enzima.

Durante a exposição dos mexilhões à ciclofosfamida verificou-se que não houve nenhuma alteração significativa da atividade da GST nas brânquias de mexilhões expostos em comparação com os não expostos ($p > 0,05$) (Figura 3.7A). Na glândula digestivas houve inicialmente, após 3 dias, uma redução significativa da atividade da GST nos mexilhões expostos a ciclofosfamida em comparação com os mexilhões não expostos ($p < 0,05$). Por outro lado, a atividade da GST aumentou significativamente nas glândulas dos mexilhões expostos a ciclofosfamida após 7 e 14 dias de exposição ($p < 0,05$) (Figura 3.7B) confirmando que a GST desempenha um papel importante na resposta biotransformação da ciclofosfamida e na manutenção da homeostase nos mexilhões.

A



B

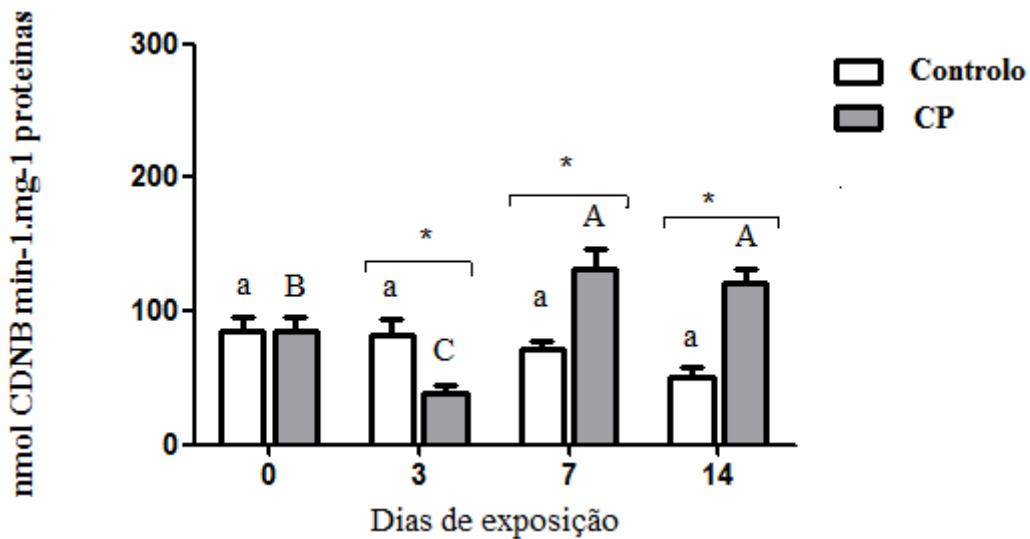


Figura 3.7: Atividade da GST em tecidos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). (A) Quantificação da atividade da GST nas brânquias. B) Quantificação da atividade da GST na glândula digestiva. Asteriscos indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.

3.6- Neurotoxicidade provocada pela ciclofosfamida nas brânquias de *M. galloprovincialis*

A AChE é um biomarcador de exposição cuja atividade geralmente é alterada pela exposição a contaminantes (Gomes et al., 2011; Gonzalez-Rey & Bebianno, 2014; Gonzalez-Rey et al., 2014). A quantificação da atividade da AChE nas brânquias de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida tem como objetivo verificar se, neste organismo a ciclofosfamida também é capaz de provocar neurotoxicidade que é indicada pela inibição da atividade da AChE.

Ao longo dos 14 dias de exposição dos mexilhões a 1000 ng L^{-1} de ciclofosfamida, não houve inibição significativa da atividade da AChE nas brânquias dos mexilhões expostos a ciclofosfamida em comparação com a dos mexilhões não expostos ($p > 0,05$) (Figura 3.8). Mas, a partir do dia 7 nota-se uma ligeira redução da atividade nos mexilhões expostos a ciclofosfamida no entanto, não significativamente diferente dos animais não expostos. Contudo, no terceiro dia de exposição, verificou-se um aumento significativo da atividade da AChE nas brânquias dos mexilhões expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$) (Figura 3.8) sugerindo que a concentração de ciclofosfamida utilizada nesta experiência não é capaz de inibir a atividade da AChE a curto prazo.

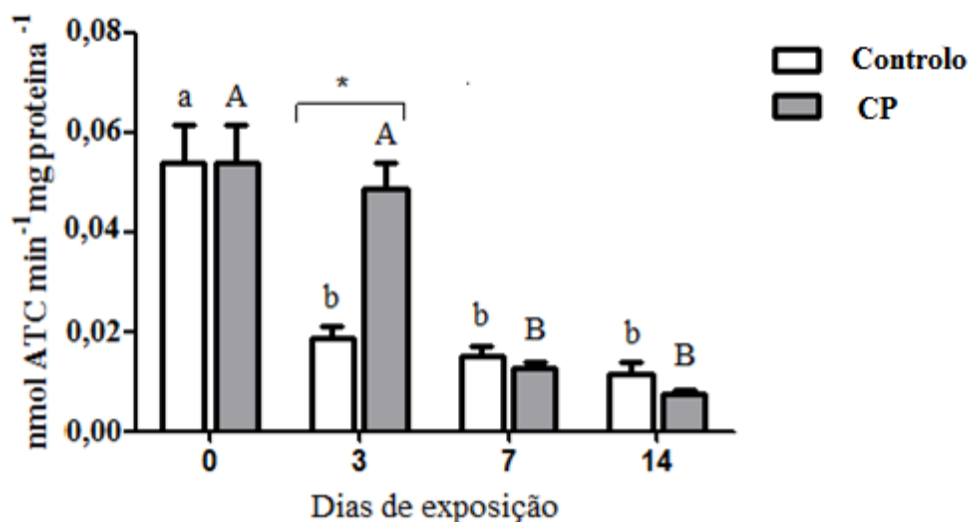


Figura 3.8: Atividade da AChE nas brânquias de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}). Asteriscos indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.

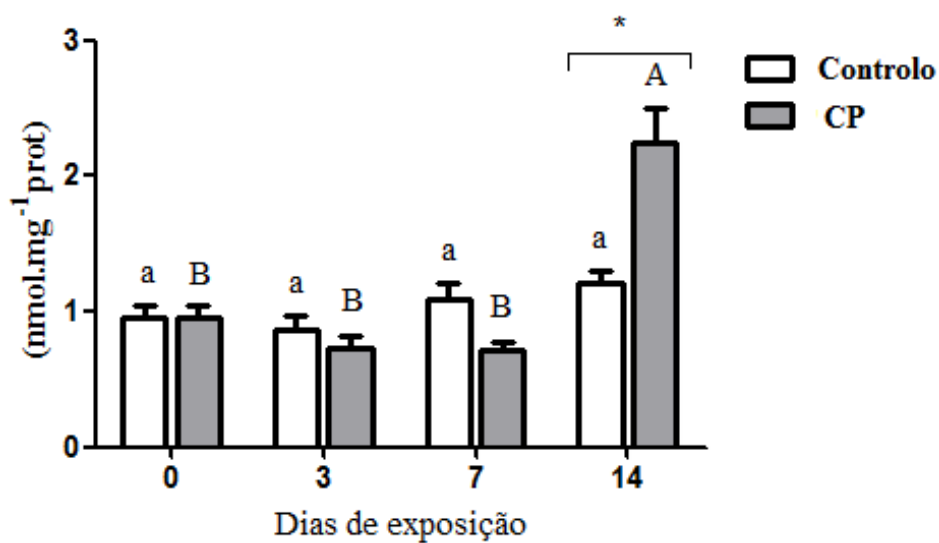
3.7- LPO provocada pela ciclofosfamida nas brânquias e glândulas digestivas de *M. galloprovincialis*

As ROS frequentemente interagem com moléculas biológicas incluindo lípidos, sequestram o hidrogénio destas e induzem LPO (Winston & Di Giulio, 1991). A bioacumulação de alguns contaminantes implica uma maior produção de ROS e consequente indução de LPO.

A determinação da LPO nas brânquias e na glândula digestiva de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida é realizada através da quantificação de MDA que é um dos produtos finais resultantes da LPO. O objetivo é verificar se, neste organismo, a ciclofosfamida é capaz de desencadear a produção de espécies altamente reativas como o OH^\bullet que, posteriormente reage com lípidos e provoca a LPO.

Ao longo dos 14 dias de exposição dos mexilhões a ciclofosfamida, verificou-se que, nas brânquias dos mexilhões expostos houve um aumento significativo de LPO no último dia da exposição ($p < 0,05$) (Figura 3.9A). Verificou-se o mesmo na glândula digestiva, após 14 dias de exposição, houve também um aumento significativo de LPO ($p < 0,05$) (Figura 3.9B) sugerindo que, mesmo em concentrações baixas (ng L^{-1}), a exposição crónica aumenta o dano membranar e consequente aumento da LPO nas brânquias e na glândula digestiva dos mexilhões. Contudo, houve uma redução significativa da LPO na glândula digestiva dos mexilhões expostos a ciclofosfamida após 7 dias o que pode indicar que a exposição a curto prazo não é suficiente para aumentar a produção de ROS não havendo a interação destes com lípidos .

A



B

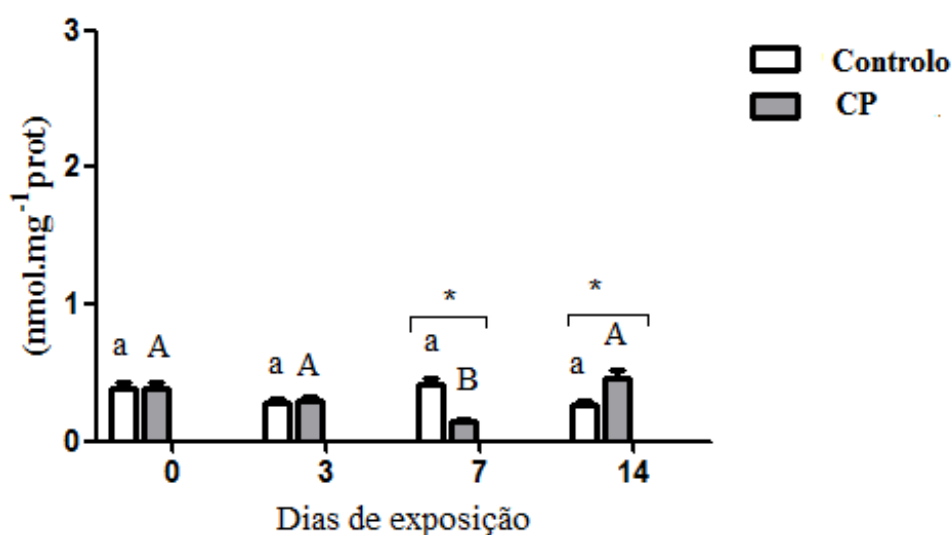


Figura 3.9: Determinação da LPO a partir da quantificação do MDA. (A) Determinação da LPO nas brânquias e (B) glândula digestiva de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹). Asteriscos indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre controlo e contaminado. Letras maiúsculas e minúsculas significam diferenças significativas entre tratamentos em cada tempo de exposição.

3.8- Análise de componentes principais (PCA)

Os resultados de PCA mostram que os dois componentes principais (PC1 e PC2) representam 92,57% de variância total nos hemócitos (PC1=77,95%, PC2=14,62%), 86,73% nas brânquias (PC1=52,34%, PC2=34,39%) e 79,88% nas glândulas digestivas (PC1=52,53%, PC2=27,35%). A resposta dos hemócitos e dos diferentes tecidos a ciclofosfamida estão associados com o tempo de exposição. A exposição dos mexilhões à concentração de ciclofosfamida provocou alterações significativas tanto na viabilidade celular dos hemócitos como na integridade do ADN (Figura 3.3A/B, Figura 3.5). Os dados do PCA (Figura 3.10) indicam que houve uma redução na viabilidade celular dos mexilhões expostos a ciclofosfamida após 7 dias observada em ambos os testes (vermelho neutro e TB) e que os danos provocados no ADN foram mais acentuados no último dia de exposição a ciclofosfamida (dia 14). O PC1 (componente mais importante) ainda indica que o tempo 7 (controles e expostos a ciclofosfamida) e o controlo do dia 14 são diferentes dos outros tempos de amostragem e que o vermelho neutro e o TB aumentam em oposição ao cometa, o que indica um efeito contraditório entre eles (Figura 3.10).

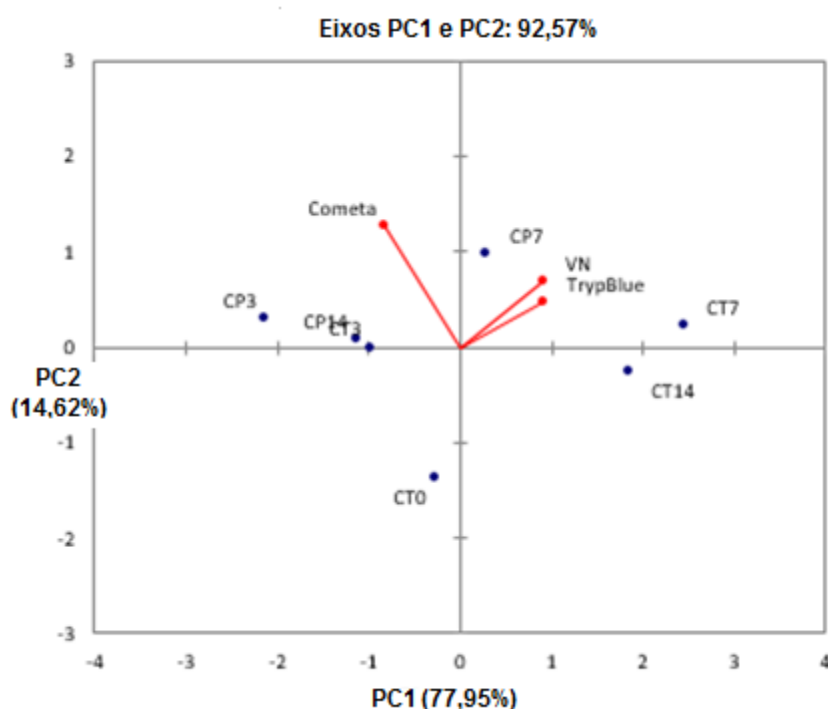


Figura 3.10: Análise dos componentes principais (PCA) nos hemócitos de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}). CT (Controlo) e CP (expostos a ciclofosfamida) nos respetivos dias de amostragem (0, 3, 7 e 14).

A acumulação de ciclofosfamida permitiu aceder a informações importantes sobre a toxicidade causada nas brânquias e glândula digestiva dos mexilhões através da análise de biomarcadores usualmente afetados pela exposição a xenobióticos.

A exposição crónica dos mexilhões à concentrações ambientais de ciclofosfamida induziu a produção de ROS e consequente ativação da GPx (enzima responsável pela defesa antioxidante) na glândula digestiva nos primeiros dias de exposição (Figura 3.6B). Esses dados foram comprovados pelo PCA (Figura 3.12) que demonstra, nas glândulas digestivas, uma maior atividade da GPx no sétimo dia de exposição. Enquanto que, nas brânquias a atividade da GPx manteve-se semelhante quer nos mexilhões expostos a ciclofosfamida quer nos não expostos o que indica que não houve resposta antioxidante neste tecido (Figura 3.6A).

A atividade da GST aumentou significativamente nas glândulas digestivas dos mexilhões expostos a ciclofosfamida a partir do sétimo dia (Figura 3.7B). Este aumento está correlacionado com o aumento da atividade da GPx também no sétimo dia (Figura 3.12). Nas brânquias não houve variação significativa entre os mexilhões expostos e os não expostos (Figura 3.7A). Contudo, no sétimo dia de exposição houve um aumento não significativo da atividade enzimática confirmada pelos resultados do PCA.

A atividade da AChE variou durante a exposição. No terceiro dia de exposição houve um aumento significativo da AChE nas brânquias dos mexilhões expostos a ciclofosfamida em comparação com os não expostos (Figura 3.8). Mas, a atividade começa a decrescer a partir do sétimo dia (Figura 3.11) o que indica que a exposição crónica pode causar neurotoxicidade indicada pela inibição da AChE. A redução da atividade da AChE no sétimo dia de exposição está correlacionada com a atividade da GST o que pode indicar que a acumulação de ciclofosfamida nas brânquias (atividade da GST nos mexilhões expostos a ciclofosfamida idêntica a atividade dos mexilhões não expostos indica a bioacumulação do fármaco) afeta negativamente a atividade da AChE neste tecido.

A LPO aumenta significativamente no último dia de exposição em ambos os tecidos (Figura 3.9A/B, Figura 3.11, Figura 3.12). O que indica que a exposição crónica a ciclofosfamida induz uma maior produção de ROS que interagem com lípidos provocando assim o aumento da LPO. Através dos resultados do PCA, verificou-se que

nas brânquias, a LPO está correlacionado com a atividade da GPx o que pode indicar que o défice de atividade antioxidante neste tecido implica maior acumulação de ROS que vão posteriormente induzir LPO.

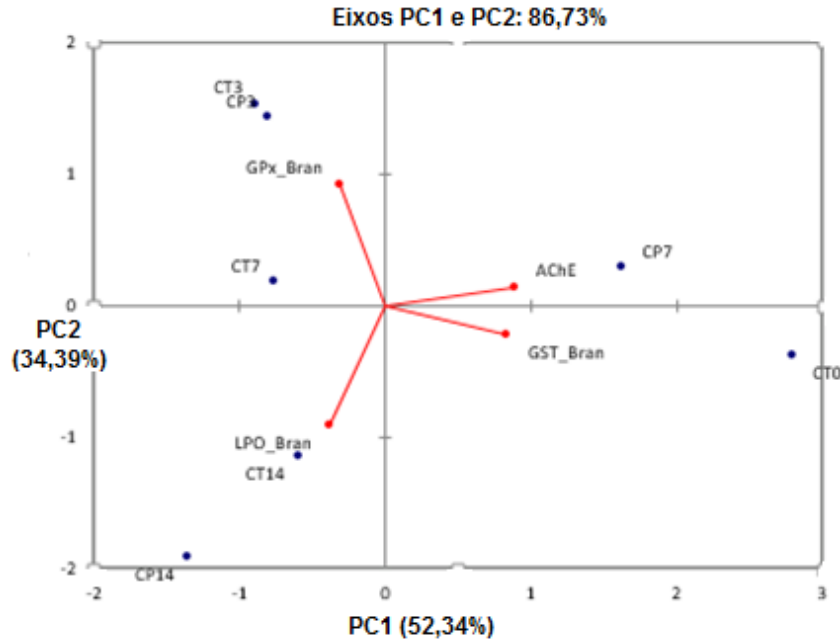


Figura 3.15: Análise dos componentes principais (PCA) nas brânquias de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (100 ng L^{-1}). CT (Controlo) e CP (expostos a ciclofosfamida) nos respetivos dias de amostragem (0, 3, 7 e 14).

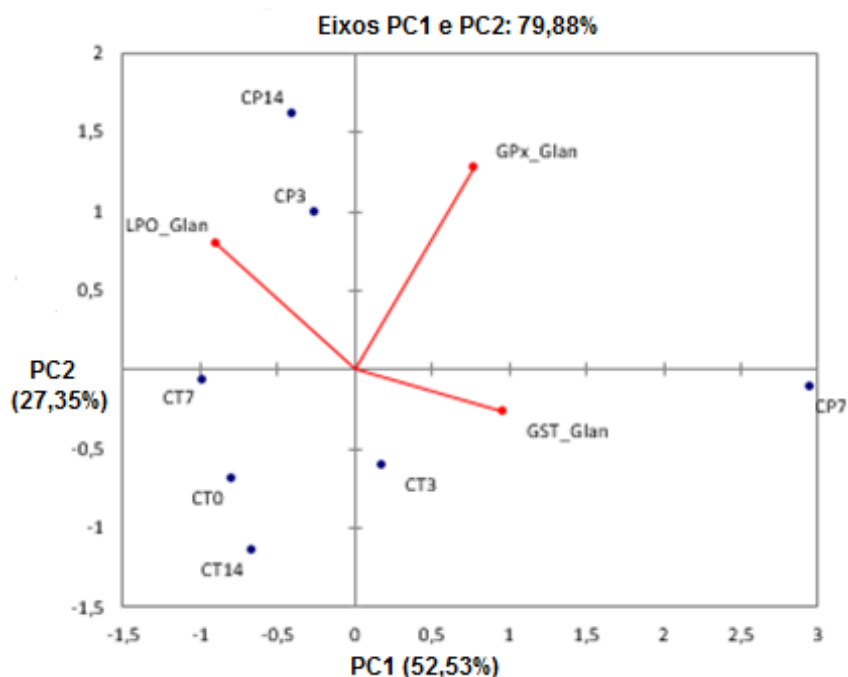


Figura 3.16: Análise dos componentes principais (PCA) na glândula digestiva de mexilhões expostos e não expostos a ciclofosfamida (1000 ng L^{-1}). CT (Controlo) e CP (expostos a ciclofosfamida) nos respectivos dias de amostragem (0, 3, 7 e 14).

Nas brânquias o PC1 separa o tempo 7 (expostos a ciclofosfamida) e o controlo 0 dos outros tempos de amostragem (Figura 3.11). Nas glândulas digestivas, o PC1 separa o controlo 3 e, o exposto a ciclofosfamida no tempo 7 dos outros tempos de amostragem (Figura 3.12). Contudo, ambos os resultados são difíceis de interpretar.

Os resultados do PCA dos hemócitos, brânquias e glândulas digestivas não demonstraram uma separação entre células e tecidos expostos e não expostos a ciclofosfamida nos dois eixos principais (PC1 e PC2). Isto indica que, as alterações celulares e tecidulares verificadas não se devem a exposição propriamente dita mas sim, ao tempo que dura a exposição. Os resultados do PCA juntamente com a ANOVA comprovaram que, mesmo se tratando de concentrações reduzidas, a presença da ciclofosfamida no ambiente pode provocar, a longo prazo, alterações no metabolismo dos mexilhões.

4-Discução

4.1- Ensaio *in vitro* em linhas celulares humanas expostas a ciclofosfamida

A ciclofosfamida é normalmente utilizada com o intuito de causar citotoxicidade às células cancerígenas resultando na redução da massa tumoral (Emadi et al., 2009) quando administrada (usualmente 100 a 200 mg/kg, diariamente) por via oral ou intravenosa (600-1000 mg/m², a cada 3-4 semanas) (McCarroll et al., 2008). Além do efeito terapêutico, doses elevadas de ciclofosfamida geralmente provocam um comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, levando a imunodepressão severa e, provavelmente, a infecções oportunistas ou mesmo a tumores neoplásicos secundários (Berd et al., 1984; Matar et al., 2001). Por outro lado, baixas doses de ciclofosfamida demonstraram ter o efeito contrário e, atacam as células cancerígenas por um mecanismo diferente. Baixas doses de ciclofosfamida destroem a barreira imunológica (Berd et al., 1984) e, potencializam a ação do sistema imunológico através da inibição dos linfócitos responsáveis pela tolerância imunológica (Lutsiak et al., 2005).

As duas linhas celulares utilizadas neste trabalho foram expostas a baixas concentrações de ciclofosfamida (10 - 1000 ng L⁻¹) que são as normalmente encontradas em meio marinho como contaminação, e, a citotoxicidade foi analisada pelo ensaio do vermelho neutro. Observou-se que a exposição provocou, em ambas as linhas celulares (RPE e Hela), uma redução na viabilidade celular comprovando que mesmo em baixas doses, a ciclofosfamida exerce um efeito citotóxico quer em linhas celulares cancerígenas (Hela), quer em linhas celulares “quase” primárias (RPE). No entanto, as células cancerígenas (Hela) apresentaram menor citotoxicidade indicada pelos valores de absorvância (as Hela têm sempre valores mais elevados de absorvância do que as RPE) (Figura 3.1). Isto poderá acontecer devido à capacidade que as células cancerígenas têm para desenvolver mecanismos de resistência a fármacos, tais como a amplificação ou mutação de genes de resistência a múltiplos medicamentos que codificam para glicoproteínas da membrana envolvidas no efluxo da droga ou pela expressão de fatores que ativam mecanismos de reparação de danos causados ao ADN devido a ação dos agentes alquilantes (Chu & Chang, 1990).

4.2- Ensaio *ex vivo* em hemócitos de *M.galloprovincialis* expostos a ciclofosfamida

Muitos fármacos anticancerígenos são terapias não-alvo, isto é, não atuam sobre nenhuma molécula responsável pelo desenvolvimento e progressão do cancro, mas sim, sobre a molécula de ADN que é comum a todas as células (normais e cancerígenas) como é o caso da ciclofosfamida (Kolarevi et al., 2014). Assim sendo, a exposição de células de organismos não-alvo a concentrações ambientais de ciclofosfamida pode provocar inúmeros danos celulares devido ao seu mecanismo de ação (alquilação do ADN).

Estudos *in vitro* da citotoxicidade causada por fármacos anticancerígenos em animais aquáticos ainda não são muito comuns devido a falta de recursos necessários para a realização da técnica em células de animais invertebrados. Gacic et al. (2014) utilizaram a abordagem *in vitro* para analisar o impacto causado pelo anticancerígeno 5-Fu sobre hemócitos de mexilhões de água doce *Unio pictorum* e *Unio tumidus*. O 5-Fu é um quimioterapêutico pertencente ao grupo dos citostáticos designados por antimetabolitos. Inibe a síntese de timidina (nucleosídeo formado quando a timina liga-se a um anel da desoxirribose) pois, como base análoga, o 5-Fu incorpora-se no ADN ao invés da timina e, provoca danos a cadeia de ADN.

Os hemócitos dos mexilhões foram expostos a diferentes concentrações de 5-Fu (0,04; 0,4; 4 e 40 μ M) durante 22 horas. A viabilidade celular foi avaliada com o auxílio do corante *UptiBlue* que não é tóxico as células. A exposição dos hemócitos a diferentes concentrações de 5-Fu não afetou a viabilidade celular (não houve alterações significativas entre os controlos e os expostos a 5-Fu) em nenhuma das espécies de mexilhões testadas. Estes resultados demonstraram que, em concentrações baixas, o 5-Fu não induz citotoxicidade as células.

Neste trabalho, hemócitos de *M. galloprovincialis* foram expostos a concentrações ambientais de ciclofosfamida (10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng L⁻¹) a citotoxicidade foi analisada pelo ensaio do vermelho neutro. As concentrações mais elevadas de ciclofosfamida (500, 1000 ng L⁻¹) provocaram uma redução significativa na viabilidade celular dos hemócitos (indicada pela redução dos valores da absorvância) (Figura 3.2). Esses resultados demonstraram que a ciclofosfamida, mesmo em baixas concentrações, pode causar citotoxicidade nos hemócitos de organismos não-alvos. Nos bivalves, os hemócitos desempenham as funções do sistema imunitário, protegendo-os dos microrganismos invasores (Ruiz et al., 2015) e, portanto, concentrações ambientais de

ciclofosfamida demonstraram afetar o funcionamento do sistema imunitário. Por outro lado, em células do sistema imutário de humanos (linfócitos), baixas doses de ciclofosfamida inibem seletivamente linfócitos responsáveis pela tolerância imunológica, potenciando também a ação citotóxica deste fármaco sobre o sistema imunitário (Lutsiak et al., 2005).

4.3- Ensaio *in vivo* em *M.galloprovincialis* expostos a ciclofosfamida

O aumento crescente da ocorrência de casos de cancro e consequente aumento do consumo de fármacos anticancerígenos implica uma maior libertação desses fármacos para o ambiente aquático onde, entram em contacto com uma grande variedade de organismos não-alvo (peixes, bivalves). Fármacos são concebidos com um modo de ação específico, direcionados para uma molécula específica ou para um processo metabólico específico no organismo alvo. Contudo, muitos organismos, incluindo os bivalves compartilham receptores e mecanismos de resposta semelhantes devido a conservação de biomoléculas durante a evolução (Fent et al., 2006).

A exposição crónica desses organismos a pequenas concentrações de ciclofosfamida encontradas no ambiente pode provocar, inumeros danos celulares e tecidulares devido ao seu mecanismo de ação.

Neste trabalho, mexilhões *M. galloprovincialis* foram expostos a ciclofosfamida (1000 ng L⁻¹) durante 14 dias. A viabilidade celular, genotoxicidade, e alguns parâmetros bioquímicos foram analisados durante toda a exposição com o objetivo de observar quais os efeitos que, as concentrações de ciclofosfamida encontradas no ambiente aquático podem causar sobre organismos marinhos, neste caso, mexilhões.

A viabilidade celular dos hemócitos dos mexilhões expostos a ciclofosfamida indica que mesmo em reduzidas quantidades (ng L⁻¹), a ciclofosfamida atua sobre as células dos mexilhões causando citotoxicidade mesmo não se tratando de um organismo alvo (Figura 3.2). Este organismo, a semelhança dos humanos apresenta o sistema de oxidases do citocromo P-450 e, a ciclofosfamida foi concebida com o pressuposto de que, ao entrar em contacto com o organismo alvo, seria biotransformada pelo sistema de oxidases do

citocromo P-450 originando a mostarda de fosforamida. A mostarda é o agente alquilante ativo responsável por induzir aductos ao ADN. Os aductos formados são capazes de bloquear a replicação do ADN e, são considerados responsáveis pela ação citotóxica deste composto (Anderson et al., 1995; Emadi et al., 2009; Fu et al., 2012) pelo que, a avaliação da genotoxicidade em hemócitos de mexilhões expostos a concentrações ambientais é indispensável. A genotoxicidade foi avaliada através do ensaio cometa. Danos ao ADN foram mais elevados durante todo o tempo de exposição dos hemócitos de mexilhões a ciclofosfamida (Figura 3.3). Estes resultados comprovam que, mesmo em pequenas concentrações (1000 ng L^{-1}), a ciclofosfamida é capaz de originar os seus metabolitos reativos, de entre os quais, a mostarda de fosforamida responsável por formar aductos ao ADN e provocar genotoxicidade. Tripathi & Jena. (2009) também obtiveram resultados semelhantes utilizando o teste do cometa em linfócitos de ratos expostos a ciclofosfamida. Contudo, a concentração utilizada foi mais elevada (100 mg/kg).

A molécula alvo da mostarda de fosforamida é o ADN, no entanto, outros compostos como os lípidos da membrana, e proteínas podem interagir com a mostarda de fosforamida e resultar na produção de ROS (Stankiewicz et al., 2002). Consequentemente, os organismos desenvolvem sistemas de defesa antioxidante constituídos por um conjunto de enzimas antioxidantes como a GPx, capazes de catalisar a primeira linha de defesa contra as ROS (Halliwell & Chirico, 1993). Selvakumar et al. (2006) quantificaram a atividade da GPx em esperma do epidídimo de ratos expostos a ciclofosfamida (15 mg/kg). A quantificação foi realizada pelo método de Rotruck et al. (1973) que se baseia na reação da GSH restante da ação da GPx com o DTNB e, que resulta num composto que absorve a 412 nm . Verificou-se que a atividade da GPx foi menor no grupo dos ratos expostos a ciclofosfamida quando comparados com o grupo que não foi exposto a ciclofosfamida. Stankiewicz et al. (2002) quantificaram a atividade da GPx em ratos tratados intraperitonealmente com ciclofosfamida (150 mg/kg) foi menor do que nos ratos controlos. A redução da atividade da GPx em ratos expostos a ciclofosfamida deve-se a sua inativação provocada pelo excesso de produção de ROS provocando o stress oxidativo.

Ao contrário do que aconteceu nos mamíferos, a atividade da GPx analisada nas brânquias e na glândula digestiva de mexilhões após exposição a ciclofosfamida indica que nas brânquias, não houve variação significativa da atividade da GPx entre os

mexilhões expostos e os não expostos a ciclofosfamida (Figura 3.6A) o que significa que neste tecido, a quantidade de ROS produzida devido a ação da ciclofosfamida impediu a ativação da GPx. No entanto na glândula digestiva dos mexilhões expostos a ciclofosfamida a atividade da GPx aumentou significativamente (Figura 3.6B). Isto sugere que houve capacidade de neutralizar a formação de H₂O₂ originada pela exposição a ciclofosfamida. A diferença observada entre os resultados obtidos na atividade de GPx entre os mamíferos e os mexilhões pode ser devido há forma de exposição e há diferença entre as concentrações utilizadas.

Enzimas da família das GSTs catalisam a desintoxicação de xenobióticos eletrofilicos e alguns produtos resultantes do stress oxidativo mediada pela GSH. Este processo é extremamente importante para a manutenção da homeostase celular (Coles & Kadlubar, 2003). Britten et al. (1992) quantificaram a atividade da GST em pacientes com cancro do pulmão tratados com ciclofosfamida. Amostras do tecido tumoral foram recolhidos por biopsia e, a atividade enzimática quantificada por citometria de fluxo. A quantificação acusou um aumento significativo da atividade enzimática nos pacientes tratados com ciclofosfamida em relação aos pacientes que não receberam tratamento. Friedman et al. (1992) quantificaram a atividade da GST pelo método utilizado por Habig et al. (1974) em linhas celulares de meduloblastoma tratados com 4-OHCP (metabolito reativo da ciclofosfamida). A quantificação não acusou nenhuma alteração significativa na atividade da GST nas linhas celulares expostas ao metabolito em comparação com as linhas celulares não expostos.

Neste trabalho, a atividade enzimática da GST foi quantificada nas brânquias e na glândula digestiva de mexilhões após exposição a ciclofosfamida (Figura 3.7A). A quantificação da GST foi adaptada pelo método descrito por McFarland et al. (1999). Nas brânquias não houve alteração significativa na atividade da GST entre os mexilhões expostos e os não expostos a ciclofosfamida o que leva a concluir que, neste tecido, a ciclofosfamida não é capaz de induzir a atividade da GST. Na glândula digestiva (Figura 3.7B), observou-se primeiro uma redução na atividade da GST (após 3 dias) o que indica que, inicialmente houve biotransformação neste tecido. Contudo, a partir de 7 dias de exposição a atividade da GST aumentou. Este aumento de atividade indica que a GST catalisou o processo de conjugação dos metabolitos da ciclofosfamida com a GSH (Van der Oost et al., 2003) que facilita biotransformação e a excreção evitando consequentes

efeitos tóxicos provocados pelos metabolitos da ciclofosfamida. Em conclusão, o aumento da atividade da GST na glândula digestiva dos mexilhões expostos a ciclofosfamida indica um mecanismo de resistência a este fármaco exercida neste tecido.

A AChE é um biomarcador da atividade neuronal cuja atividade geralmente é alterada pela exposição a contaminantes (Gomes et al., 2011; Gonzalez-Rey & Bebianno, 2014; Gonzalez-Rey et al., 2014). Foi reportado que a ciclofosfamida tem um efeito inibitório sobre a atividade da AChE no cérebro de galinhas (Al-Jafari, 1993). Al-Jafari et al. (1995) quantificaram a atividade da AChE no sangue de homens saudáveis. O sangue foi extraído dos indivíduos e, exposto a diferentes concentrações de ciclofosfamida. A atividade foi medida durante um intervalo de tempo que variou entre 5 a 60 minutos. Verificou-se que as concentrações utilizadas (0,33- 1,67 mM) provocaram uma inibição da atividade da AChE crescente (38,8- 76,7%) o que indica que, quanto mais elevadas forem as concentrações de ciclofosfamida utilizadas, maior será a inibição da AChE.

A atividade enzimática da AChE foi quantificada nas brânquias de mexilhões após exposição a ciclofosfamida durante os 14 dias realizada a partir da quantidade de tiocolina libertada que, é proporcional a atividade da AChE (Figura 3.8). No terceiro dia de exposição, verificou-se um aumento significativo da atividade da AChE nas brânquias dos mexilhões expostos a ciclofosfamida ($p < 0,05$) sugerindo que baixas concentrações de ciclofosfamida não são capazes de inibir a atividade da AChE a curto prazo. Contudo, a atividade só começa a diminuir a partir de 7 dias de exposição o que indica que a exposição crónica e a bioacumulação dos metabolitos neste tecido pode causar neurotoxicidade.

O metabolismo da ciclofosfamida é acompanhada pelo aumento da produção de ROS, com consequentes alterações ao sistema antioxidante o que pode resultar no stress oxidativo. O stress oxidativo pode resultar numa maior produção de OH^\bullet que interagem com moléculas biológicas incluindo lípidos e induzem a LPO (Stankiewicz et al., 2002).

Stankiewicz et al. (2002) analisaram a LPO através da quantificação de um dos produtos resultantes da peroxidação, o MDA, em ratos tratados intraperitonealmente com ciclofosfamida (150 mg/kg). A quantificação do MDA foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) durante 14 dias. Verificou-se uma maior quantidade de

MDA nos ratos expostos a ciclofosfamida em comparação com os não expostos o que indica maior LPO. Selvakumar et al. (2006) analisaram a LPO em esperma do epidídimo de ratos expostos a ciclofosfamida (15 mg/kg). O MDA produzido pela LPO reage com o ácido tiobabitérico e, forma um composto colorido cuja absorvância pode ser medida a 532 nm. Verificou-se uma maior quantidade de MDA no esperma dos ratos expostos a ciclofosfamida em comparação com os não expostos o que indica maior LPO. Esse aumento de LPO é provocado, certamente, pela bioacumulação de ROS produzidos devido a interação da mostarda de fosfaramida com lípidos e que conseqüentemente provoca stress oxidativo nas células.

Neste trabalho, a LPO foi analisada nas brânquias e na glândula digestiva de mexilhões após exposição a ciclofosfamida durante os 14 dias (Figura 3.9A). O LPO foi determinado através da quantificação do MDA. Nas brânquias, houve um aumento significativo de LPO no último dia de exposição, nos mexilhões expostos a ciclofosfamida. Este aumento é indicado pela maior concentração do produto final da LPO, o MDA nas brânquias dos mexilhões expostos a ciclofosfamida. As elevadas concentrações do produto final da LPO neste tecido são devidas a bioacumulação de ROS causada pela ausência de atividade antioxidante (não indução de GPx após a exposição a ciclofosfamida - Figura 3.6A). Estes resultados sugerem que, a exposição crônica a ciclofosfamida pode resultar no stress oxidativo devido a acumulação de ROS, nomeadamente o OH^\bullet que ao interagir com lípidos resultando na LPO. Na glândula digestiva, após 7 dias de exposição, houve uma redução significativa na concentração de LPO nos mexilhões expostos a ciclofosfamida (indicado pela redução da concentração do MDA) o que indica que não ocorreu LPO inicialmente neste tecido. Isto deve-se, possivelmente ao aumento da atividade da GPx que, evita a interação de ROS com os lípidos. Contudo, após 14 dias de exposição houve, tal como nas brânquias um aumento significativo da concentração de LPO (indicado pelo aumento da concentração do MDA) nos mexilhões expostos a ciclofosfamida (Figura 3.9B). Esse aumento pode dever-se ao déficit de atividade antioxidante neste tecido (a atividade da GPx não aumentou significativamente nos mexilhões expostos a ciclofosfamida nesse mesmo dia - Figura 3.6B) o que resultou na bioacumulação de ROS que posteriormente reagiram com lípidos da membrana resultando na LPO. Estes resultados também indicam que as glândulas digestivas dos mexilhões, à semelhança das brânquias sofrem stress oxidativo quando

de uma exposição crónica a concentrações ambientais de ciclofosfamida, resultando posteriormente na LPO.

5- Conclusões

O contínuo crescimento da população e o aumento da esperança média de vida, o estilo de vida e o crescente contato com poluentes interferem no aumento exponencial de casos de cancro (Torre et al., 2015). O cancro tornou-se um flagelo mundial e, culminou no desenvolvimento de terapias novas e cada vez mais sofisticadas e direcionadas às células cancerígenas de organismos alvo (Reed, 2009). Muitos desses fármacos são ingeridos na sua forma inativa (pró-drogas) e, necessitam de ser metabolizados pelo organismo para que possam dar origem aos seus metabolitos reativos, capazes de exercer a ação pretendida sobre as moléculas alvo. Um exemplo é a ciclofosfamida, um quimioterapêutico utilizado no tratamento de diversos cancros. É uma pró-droga que ao entrar em contacto com o organismo é metabolizada originando os seus metabolitos reativos responsáveis pela toxicidade às células cancerígenas através da alquilação do seu ADN (Anderson et al., 1995; Emadi et al., 2009). Contudo, por vezes, a ciclofosfamida não é metabolizada, sendo excretada na sua forma parental (Fent et al., 2006; Johnson et al., 2008).

Ao ser excretada, a ciclofosfamida, a semelhança de outros resíduos tóxicos, é encaminhada para as ETAR. No entanto, existem problemas no que diz respeito a sua remoção das águas residuais pois, à semelhança de outros fármacos citotóxicos, a ciclofosfamida apresenta características físico-químicas que impedem a sua total biodegradação. Assim sendo, a ciclofosfamida é encontrada muitas vezes, em pequenas concentrações (ng L^{-1}) no ambiente aquático (Kosjek & Heath, 2011; Rowney et al., 2009). No ambiente aquático entra em contacto com inúmeros organismos entre os quais a espécie de mexilhões *M. galloprovincialis*. Apesar dos mexilhões não serem o organismo alvo da ciclofosfamida, compartilham receptores e mecanismos de resposta semelhantes aos dos seres humanos devido a conservação de biomoléculas durante a evolução (Fent et al., 2006). Assim sendo, este trabalho foi realizado com o intuito de verificar se, de facto, concentrações ambientais de ciclofosfamida têm, nos mexilhões,

um mecanismo de ação semelhante aos humanos e quais os impactos da acumulação nesses organismos para os seres humanos.

O teste de viabilidade em linhas celulares humanas (normais e cancerígenas) e em hemócitos de mexilhões comprovaram que, mesmo em pequenas concentrações, a ciclofosfamida é citotóxica aos organismos alvo e não-alvo.

O ensaio *in vivo* em mexilhões comprovou que, de facto a ciclofosfamida desempenha um mecanismo de ação semelhante a dos humanos. A concentração utilizada (1000 ng L⁻¹) foi metabolizada pelas oxidases do citocromo P-450, originando os seus metabolitos reativos capazes de formar aductos ao ADN e provocar genotoxicidade.

Além do ADN, os metabolitos reativos da ciclofosfamida, podem interagir com, proteínas lípidos da membrana e, resultar na produção de ROS nos mexilhões que, causam alterações na atividade da GPx nas brânquias e na glândula digestiva de mexilhões expostos a ciclofosfamida o que pode ter resultado em stress oxidativo. O stress oxidativo, por sua vez pode ter resultado numa maior produção de OH• que interagem com moléculas biológicas incluindo lípidos e induzido LPO em ambos os tecidos.

Em alguns tecidos como é o caso das brânquias, não houve indução da GST após a exposição a ciclofosfamida logo, não houve a conjugação dos metabolitos com moléculas polares que facilitam a sua excreção levando a bioacumulação desses metabolitos. Esse resultado já era previsto uma vez que, as brânquias são o órgão “filtrador” por onde a água e as partículas são conduzidos até á glândula digestiva. Logo, as brânquias não são o órgão responsável pela excreção de fármacos.

Por outro lado, na glândula digestiva, órgão onde a acumulação e armazenamento de contaminantes, e onde ocorre o metabolismo de compostos hidrofóbicos, a atividade da GST foi induzida durante todo o período de exposição.

A acumulação de metabolitos nas brânquias pode implicar, a longo prazo, a inibição da AChE comprovando assim que a exposição crónica a concentrações ambientais de ciclofosfamida pode ter efeitos neurotóxicos em mexilhões mesmo.

Os resultados deste estudo realçam a necessidade de uma consciencialização urgente sobre o impacto que fármacos citotóxicos, mesmo em pequenas quantidades, exercem

sobre a fauna aquática. De ressaltar também que, esses animais são utilizados para consumo humano em todo o mundo e, muitos deles existem em áreas onde estão em contacto permanente com esses contaminantes, podendo causar efeitos tóxicos nas populações que os consomem.

6- Perspetivas futuras

Após a análise dos resultados obtidos nesta dissertação, surgiu novas sugestões de trabalhos futuros com o intuito de se entender melhor a ecotoxicidade causada por este grupo de fármacos:

- a) Determinação da acumulação do fármaco em cada um dos tecidos de mexilhões expostos.

- b) Análise mais detalhada da atividade antioxidante (analisar outras enzimas importantes como a Catalase e SOD).

- c) Analisar vias de sinalização importantes para a proliferação celular que podem ser afetadas pela exposição ao fármaco como por exemplo a via do PI3K.

- d) Repetir o estudo utilizando uma mistura de fármacos quimioterapêuticos nos mexilhões e em outras espécies marinhas.

Referência

- Al-Jafari, A.A., 1993. The Toxicological Effect of Cyclophosphamide on Acetylcholinesterase Activity. *Toxicology Letters* 66(2): 125–31. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037842749390087E> (August 21, 2017).
- Al-Jafari, A.A., Duhaïman, A.S., Kamal, A.M., 1995. Inhibition of Human Acetylcholinesterase by Cyclophosphamide. *Toxicology* 96(1): 1–6.
- Almeida, C., Pereira, C.G., Gomes, T., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2013. Genotoxicity in Two Bivalve Species from a Coastal Lagoon in the South of Portugal. *Marine Environmental Research* 89: 29–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.04.008>.
- Altman, S.A., Randers, L., Rao, G., 1993. Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations. *Biotechnology Progress* 9(6): 671–74.
- Anderson, D., Bishop, J.B., Garner, R.C., Ostrosky-Wegman, P., Selby, P.B., 1995. Cyclophosphamide: Review of Its Mutagenicity for an Assessment of Potential Germ Cell Risks. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 330(1–2): 115–81.
- Ataya, K., Pydyn, E., Young, J., Struck, R., 1990. The Uptake and Metabolism of Cyclophosphamide by the Ovary. *Sel Cancer Ther.* 6(2): 83–92.
- Booker, V., Halsall, C., Llewellyn, N., Johnson, A., Williams, R., 2014. Prioritising Anticancer Drugs for Environmental Monitoring and Risk Assessment Purposes. *Science of the Total Environment* 473–474: 159–70.
- Borras, J.M., Sanchez-Hernandez, A., Navarro, M., Martinez, M., Mendez, E., Ponton, J.L.L., Espinas, J.A., 2001. Compliance, Satisfaction and Quality of Life of Patients with Colorectal Cancer Receiving Home Chemotherapy or Outpatient Treatment: A Randomised Controlled Trial. *Bmj* 322(April): 1–5. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=30558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brock, N., 1989. Oxazaphosphorine Cytostatics: Past-Present-Future. *Cancer research* 49(1): 1–7.
- Brock, N., 1996. Oxazaphosphorine Cytostatics. *Cancer Research* 78: 542–47.
- Brookes, P., Lawley, P D., 1961. The Alkylation of Guanosine and Guanylic Acid. *Biochem.J* 78: 3923–3928.
- Bruinink, A., Yu, D., Maier, P., 2002. Short-Term Assay for the Identification of Neurotoxic Compounds and Their Liver Derived Stable Metabolites. *Toxicology in Vitro* 16(6): 717–24.
- Buerge, I.J., Hans-Rudolf, B., Poiger, T., Müller, D.M., 2006. Occurrence and Fate of

- the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters. *Environmental Science & Technology* 40(23): 7242–50. <http://dx.doi.org/10.1021/es0609405>.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1981. Autoxidation of Biological Molecules. 1. Antioxidant Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in Vitro. *Journal of the American Chemical Society* 103(21): 6472–77. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00411a035>.
- 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., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., 2012. Bivalve Molluscs as a Unique Target Group for Nanoparticle Toxicity. *Marine Environmental Research* 76: 16–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>.
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., Fent, B., 2010. Highly Active Human Pharmaceuticals in Aquatic Systems: A Concept for Their Identification Based on Their Mode of Action. *Aquatic Toxicology* 96(3): 167–81.
- Chu, G., Chang, E., 1990. Cisplatin-Resistant Cells Express Increased Levels of a Factor That Recognizes Damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(9): 3324–27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2333286.
- Coles, B.F., Kadlubar, F.F., 2003. Detoxification of Electrophilic Compounds by Glutathione S-Transferase Catalysis: Determinants of Individual Response to Chemical Carcinogens and Chemotherapeutic Drugs 17: 115–30.
- Direção-Geral da Saúde., 1972. Resíduos Hospitalares. *Revista de Saude Publica* 6(4): 1–43.
- Egaas, E., Falls, G., Svendsen, N.O., Ramstad, H., Skaare, J.U., Dauterman, W.C., 1995. Strain- and Sex-Specific Differences in the Glutathione S-Transferase Class Pi in the Mouse Examined by Gradient Elution of the Glutathione-Affinity Matrix and Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* 1243: 256–64.
- Emadi, A., Jones, R.J., Brodsky, R.A., 2009. Cyclophosphamide and Cancer: Golden Anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology* 6(11): 638–47. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2009.146>.
- Fenet, H., Arpin-Pont, L., Vanhoutte-Brunie, A., Munaron, D., Fiandrino, A., Bueno, M.M., Boillot, C., Casellas, C., Mathieu, O., Gomez, E., 2014. Reducing PEC Uncertainty in Coastal Zones: A Case Study on Carbamazepine, Oxcarbazepine and Their Metabolites. *Environment International* 68: 177–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.025>.

- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76(2): 122–59.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136(5): E359–86.
- Fernando, J., Jones, R., 2015. The Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. *Surgery (United Kingdom)* 33(3): 131–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2015.01.005>.
- Fernando, J., Kumar, S., 2015. Principles of Cancer Treatment by Immunotherapy. *Surgery* 33(3): 117–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2015.01.004>.
- Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2014. Incidence of Anticancer Drugs in an Aquatic Urban System: From Hospital Effluents through Urban Wastewater to Natural Environment. *Environmental Pollution* 193: 216–23.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Broocks, B.W., Fabri, E., 2015. A Multibiomarker Approach to Explore Interactive Effects of Propranolol and Fluoxetine in Marine Mussels. *Environmental Pollution* 205: 60–69.
- Friedman, H.S., Colvi, O.M., Kaufmann, S.H., Ludeman, S.M., Bullock, N., Bigner, D.D., Griffith, O.W., 1992. Cyclophosphamide Resistance in Medulloblastoma. *cancer research* 52: 5373–78.
- Fu, D., Calvo, J.A., Samson, L.D., 2012. Balancing Repair and Tolerance of DNA Damage Caused by Alkylating Agents. *Nature Reviews Cancer* 12(February). <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3185>.
- Gacic, Z., Kolarevic, S., Sunjog, K., Krakun- kolarevic, M., Paunovic, M., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B., 2014. The Impact of in Vivo and in Vitro Exposure to Base Analogue 5-FU on the Level of DNA Damage in Haemocytes of Freshwater Mussels *Unio Pictorum* and *Unio Tumidus*. *Environmental Pollution* 191: 145–50.
- García-García, E., Prado- Alvarez, M., Novoa, B., Figueras, A., Rosales, C., 2008. Immune Responses of Mussel Hemocyte Subpopulations Are Differentially Regulated by Enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK Kinase Families. *Developmental and Comparative Immunology* 32(6): 637–53.
- Giulio, T.D.I., Washburn, C., Wenning, R.J., 1989. Biochemicals Responses in Aquatic Animals: A Review of Determinants of Oxidative Stress. *Environ.Toxicol.Chem.* 8: 1103–23.
- Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2011. Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Environmental Science and Technology* 45(21): 9356–62. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.080055095003&partnerID=40&md5=780842f225c69b1bb2d3d08b321c8cb8>.

- Gómez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., Cajaraville, M.P., 2005. Characterization of Mussel Gill Cells in Vivo and in Vitro. *Cell and Tissue Research* 321(1): 131–40.
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., 2014. Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) Diclofenac Exposure in Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 148: 221–30.
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., 2012. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID) Diclofenac Exposure Effects in Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 163(2012): 818–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.100>.
- Gonzalez-Rey, M., Mattos, J.J., Piazza, C.E., Bainy, A.C.D., Bebianno, M.J., 2014. Effects of Active Pharmaceutical Ingredients Mixtures in Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Aquatic toxicology* 153: 12–26. http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=121&SID=4FPesPiaZBz22p7nzzB&page=1&doc=1.
- Graham, M.A., Riley, R.J., Kerr, D.J 1991. DRUG METABOLISM IN CARCINOGENESIS AND CANCER CHEMOTHERAPY. *Pharmac. Ther* 51: 275–89.
- Guengerich, F.P., 2001. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14(6): 611–50. <http://dx.doi.org/10.1021/tx0002583>.
- Hales, B.F., 1982. Comparison of the Mutagenicity and Teratogenicity of Cyclophosphamide and Its Active Metabolites, 4-Hydroxycyclophosphamide, Phosphoramidate Mustard, and Acrolein. *Cancer Research* 42(8): 3016–21.
- Hales, B.F., 1981. Modification of the Teratogenicity and Mutagenicity of Cyclophosphamide With Thiol Compounds. *TERATOLOGY* 23: 373–81.
- Halliwel, B., Chirico, S., 1993. Lipid Peroxidation : Its Mechanism, Measurement and Significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57: 715S–725S. <http://ajcn.nutrition.org/content/57/5/715S.full.pdf+html>.
- Homolya, L., Váradi, A., Sarkadi, B., 2003. Multidrug Resistance-Associated Proteins: Export Pumps for Conjugates with Glutathione, Glucuronate or Sulfate. *BioFactors (Oxford, England)* 17(1–4): 103–14.
- Horváthová, E., Slamenoa, D., Hlincikova, L., Mandal, T.K., Gabelova, A., Collins, A.R., 1998. The Nature and Origin of DNA-Single-Strand Breaks Determined with the Comet Assay. *Mutation Research* 409: 163–71.
- Jakoby, W.B., Ziegler, D.M., 1990. The Enzymes of Detoxication. *The Journal of Biological Chemistry* 265(34): 20715–18. http://books.google.co.in/books/about/The_Enzymes.html?id=HdB-MXyo2ewC.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J., 2008. Cancer

- Statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 58(2): 71–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287387> <http://doi.wiley.com/10.3322/CA.2007.0010>.
- Ji, L.L., Bejma, J., 1999. Aging and Acute Exercise Enhance Free Radical Generation in Rat Skeletal Muscle. *Journal of Applied Physiology* 87: 465–70.
- Jiang, J.J., Lee, C.L., Fang, M.D., 2014. Emerging Organic Contaminants in Coastal Waters: Anthropogenic Impact, Environmental Release and Ecological Risk. *Marine Pollution Bulletin* 85(2): 391–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.045>.
- Johnson, A.C., Juergens, M.D., Williams, R.J., Kummer, K., Kortenkamp, A., sumpter, J.P., 2008. Do Cytotoxic Chemotherapy Drugs Discharged into Rivers Pose a Risk to the Environment and Human Health? An Overview and UK Case Study. *Journal of Hydrology* 348(1–2): 167–75.
- Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M.P., 2014. Cytotoxicity and Cellular Mechanisms Involved in the Toxicity of CdS Quantum Dots in Hemocytes and Gill Cells of the Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 153: 39–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.003>.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36(6): 1202–11.
- Kosjek, T., Heath, E., 2011. Occurrence, Fate and Determination of Cytostatic Pharmaceuticals in the Environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 30(7): 1065–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.007>.
- Kranendonk, M., 2016. Curricular Unit – Genetic Toxicology.
- Kümmerer, K., Steger-Hartmann, T., Meyer, M., 1997. Biodegradability of the Anti-Tumour Agent Ifosfamide and Its Occurrence in Hospital Effluents and Communal Sewage. *Water Research* 31(11): 2705–10.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., Evans, B.M., 1992. Contaminant Impact on Interactions of Molecular Probes with Lysosomes in Living Hepatocytes from Dab Limanda Limanda. *Marine Ecology Progress Series* 91(December): 135–40.
- Lutsiak, M.E.C., Semnani, R.T., Pascalis, R., Kashmiri, S.V.S., Schlom, J., Sabzevari, H., 2005. Inhibition of CD4+ 25+ T Regulatory Cell Function Implicated in Enhanced Immune Response by Low-Dose Cyclophosphamide. *Blood* 105(7): 2862–68.
- Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2009. Effects of Environmental Concentrations of the Antiepileptic Drug Carbamazepine

- on Biomarkers and cAMP-Mediated Cell Signaling in the Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 94(3): 177–85.
- Martins, F.C., Oliveira, C.F., 2009. Chemotherapy and the Future: Microdialysis as a Local Administration Technique. *European Journal of Gynaecological Oncology* 30(1): 5–8.
- Mastrangelo, M.J., Berd, D., Maguire, H.C., 1984. Potentiation of Human Cell-Mediated and Humoral Immunity by Low-Dose Cyclophosphamide. *Cancer Research* 44(11): 5439–43.
- Matar, P., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I., Scharovsky, O.G., 2001. Down Regulation of T-Cell-Derived IL-10 Production by Low-Dose Cyclophosphamide Treatment in Tumor-Bearing Rats Restores in Vitro Normal Lymphoproliferative Response. *International Immunopharmacology* 1(2): 307–19.
- Mater, N., Geret, F., Castilo, L., Faucet-Marquis, V., Albasi, C., Pfohl-Leszkowicz, A., 2014. In Vitro Tests Aiding Ecological Risk Assessment of Ciprofloxacin, Tamoxifen and Cyclophosphamide in Range of Concentrations Released in Hospital Wastewater and Surface Water. *Environment International* 63: 191–200. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412013002717>.
- McCarroll, N., Cimino, M., Chu, M., Dearfield, K., Keshava, C., Kligerman, A., Owen, R., Protzel, A., Putzrath, R., Schoeny, R., 2008. An Evaluation of the Mode of Action Framework for Mutagenic Carcinogenic Case Study: Cyclophosphamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49: 117–31. www.euro.who.int.
- McFarland, V. A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarviz, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D., 1999. Biomarkers of Oxidative Stress and Genotoxicity in Livers of Field- Collected Brown Bullhead, *Ameiurus Nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37(2): 236–41.
- Nazar, M.L., Rodrigues, L.E.A., Nascimento, I., 2008. The Lysosomal Stability as a Biomarker for the Determination of Pollution in Aquatic Environments. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51(5): 1071–77.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., 2005. Lipid Peroxidation: Mechanisms, Inhibition, and Biological Effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1): 668–76. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X05017766> (April 15, 2017).
- O'Neill, V J., Twelves, C.J., 2002. Oral Cancer Treatment: Developments in Chemotherapy and beyond. *British Journal of Cancer* 87(9): 933–37. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.bjc.6600591>.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2010. Intersex and Oocyte Atresia in a Mussel Population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(5): 693–701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.04.002>.

- Owadally, W., Staffurth, J., 2015. Principles of Cancer Treatment by Radiotherapy. *Surgery*: 10–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.12.008>.
- Page, R., Takimoto, C., 1993. Principles of Chemotherapy. *Cancer Management: A multidisciplinary approach* 2(2): 21–37.
- Patel, J M., 1990. Metabolism and Pulmonary Toxicity of Cyclophosphamide. *Pharmac. Ther* 47: 137–46.
- Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., Shah, A., 2009. In - Vitro Cytotoxicity Activity of Solanum Nigrum Extract Against Hela Cell Line and Vero Cell Line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 1(November 2008): 38–46. https://www.researchgate.net/profile/Sanjay_Patel54/publication/228492173_In-Vitro_cytotoxicity_activity_of_Solanum_Nigrum_extract_against_Hela_cell_line_and_Vero_cell_line/links/5588ee9408ae347f9bdac00b.pdf.
- Pavlica, M., Klobucar, G.I.V., Vetma, N., Erben, R., Papes, D., 2000. Detection of Micronuclei in Haemocytes of Zebra Mussel and Great Ramshorn Snail Exposed to Pentachlorophenol. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 465(1–2): 145–50.
- Pavlica, M., Mojar, N., Erben, R., Papes, D., 2001. Detection of DNA Damage in Haemocytes of Zebra Mussel Using Comet Assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 490(2): 209–14.
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an Old Biomarker with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32(2): 225–31.
- Reed, M., 2009. Principles of Cancer Treatment by Surgery. *Surgery* 27(4): 178–81.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, Glutathione-Dependent and Antioxidant Enzymes in Mussel, *Mytilus Galloprovincialis*, Exposed to Metals under Field and Laboratory Conditions: Implications for the Use of Biochemical Biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31(2): 143–64.
- Rekhadevi, P. V., Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Mahboob, M., Rahman, M.F., Grover, P., 2007. Genotoxicity Assessment in Oncology Nurses Handling Anti-Neoplastic Drugs. *Mutagenesis* 22(6): 395–401.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/cytotoxicity. *Nature protocols* 3(7): 1125–31. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.
- Richard A. Britten, J. A. Green, H. M. W., 1992. Cellular Glutathione (GSH) and Glutathione S-Transferase (GST) Activity in Human Ovarian Tumor Biopsies Following Exposure to Alkylating Agents. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 24(March): 527–31.
- Rocha, T.L., Gomes, T., Cardoso, C, Letendre, J., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Teixeira,

- M.R. Bebianno, M.J., 2014. Immunocytotoxicity, Cytogenotoxicity and Genotoxicity of Cadmiumbased Quantum Dots in the Marine Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 101(1): 29–37.
- Rowney, N.C., Andrew, C.J., Richard, J.W., 2009. Cytotoxic Drugs in Drinking Water: A Prediction and Risk Assessment Exercise for the Thames Catchment in the United Kingdom. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 28(12): 2733–43.
- Ruiz, P., Katsumiti, A., Nieto, J.A., Bori, J., Jimeno-Romero, A., Reip, P., Arostegui, I., Orbea, A., Cajaraville, M.P., 2015. Short-Term Effects on Antioxidant Enzymes and Long-Term Genotoxic and Carcinogenic Potential of CuO Nanoparticles Compared to Bulk CuO and Ionic Copper in Mussels *Mytilus Galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 111: 107–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.018>.
- Schmitt, H., Boucard, T., Garric, J., Jensen, J., Parrott, J., Péry, A., Rombke, J., Straub, J.O., Hutchinson, T.H., Sanchez-Arguello, Wennmalm, A., Duis, K., 2009. Recommendations on the Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals: Effect Characterization. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6(1): 588–602.
- Selvakumar, E., Prahallatha, C., Sudharsan, P.T., Varalakshmi, P., 2006. Chemoprotective Effect of Lipoic Acid against Cyclophosphamide-Induced Changes in the Rat Sperm. *Toxicology* 217: 71–78.
- Slameňová, D., Gábelová, A., Ruzeková, L., Chalupa, I., Horváthová, E., Farkasová, T., Bozsákyová, E., Stetina, R., 1997. Detection of MNNG-Induced DNA Lesions in Mammalian Cells; Validation of Comet Assay against DNA Unwinding Technique, Alkaline Elution of DNA and Chromosomal Aberrations. *Mutation Research - DNA Repair* 383(3): 243–52.
- Solé, M., Lobera, G., Aljinovic, J., Ríos, J., Garcia de la Parra, L.M., Maynou, F., Cartes, J.E., 2008. Cholinesterases Activities and Lipid Peroxidation Levels in Muscle from Shelf and Slope Dwelling Fish from the NW Mediterranean: Its Potential Use in Pollution Monitoring. *Science of The Total Environment* 402(2): 306–17. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969708004828> (April 13, 2017).
- Stankiewicz, A., Skrzydlewska, E., Makiela, M., 2002. EFFECTS OF AMIFOSTINE ON LIVER OXIDATIVE STRESS CAUSED BY CYCLOPHOSPHAMIDE. *Drug metabolism and Drug Interactions* 19: 67–82.
- Tennant, J. R., 1964. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation* 2(6): 685–94.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, L.R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global Cancer Statistics, 2012. *CA: a cancer journal of clinicians*. 65(2): 87–108. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21262/abstract>.
- Toufexi, E., Tsarpali, V., Efthimiou, I., Vidali, M.S., Vlastos, D., Dailianis, S., 2013. Environmental and Human Risk Assessment of Landfill Leachate: An Integrated

- Approach with the Use of Cytotoxic and Genotoxic Stress Indices in Mussel and Human Cells. *Journal of Hazardous Materials* 260: 593–601. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.054>.
- Tripathi, D N., Jena, G.B., 2009. Chemico-Biological Interactions Intervention of Astaxanthin against Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and DNA Damage : A Study in Mice. 180: 398–406.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57–149.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., 2013. Practical Procedures for Selected Biomarkers in Mussels, *Mytilus Galloprovincialis* - Implications for Marine Pollution Monitoring. *Science of the Total Environment* 461–462: 56–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.079>.
- Vu, V.T., Fenselau, C.C., 1981. Identification of Three Alkylated Nucleotide Adducts from the Reaction of Guanosine 5'-Monophosphate with Phosphoramidate Mustard. *Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (13): 7362–64.
- Weber, G.F., Waxman, D.J., 1993. Activation of the Anti-Cancer Drug Ifosfamide by Rat Liver Microsomal P450 Enzymes. *Biochemical Pharmacology* 45(8): 1685–94.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. *Aquatic Toxicology* 19(2): 137–61. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166445X91900336> (April 15, 2017).
- Worthinton, D.J., Rosemeyer, M.A., 1974. Human Glutathione Reductase: Purification of the Crystalline Enzyme from Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* 48(1): 167–77.
- Yang, J., Chang, E., Cherry, A.M., Bangs, C.D., Oei, Y., Bornar, A., Bronstein, A., Chiu, C.P., Herron, G.S., 1999. Human Endothelial Cell Life Extension by Telomerase Expression. *J Biol Chem* 274(37): 26141–48. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10473565.
- Zwart, L.L., Venhorst, J., Groot, M., Commandeur, J.N.M., Hermanns, R.C.A., Meerman, J.H.M., Van Baar, B.L.M., Vermeulen, N.P.E., 1997. Simultaneous Determination of Eight Lipid Peroxidation Degradation Products in Urine of Rats Treated with Carbon Tetrachloride Using Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 694(2): 277–87. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434797001448> (April 15, 2017).

ANEXOS

Tabela 1: Análise estatística da viabilidade celular em linhas celulares humanas (Hela).

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT vs 10	-0,05167	1,139	No	ns
CT vs 50	0,02833	0,6248	No	ns
CT vs 100	0,03071	0,7029	No	ns
CT vs 250	0,03300	0,6938	No	ns
CT vs 500	0,05900	1,240	No	ns
CT vs 1000	0,1417	3,124	No	ns
10 vs 50	0,08000	1,764	No	ns
10 vs 100	0,08238	1,885	No	ns
10 vs 250	0,08467	1,780	No	ns
10 vs 500	0,1107	2,327	No	ns
10 vs 1000	0,1933	4,263	No	ns
50 vs 100	0,002381	0,05449	No	ns
50 vs 250	0,004667	0,09812	No	ns
50 vs 500	0,03067	0,6448	No	ns
50 vs 1000	0,1133	2,499	No	ns
100 vs 250	0,002286	0,04970	No	ns
100 vs 500	0,02829	0,6150	No	ns
100 vs 1000	0,1110	2,539	No	ns
250 vs 500	0,02600	0,5234	No	ns
250 vs 1000	0,1087	2,285	No	ns
500 vs 1000	0,08267	1,738	No	ns

ns: Não significativo

Tabela 2: Análise estatística da viabilidade celular em linhas celulares humanas (RPE).

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT vs 10	0,0000	0,0000	No	ns
CT vs 50	0,005000	0,1347	No	ns
CT vs 100	0,01500	0,4478	No	ns
CT vs 250	0,02500	0,6737	No	ns
CT vs 500	0,0420	1,200	No	ns
CT vs 1000	0,07500	2,021	No	ns
10 vs 50	0,005000	0,1347	No	ns
10 vs 100	0,01500	0,4478	No	ns
10 vs 250	0,02500	0,6737	No	ns
10 vs 500	0,0420	1,200	No	ns
10 vs 1000	0,07500	2,021	No	ns
50 vs 100	0,01000	0,2800	No	ns
50 vs 250	0,02000	0,5113	No	ns
50 vs 500	0,0370	0,9971	No	ns
50 vs 1000	0,07000	1,790	No	ns
100 vs 250	0,01000	0,2800	No	ns
100 vs 500	0,02700	0,8060	No	ns
100 vs 1000	0,0600	1,680	No	ns
250 vs 500	0,01700	0,4581	No	ns
250 vs 1000	0,05000	1,278	No	ns
500 vs 1000	0,03300	0,8893	No	ns

ns: Não significativo

Tabela 3: Análise estatística da viabilidade celular em hemócitos de *M. galloprovincialis* (Dia 1/ Grupo1)

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT vs 10	0,073	3,5	No	ns
CT vs 50	0,11	5,2	Yes	**
CT vs 100	0,13	6,1	Yes	***
CT vs 250	0,15	7,3	Yes	***
CT vs 500	0,22	10	Yes	***
CT vs 1000	0,25	12	Yes	***
10 vs 50	0,037	1,7	No	ns
10 vs 100	0,057	2,7	No	ns
10 vs 250	0,078	3,8	No	ns
10 vs 500	0,15	6,9	Yes	***
10 vs 1000	0,18	8,4	Yes	***
50 vs 100	0,020	0,92	No	ns
50 vs 250	0,041	1,9	No	ns
50 vs 500	0,11	5,0	Yes	*
50 vs 1000	0,14	6,6	Yes	***
100 vs 250	0,021	0,98	No	ns
100 vs 500	0,089	4,1	No	ns
100 vs 1000	0,12	5,7	Yes	**
250 vs 500	0,068	3,3	No	ns
250 vs 1000	0,10	4,9	Yes	*
500 vs 1000	0,034	1,6	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 4: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da viabilidade celular em hemócitos de *M. galloprovincialis* (Dia 2/ Grupo2)

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	P < 0.05?	Summary
CT vs 10	0,001049	0,06529	No	ns
CT vs 50	0,05568	3,583	No	ns
CT vs 100	0,1652	10,28	Yes	***
CT vs 250	0,2134	13,28	Yes	***
CT vs 500	0,2620	15,66	Yes	***
CT vs 1000	0,2833	16,94	Yes	***
10 vs 50	0,05463	3,356	No	ns
10 vs 100	0,1642	9,784	Yes	***
10 vs 250	0,2124	12,66	Yes	***
10 vs 500	0,2609	14,98	Yes	***
10 vs 1000	0,2822	16,21	Yes	***
50 vs 100	0,1096	6,729	Yes	***
50 vs 250	0,1577	9,689	Yes	***
50 vs 500	0,2063	12,18	Yes	***
50 vs 1000	0,2276	13,44	Yes	***
100 vs 250	0,04818	2,871	No	ns
100 vs 500	0,09672	5,554	Yes	**
100 vs 1000	0,1180	6,779	Yes	***
250 vs 500	0,04854	2,787	No	ns
250 vs 1000	0,06987	4,012	No	ns
500 vs 1000	0,02133	1,183	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 5: Análise estatística (ANOVA de 2 via) da viabilidade celular obtido através do ensaio do vermelho neutro em hemócitos de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
3	-0,1126	P<0.01	**
7	-0,06020	P > 0.05	ns
14	-0,2101	P<0.001	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 5.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da viabilidade celular obtida através do ensaio do vermelho neutro em hemócitos de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT3 vs CT7	-0,2644	11,76	Yes	***
CT3 vs CT14	-0,1345	6,822	Yes	***
CT7 vs CT14	0,1299	5,776	Yes	**

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 5.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da viabilidade celular obtida através do ensaio do vermelho neutro em hemócitos de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	-0,3167	13,54	Yes	***
CP3 vs CP14	-0,03696	1,771	No	ns
CP7 vs CP14	0,2798	12,70	Yes	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 6: Análise estatística (ANOVA de 2 via) da viabilidade celular obtida através do ensaio com TB em hemócitos de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	-8,820	P > 0.05	ns
7	-17,29	P<0.01	**
14	-18,51	P<0.001	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 6.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da viabilidade celular obtida através do ensaio com TB em hemócitos de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	-8,685	3,088	No	ns
CT0 vs CT7	-27,66	10,18	Yes	***
CT0 vs CT14	-26,82	9,872	Yes	***
CT3 vs CT7	-18,98	6,747	Yes	***
CT3 vs CT14	-18,14	6,449	Yes	***
CT7 vs CT14	0,8375	0,3082	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 6.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da viabilidade celular obtida através do ensaio com TB em hemócitos de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	-10,51	2,967	No	ns
CP3 vs CP14	-8,451	2,386	No	ns
CP7 vs CP14	2,056	0,6620	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 7: Análise estatística (ANOVA de 2 via) da genotoxicidade obtida através do ensaio do cometa em hemócitos de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	3,889	P<0.001	***
7	7,358	P<0.001	***
14	8,117	P<0.001	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 7.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da genotoxicidade obtida através de hemócitos de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	-6,581	13,65	Yes	***
CT0 vs CT7	0,4461	0,8446	No	ns
CT0 vs CT14	0,5537	1,048	No	ns
CT3 vs CT7	7,028	13,31	Yes	***
CT3 vs CT14	7,135	13,51	Yes	***
CT7 vs CT14	0,1076	0,1886	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 7.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da genotoxicidade obtida através do ensaio do cometa em hemócitos de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	3,558	4,544	Yes	*
CP3 vs CP14	2,907	3,712	Yes	*
CP7 vs CP14	-0,6510	0,8314	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 8: Análise estatística (ANOVA de 2 vias) da atividade da GPx nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	6,685	P > 0.05	ns
7	12,40	P > 0.05	ns
14	-21,40	P > 0.05	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 8.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GPx nas brânquias de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	-1,645	2,938	No	ns
CT0 vs CT7	-0,6019	1,075	No	ns
CT0 vs CT14	0,7481	1,336	No	ns
CT3 vs CT7	1,044	1,768	No	ns
CT3 vs CT14	2,394	4,054	No	ns
CT7 vs CT14	1,350	2,287	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 8.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GPx nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	1,287	2,859	No	ns
CP3 vs CP14	1,201	2,343	No	ns
CP7 vs CP14	-0,08607	0,1757	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 9: Análise estatística (ANOVA de 2 vias) da atividade da GPx nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	67,31	P < 0.05	*
7	94,40	P<0.01	**
14	41,34	P > 0.05	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 9.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GPx nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	55,46	4,445	Yes	*
CT0 vs CT7	36,51	2,617	No	ns
CT0 vs CT14	7,593	0,5819	No	ns
CT3 vs CT7	-18,95	1,519	No	ns
CT3 vs CT14	-47,87	4,177	No	ns
CT7 vs CT14	-28,92	2,216	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 9.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GPx nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	-46,05	2,628	No	ns
CP3 vs CP14	-21,90	1,250	No	ns
CP3 vs CP0	11,85	0,6210	No	ns
CP7 vs CP14	24,15	1,308	No	ns
CP7 vs CP0	57,89	2,902	No	ns
CP14 vs CP0	33,74	1,691	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 10: Análise estatística (ANOVA de 2 vias) da atividade da GST nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	3,905	P > 0.05	ns
7	41,93	P > 0.05	ns
14	24,36	P > 0.05	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 10.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GST nas brânquias de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	135,9	13,97	Yes	***
CT0 vs CT7	120,5	11,30	Yes	***
CT0 vs CT14	135,5	13,92	Yes	***
CT3 vs CT7	-15,44	1,586	No	ns
CT3 vs CT14	-0,4411	0,05067	No	ns
CT7 vs CT14	15,00	1,541	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 10.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GST nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	-53,47	3,265	No	ns
CP3 vs CP14	-20,89	1,276	No	ns
CP3 vs CP0	-132,0	7,649	Yes	***
CP7 vs CP14	32,57	2,110	No	ns
CP7 vs CP0	-78,54	4,797	Yes	*
CP14 vs CP0	-111,1	6,786	Yes	**

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 11: Análise estatística (ANOVA de 2 vias) da atividade da GST nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	-42,96	P < 0.05	*
7	60,76	P<0.001	***
14	70,54	P<0.001	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 11.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GST nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	2,481	0,2701	No	ns
CT0 vs CT7	13,36	1,612	No	ns
CT0 vs CT14	33,38	3,635	No	ns
CT3 vs CT7	10,88	1,231	No	ns
CT3 vs CT14	30,90	3,192	No	ns
CT7 vs CT14	20,02	2,265	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 11.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da GST nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	-92,83	8,473	Yes	***
CP3 vs CP14	-82,60	6,979	Yes	**
CP3 vs CP0	-45,44	4,371	Yes	*
CP7 vs CP14	10,24	0,8649	No	ns
CP7 vs CP0	47,39	4,560	Yes	*
CP14 vs CP0	37,16	3,284	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 12: Análise estatística (ANOVA de 2 vias) da atividade da AChE nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	0,02980	P<0.001	***
7	-0,002477	P > 0.05	ns
14	-0,003982	P > 0.05	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 12.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da AChE nas brânquias de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	0,03498	7,886	Yes	***
CT0 vs CT7	0,03849	8,678	Yes	***
CT0 vs CT14	0,04239	8,849	Yes	***
CT3 vs CT7	0,003513	0,7921	No	ns
CT3 vs CT14	0,007415	1,548	No	ns
CT7 vs CT14	0,003902	0,8146	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 11.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da atividade da AChE nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	Q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	0,03579	7,462	Yes	***
CP3 vs CP14	0,04119	8,590	Yes	***
CP3 vs CP0	-0,005179	1,080	No	ns
CP7 vs CP14	0,005407	1,127	No	ns
CP7 vs CP0	-0,04097	8,542	Yes	***
CP14 vs CP0	-0,04637	9,670	Yes	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 12: Análise estatística (ANOVA de 2 vias) da LPO nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	-0,1340	P > 0.05	ns
7	-0,3700	P > 0.05	ns
14	1,041	P<0.001	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 12.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da LPO nas brânquias de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	0,09600	0,9247	No	ns
CT0 vs CT7	-0,1230	1,117	No	ns
CT0 vs CT14	-0,2430	2,445	No	ns
CT3 vs CT7	-0,2190	1,989	No	ns
CT3 vs CT14	-0,3390	3,411	No	ns
CT7 vs CT14	-0,1200	1,133	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 12.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da LPO nas brânquias de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	0,01700	0,1159	No	ns
CP3 vs CP14	-1,514	9,885	Yes	***
CP3 vs CP0	-0,1163	0,7933	No	ns
CP7 vs CP14	-1,531	10,44	Yes	***
CP7 vs CP0	-0,1333	0,9536	No	ns
CP14 vs CP0	1,398	9,531	Yes	***

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 13: Análise estatística (ANOVA de 2 vias) da LPO nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Time	Difference	P value	Summary
0	0,0000	P > 0.05	ns
3	0,02767	P > 0.05	ns
7	-0,2633	P<0.001	***
14	0,1993	P<0.01	**

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 13.1: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da LPO nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* não expostos a ciclofosfamida

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CT0 vs CT3	0,1120	3,182	No	ns
CT0 vs CT7	-0,02400	0,6429	No	ns
CT0 vs CT14	0,1193	2,937	No	ns
CT3 vs CT7	-0,1360	3,643	No	ns
CT3 vs CT14	0,007333	0,1805	No	ns
CT7 vs CT14	0,1433	3,373	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)

Tabela 13.2: Análise estatística (ANOVA de 1 via) da LPO nas glândulas digestivas de *M. galloprovincialis* expostos a 1000 ng L⁻¹ de ciclofosfamida.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
CP3 vs CP7	0,1550	4,923	Yes	*
CP3 vs CP14	-0,1643	4,977	Yes	*
CP3 vs CP0	-0,08433	2,554	No	ns
CP7 vs CP14	-0,3193	9,671	Yes	***
CP7 vs CP0	-0,2393	7,248	Yes	***
CP14 vs CP0	0,08000	2,320	No	ns

ns: Não significativo; *(p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001)